

機関番号：83903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390469

研究課題名：歯周炎における新規病態因子の分子制御機構に関する研究

研究課題名：Molecular mechanism of a novel pathogenic factor in the periodontitis.

研究代表者

新飯田 俊平 (NIIDA SHUMPEI)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・室長

研究者番号：10137630

研究成果の概要（和文）：我々は細菌γ-GTP (bGGT)が破骨細胞形成を刺激することを見出した。本研究ではbGGTによる破骨細胞分化誘導の分子機構について検討した。細菌由来分子には細胞膜上のToll-like receptor (TLR) familyが関与することから、複数のTLRsに共通するアダプター分子MyD88のKOマウス骨髄マクロファージ(BMM)を用いた実験を行った。その結果、MyD88欠損BMMからは破骨細胞は誘導されなかった。さらに、TLR4欠損BMMでも同様の結果が得られた。またbGGTはLPSと同じように細胞内シグナル伝達を行うことが確認された。これらの結果から、bGGTはTLR4を介して破骨細胞形成を刺激していることが示された。

研究成果の概要（英文）：We found that bacterial gamma-glutamyl transpeptidase (bGGT) could induce osteoclast formation from the culture of bone marrow macrophages (BMMs). In the present study, we investigated the molecular mechanism of bGGT-mediated osteoclastogenesis. Because toll-like receptors (TLRs) are innate immune sensor for bacterial components, we firstly examined osteoclast induction test using BMMs derived from MyD88-deficient mice, which is a common adaptor molecule for several TLRs. The bGGT could not induce osteoclast formation in the cultures of these BMMs. To determine the bGGT specific receptor, we tested the osteoclast formation in TLR2- or TLR4-deficient BMMs. At last, we found that bGGT-dependent osteoclastogenesis did not occur in the TLR4- deficient BMMs. Furthermore, the phenotypes of signal transduction stimulated by bGGT were same as by LPS which is major ligand for TLR4. These results strongly suggest that bGGT stimulates osteoclastogenesis via TLR4.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
平成 21 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
平成 22 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・形態系基礎歯科学

キーワード：骨破壊, 破骨細胞, TLR, γ-GTP, バクテリア

1. 研究開始当初の背景

γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)

に破骨細胞誘導活性があることを見出した。
GGTはグルタチオン代謝の中心的酵素として

知られているが、我々の研究により GGT の破骨細胞誘導活性は酵素活性に非依存的な生物活性であることが明らかになった(JBC, 2004)。その後、関節リウマチの滑液中の GGT が高値で、関節炎モデルマウスでは GGT が局所的骨破壊因子であることを報告した(J Bone Miner Res, 2007)。

一方、バクテリアにおいても GGT はその生命維持に重要な酵素である。我々はバクテリアが集積する歯肉溝ではバクテリア GGT (bGGT)が歯周炎における歯槽骨破壊因子となると仮定して、遺伝子組換え型 bGGT を作製して破骨細胞誘導実験を行った。その結果、bGGT の刺激を受けた骨髄マクロファージからは、未刺激の場合より有意に破骨細胞形成が促進された。

2. 研究の目的

我々は、bGGT が破骨細胞形成能を有することを見出したが、その誘導機構は不明のままである。そこで、本研究では bGGT による破骨細胞形成の分子メカニズム、特に bGGT に結合する受容体の同定を目標に、解析を行った。

3. 研究の方法

1) マウス

TLR シグナルの介在分子である MyD88 を欠損したマウスのほか、TLR2 および TLR4 を欠損したマウスを購入し、実験に用いた。対照群として、同じ遺伝子背景をもつ野生型マウス(C57BL/6)を用意した。

2) bGGT の作製

ピロリ菌ならびに *Toreponema denticola* の遺伝子組換え型 GGT (pGGT, tdGGT) を大腸菌により作製した。これらの bGGT 作製は連携研究者である柴山博士が担当した。

3) In vivo における破骨細胞誘導実験

ラットの歯肉溝から pGGT を添加し、4 日後に歯周組織を摘出した。その後脱灰を経て病理標本とし、H-E 染色および TRAP 染色を行った。

4) 破骨細胞前駆細胞の調整

上記遺伝子欠損マウスより、骨髄細胞を採取し、M-CSF 存在下で培養して誘導した骨髄マクロファージを破骨細胞前駆細胞として用いた。

5) 培養による破骨細胞誘導実験

M-CSF 存在下で誘導した破骨細胞前駆細胞の培養系に至適濃度以下の破骨細胞分化因子 RANKL を添加した後、bGGT を添加して破骨細胞誘導を行った。破骨細胞の同定は TRAP 染色により行った。

6) シグナルカスケード解析

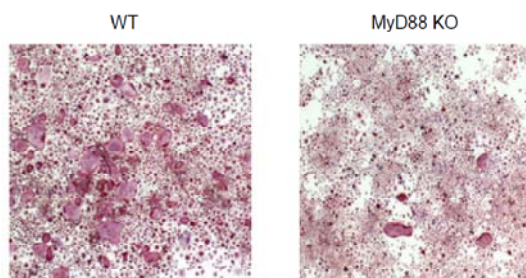
TLR シグナルの反応について、MyD88 の下流分子のリン酸化等についてウエスタンブロッティングを行い、活性の解析を行った。

7) *P. gingivalis* の GGT 遺伝子探索

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) のゲノムから GGT 遺伝子の同定を行うため、ピロリ菌 GGT 遺伝子配列を基に、データベースにある *P. gingivalis* ゲノム情報からの探索を行った。

4. 研究成果

bGGT による破骨細胞誘導は TLR を介していると仮定して、まず MyD88 欠損マウスの骨髄マクロファージを破骨細胞前駆細胞とした破骨細胞誘導実験を行った。M-CSF と微量 RANKL 存在下で培養した野性型骨髄マクロファージを pGGT で刺激すると多数の破骨細胞様細胞が形成されたが(下図左)、MyD88 欠損マクロファージからはほとんど形成されないか、形成されてもごく僅かであった(下図右)。この結果は bGGT による破骨細胞形成に MyD88 分子が関与していることを示唆している。



次に、どの TLR が寄与しているかを明らかにする目的で、TLR2 または TLR4 の欠損マウスの骨髄マクロファージを用いた実験を行った。その結果、TLR2 欠損マクロファージからは野性型同様、多数の破骨細胞様細胞が形成された。これに対して、TLR4 欠損マクロファージからはほとんど破骨細胞様細胞の形成は起こらなかった。

次に、マウス歯肉溝に pGGT を注入する実験を行った結果、野性型マウスでは顎骨に破骨細胞が誘導され、歯槽骨破壊が生じたが、TLR4 欠損マウスでは変化が起きなかった。

pGGT の刺激により、TLR の下流にある分子群が反応するか調べた。その結果、ERK1/2、p38 MAP kinase、JNK などのリン酸化が確認された。

以上の結果は pGGT が TLR4 を介して破骨細胞形成を誘導していることを強く示唆している。さらにこの結果が正しければ、pGGT-TLR4 シグナルは炎症の惹起にもつながることを意味している。

次に、実際の歯周炎に関与すると考えら

れている細菌の GGT の活性について調べるため、すでに GGT 遺伝子配列が明らかになっている *Toreponema denticola* (td) の遺伝子組み換え型 GGT(tdGGT) を作製して前述の破骨細胞誘導実験を行った。しかし、tdGGT には破骨細胞誘導能は示されなかった。その原因として、tdGGT の遺伝子配列はヒトやピロリ菌の GGT の遺伝子に比べて遺伝子長が極端に短く、相同性も低いことから、GGT タンパク質の立体構造も pGGT などとかなり異なるためと推定された。

次に、歯周炎の主要原因菌である *P. gingivalis* の GGT 遺伝子配列の同定を行うため、ゲノム情報を基にバイオインフォマティックによる探索を試みた。しかしながら、pGGT 遺伝子配列から推定されるモチーフが存在せず、今回の研究では同定に至らなかった。また、*P. gingivalis* の GGT 精製も試みたが、産生量が低く実験に使えるだけの十分な GGT が得られなかった。

以上の成果から、bGGT のうち少なくともピロリ GGT は TLR4 のリガンドとして作用する可能性があることが明らかとなった。その一方で、GGT の精製過程における LPS の混入が懸念された。この問題については pGGT と同じ精製法で作製した tdGGT に破骨細胞形成能がなかったことから LPS の混入が実験を左右するほどの量ではないことを示している。しかしながらこの点は今後十分慎重に実験を行う必要があり、クリアしなければならない問題点である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Tsujio M, Mizorogi T, Kitamura I, Maeda Y, Nishijima K, Kuwahara S, Ohno T, Niida S, Nagaya M, Saito R, Tanaka S: Bone mineral analysis through dual energy X-ray absorptiometry in laboratory animals. **J Veterinary Med Sci** 71: 1493-1497, 2009

Natsume H, Tokuda H, Adachi S, Takai S, Matsushima-N R, Kato K, Minamitani C, Niida S, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Rho-kinase limits FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. **Bone** 46(4):1493-1497, 2010.

Ogi H, Nakano Y, Niida S, Dote K, Hirai Y, Suenari K, Tonouchi Y, Oda N, Makita Y, Ueda S, Kajihara K, Imai K, Sueda T, Chayama K, Kihara Y: Is structural remodeling of fibrillated atria the consequence of tissue hypoxia? **Circulation J** 74(9):1815-1821, 2010.

Murata A, Okuyama K, Sakano S, Kajiki M, Hirata T, Yagita H, Zuniga-Pflucker JC, Miyake

K, Akashi-Takamura S, Moriwaki S, Niida S, Yoshino M, Hayashi S-I: A notch ligand, delta-like 1 functions as an adhesion molecule for mast cells. **J Immunol** 185(7):3905-3912, 2010.

Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, Koyama H, Takeoka M, Sano K, Amano J, Isogai Z, Niida S, Oguri K, Okayama M, McDonald JA, Kimata K, Taniguchi S, Itano N: Hyaluronan deficiency in tumor stroma impair macrophage trafficking and tumor neovascularization. **Cancer Res** 70(18): 7073-7083, 2010.

Into T, Inomata M, Niida S, Murakami Y, Shibata KI: Regulation of MyD88 aggregation and MyD88-dependent signaling pathway by sequestome 1 and histone deacetylase 6. **J Biol Chem**, 285(46):35759-69, 2010

〔学会発表〕(計 7 件)

鈴木恵子, 新飯田俊平, 山田庄司 Toll-like receptor 2 アゴニストによる RANKL-および TNFa-非依存的な破骨細胞誘導 第 26 回日本骨代謝学会 (2008)

川添祐亮, 宮内睦美, 田妻 進, 古庄寿子, 鈴木恵子, 新飯田俊平, 高田 隆 歯肉溝滲出液中 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ値を用いた歯周診断システムの構築の可能性について 第 1 回日本口腔検査学会 (2008)

徳田治彦, 小澤 修, 原田 敦, 細井孝之, 新飯田俊平: Rho-kinase 阻害剤は骨芽細胞においてトランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)による血管内皮細胞増殖因子(VEGF)産生を抑制する. 第 52 回日本老年医学会 (2010)

森脇佐和子, 上西一弘, 徳田治彦, 原田 敦, 濃沼信夫, 新飯田俊平: 骨吸収マーカーを用いた骨粗鬆症一次スクリーニングの検診成績. 第 28 回日本骨代謝学会 (2010)

村松昌, 山本誠士, 森脇佐和子, 本山昇, 徳田治彦, 新飯田俊平: Aging impacts on miRNAs expression in blood. 日本 RNAi 研究会 (2010)

田中伸哉, 森脇佐和子, 上西一弘, 濃沼信夫, 田中清, 池田義孝, 新飯田俊平: 骨粗鬆症スクリーニングにおける尿中 α -GTP の有用性についての検討. 第 16 回埼玉骨粗鬆症研究会 (2010)

山本誠士, 村松昌, Bon-nyeo Koo, 向山洋介, 喜多紗斗美, 岩本隆宏, 東英梨月, 堂本光子, 渡邊泰秀, 小室一成, 大澤毅, 高橋宏行, 高

野健一，生谷尚士，長井良憲，高津聖志，薄井勲，戸邊一之，新飯田俊平，澁谷正史，松田直之，服部裕一：脳微小血管網を構成するペリサイトは造血系細胞由来である。第32回日本分子生物学会年会(2010)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新飯田俊平 (NIIDA SHUMPEI)

(独)国立長寿医療研究センター・室長

研究者番号：10137630

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮内 睦美 (MIYAUCHI MUTSUMI)

広島大学大学院医歯薬総合研究科・准教授

研究者番号：50169265

柴山恵吾 (SHIBAYAMA KEIGO)

国立感染症研究所・部長

研究者番号：50283437