

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592198

研究課題名（和文）歯周病菌の線毛タンパクに局在する機能領域の同定と臨床応用への検討

研究課題名（英文）Identification of functional fimbria domain of periodontopathogen for the clinical application

研究代表者

森崎 市治郎 (MORISAKI ICHIJIRO)

大阪大学・歯学部附属病院・教授

研究者番号：30116115

研究成果の概要（和文）：

歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は宿主細胞のエンドサイトーシス経路を利用し、顕著な細胞侵入性を発揮し、歯周病の慢性化を誘発すると考えられている。本研究では *P. gingivalis* の線毛タンパクの病原性について *P. gingivalis* が宿主細胞に侵入した後の細胞内動態から検討を加え、歯周病の慢性化との関連を調べた。その結果、*P. gingivalis* が歯肉上皮細胞に侵入し、細胞外へ脱出している可能性が示された。また、本菌の細胞外脱出に、GTPaseである Rab11 と RalA、および Exocyst complex が関与していることが示唆された。このことより、*P. gingivalis* が宿主細胞の免疫応答を逃れるため細胞外へ脱出し別細胞へ再感染することで歯周病の慢性化が起こる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Porphyromonas gingivalis, a periodontal pathogen, can enter host periodontal cells via endocytic pathway, which is involved in the disease progression. The present study was performed to elucidate the mechanism of the chronic situation of periodontal diseases in terms of the virulence of fimbriin and of the bacterial intracellular localization. *P. gingivalis* was invaded by gingival epithelial cells and exited to extracellular milieu. This study suggests that the exit of *P. gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by Rab11, RalA, and exocyst complex. It also suggests that *P. gingivalis* can avoid the innate immune response, which can lead to the chronic situation of periodontal diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学，病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫、感染、炎症、歯学、歯周病、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

慢性感染症である歯周病は数種の口腔細菌種による複合感染症といわれており、その中で最も歯周病原性が高いと考えられている

Porphyromonas gingivalis は顕著な宿主細胞侵入性を有している。本菌は歯周病だけにとどまらず、心疾患、糖尿病、早産などの全身疾患に関与していることも明らかになり

つつある。

P. gingivalis が歯周組織の細胞に付着・侵入し歯周病原性を発揮するために必須の菌体表層の線維状構造体が線毛である。線毛は菌種・菌株間の共凝集、体液性・細胞性免疫の誘導、サイトカイン産生の誘導、細胞内情報伝達系の活性化、歯肉線維芽細胞への結合などの機能を発揮する多機能性タンパクであるため、歯周免疫療法・ワクチン開発のターゲット分子とみなされている細菌成分である。

線毛はポリマー構造体であり、337 アミノ酸残基からなる線毛サブユニットタンパク Fimbrillin (FimA) により構成されている。*P. gingivalis* の付着・侵入能の関連について解析を加えるために、菌体表層成分をコートした蛍光ビーズを用い細胞への付着・侵入の解析を行ったところ、顕著な蛍光ビーズの侵入が認められた。

近年、*P. gingivalis* が歯肉上皮細胞に侵入し、細胞内で細胞障害性を発揮しながら歯周病を慢性化させていると推測されている。臨床研究では歯周病患者の歯肉細胞から常に歯周病菌が検出されているが、歯周病菌がどのようにして細胞内で生きながらえ、慢性炎症を進行させているかは全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、*P. gingivalis* の線毛タンパクの病原性発揮ならびに歯周細胞への付着・侵入の関連性を明らかにするため、1型 fimA 株である ATCC33277 株の宿主細胞内侵入経路、および細胞内侵入後の *P. gingivalis* の細胞内動態につき検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* と lytic compartment との関連

歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* に対する免疫応答に、オートファジーがどのように関与するかについて検討した。*P. gingivalis* ATCC 33277 (I型線毛株) の細胞内におけるオートファジーの挙動を経時的に観察した。具体的には、初期エンドソームのマーカースとして、FYVE ドメインのN末端に Enhanced green fluorescent protein (EGFP) を連結させたコンストラクトを歯肉上皮細胞に発現させ、*P. gingivalis* と初期エンドソームとの共局在を共焦点顕微鏡で観察した。

また、オートファゴソーム・マーカースである Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) のN末端に Red fluorescent

protein (RFP) を連結させたコンストラクトを歯肉上皮細胞に発現させた。オートファゴソームは細胞内消化の場であるリソソームと融合することが知られている。そこで、リソソームのマーカースとして

Lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1) を用いた。RFP-LC3 と LAMP1 の発するシグナルの存在を捕らえることで、*P. gingivalis* を内包したオートファゴソームがリソソームと融合すること、また歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* のどの程度の割合が Lytic compartment から逃れるのか、共焦点顕微鏡で観察した。

(2) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出の確認

歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* が細胞外に脱出しているかを Colony formation Unit assay (CFU assay) を用いて計測した。具体的には、*P. gingivalis* を感染させた歯肉上皮細胞の培地に抗生物質を加え細胞外の *P. gingivalis* を殺菌した後、抗生物質を含まない培地に交換し、新たに培養液中に細胞内から脱出した生菌数を測定した。

加えて、Latrunculin A (アクチン骨格重合阻害剤)、Nocodazole (微小管重合阻害剤)、Methyl- β -cyclo-dextrin (M β CD; コレステロール除去剤)、Wortmannin

(Phosphoinositide-3-kinases 阻害)、または Brefeldin A (ゴルジ体輸送阻害) で歯肉上皮細胞を処理し、細胞内および細胞培養液中の生菌数を CFU assay で計測した。

(3) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への Rab11 の関与

P. gingivalis の細胞外脱出にどの細胞内分子が関与するか調べた。具体的には、エンドソームから細胞膜へのリサイクリングを担うリサイクリングエンドソームのマーカースとして、Rab ファミリー GTPase である Rab11 のN末端に mCherry を連結させたコンストラクトを歯肉上皮細胞に発現させ、*P. gingivalis* との共局在を共焦点顕微鏡により経時的に観察した。

さらに、Transferrin receptor (TfR) は初期エンドソームからリサイクリング経路により細胞膜へ再循環される。そこで、*P. gingivalis* がリサイクリングエンドソームに局在することを確認するため、TfR のN末端に EGFP を連結したコンストラクトを歯肉上皮細胞に発現させた。*P. gingivalis*、mCherry-Rab11、そして EGFP-TfR の共局在を共焦点顕微鏡で観察した。

細胞内に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への Rab11 の関与を調べるため、Rab11 の Dominant negative 型 (Rab11^{A25N}) または Constitutive active 型 (Rab11^{Q70L}) を歯肉上皮細胞に発現させ、*P. gingivalis* との共局在を共焦点顕微鏡で観察した。さらに、Rab11 遺伝子の RNAi ノックダウンにより、*P. gingivalis* の細胞内および細胞培養液中の生菌数を CFU assay で計測した。

(4) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への RalA の関与

RalA はアクチン細胞骨格系の再構成を担う Ral GTPase であり、リピッドラフトのリサイクリングへの関与が報告されている。そこで、*P. gingivalis* の細胞外脱出に RalA が関与するか調べた。RalA の N 末端に mCherry を連結させたコンストラクトを歯肉上皮細胞に発現させ、*P. gingivalis* との共局在を共焦点顕微鏡により経時的に観察した。細胞内に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への RalA の関与を調べるため、RalA の Dominant negative 型 (RalA^{A27N}) と Constitutive active 型 (RalA^{Q72L}) を歯肉上皮細胞に発現させ、*P. gingivalis* との共局在を共焦点顕微鏡で観察した。さらに、RalA 遺伝子の RNAi ノックダウンにより、*P. gingivalis* の細胞内および細胞培養液中の生菌数を CFU assay で計測した。

(5) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への exocyst complex の関与

リサイクリング小胞の細胞膜への繫留因子である Exocyst Complex は 8 量体のタンパク質複合体である。エキソサイトシスにより、細胞内の小胞が細胞膜と融合し小胞内容物は細胞外へ遊出する。RalA の下流で Exocyst complex がそのエフェクターとして機能し、リピッドラフトのリサイクリングへの関与が報告されている。

そこで、*P. gingivalis* の細胞外脱出に Exocyst complex が関与するか調べた。具体的には、Exocyst complex の構成分子の 1 つである Sec5、Sec6、および Exo84 遺伝子の RNAi ノックダウンにより、*P. gingivalis* の細胞内および細胞培養液中の生菌数を CFU assay で計測した。

4. 研究成果

(1) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の全ては Lytic compartement へ輸送されない。

感染 1 時間後、歯肉上皮細胞内に侵入した

P. gingivalis の約 70% が EGFP-FYVE と共局在を示し、その局在は経時的に減少した。感染 4 時間後には細胞内の *P. gingivalis* の約半数が RFP-LC3 および LAMP-1 と共局在を示し、約 10% が LAMP-1 のみと共局在を示した。このことから、歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* はまず初期エンドソームに存在し、約 10% の菌はライソソームへ運ばれ、約半数の菌はオートライソソームへ運ばれることが示唆された。これは、ライソソームおよびオートライソソームで分解を受ける *P. gingivalis* がいる一方、リサイクリング経路へとソーティングされる菌がいる可能性を示している。

(2) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* は細胞外に脱出する。

P. gingivalis を感染させた歯肉上皮細胞の培地に抗生剤を加え、細胞外の *P. gingivalis* を殺菌した後、抗生剤を含まない培地に交換し、新たに培養液中に細胞内から脱出した生菌数を測定した結果、*P. gingivalis* の細胞外への脱出が確認された。

加えて、Latrunculin A、Nocodazole、M β CD で歯肉上皮細胞を処理すると、細胞培養液中の生菌数の減少が認められ、Latrunculin A では細胞内の生菌数の増加がみられた。このことより、歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出にアクチン・チューブリンの脱重合、およびリピッドラフトが関与する可能性が示された。

(3) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出に Rab11 が関与する。

感染 1 時間後、歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* の約 35% が mCherry-Rab11 と共局在を示し、その局在は経時的に減少した。このことから、歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* はリサイクリングエンドソームに局在することが示された。

同じく感染 1 時間後、細胞内の *P. gingivalis* の約 70% は EGFP-TfR と共局在を示し、その局在は経時的に減少し、感染 6 時間後には約 35% と変化した。このことから細胞内の *P. gingivalis* はまず初期エンドソームに存在し、リサイクリングエンドソームへソーティングされる可能性が示された。

また、Rab11^{A25N} または Rab11^{Q70L} と *P. gingivalis* との共局在を検討したところ、野生型と比較し Rab11^{A25N} の共局在率は減少した。

さらに Rab11 遺伝子の RNAi ノックダウンにより、*P. gingivalis* の細胞培養液中への脱

出の減少と細胞内の生菌数の増加が認められた。このことから、細胞内に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への Rab11 が関与が示された。

(4) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出に RalA が関与する。

感染 6 時間後、歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* の約 40% が mCherry-RalA と共局在を示し、その局在は経時的に減少した。また、RalA^{A27N} と RalA^{Q72L} と *P. gingivalis* との共局在を検討したところ、野生型と比較し RalA^{A27N} の共局在率は減少した。

さらに、RalA 遺伝子の RNAi ノックダウンにより、*P. gingivalis* の細胞培養液中への脱出の減少と細胞内の生菌数の増加が認められた。このことから、細胞内に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への RalA が関与が示された。

(5) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出に Exocyst complex が関与する。

エキソシスト複合体の 1 つである Sec5、Sec6、および Exo84 遺伝子の RNAi ノックダウンを行ったところ、細胞培養液中の生菌数の減少、並びに細胞内の生菌数の増加がみられた。このことより、細胞内に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への Exocyst complex の関与が示された。

これらの結果より、歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の一部は Rab11 と RalA が制御するリサイクリング経路を利用して細胞外へ脱出することが示された。この脱出にはアクチン・チューブリンの重合・脱重合、リピッドラフトが関与していることが示され、*P. gingivalis* を内含する輸送小胞と細胞膜との融合にはエキソシスト複合体が関与していることが示された。

本研究の結果、歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* は細胞内で分解を受けつつも一部は細胞外に脱出し、さらに近接細胞へ再侵入し、歯周組織の感染拡大を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Takeuchi H, Furuta N, Morisaki I, Amano A. Exit of intracellular *Porphyromonas*

gingivalis from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway, Cellular Microbiology, 査読有, (2011), in press

②Amano A, Takeuchi H, Furuta N. Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions, Microbes and Infection, 査読有, 12, (2010), 791-798

③Furuta N, Takeuchi H, Amano A. Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment, Infection and Immunity, 査読有, 77, (2009), 4761-4770

④Murakami J, Kato T, Kawai S, Akiyama S, Amano A, Morisaki I. Cellular motility of Down syndrome gingival fibroblasts is susceptible to impairment by *Porphyromonas gingivalis* invasion, Journal of Periodontology, 査読有, 79, (2008), 721-727

⑤Amano A, Murakami J, Akiyama S, Morisaki I. Etiologic factors of early-onset periodontal disease in Down syndrome, Japanese Dental Science review, 査読有, 44, (2008), 118-127

[学会発表] (計 5 件)

①竹内洋輝, 古田信道, 天野敦雄. 歯肉上皮細胞へ侵入した *Porphyromonas gingivalis* の細胞外脱出機構の解析, 2010. 11. 1, タワーホール船堀, 東京

②竹内洋輝, 古田信道, 天野敦雄. 歯肉上皮細胞に侵入した *Porphyromonas gingivalis* の細胞外脱出機構の解析, 2010. 9. 21, タワーホール船堀, 東京

③天野敦雄, 竹内洋輝, 古田信道. 宿主細胞への細菌侵入とメンブレントラフィック, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010. 9. 20, タワーホール船堀, 東京

④竹内洋輝, 加藤隆大, 稲葉裕明, 村上旬平, 秋山茂久, 天野敦雄, 森崎市治郎. *Porphyromonas gingivalis* の細胞内動態の解析, 第 26 回日本障害者歯科学会学術大会, 2009. 11. 1, 名古屋国際会議場, 愛知

⑤村上旬平, 竹内洋輝, 堤香奈子, 秋山茂久, 天野敦雄, 森崎市治郎. ダウン症候群歯肉由来細胞における Toll-like receptor 2 の発現, 第 26 回日本障害者歯科学会学術大会, 2009. 11. 1, 名古屋国際会議場, 愛知

[図書] (計 1 件)

- ①森崎市治郎 (日本障害者歯科学会編)
医歯薬出版株式会社, スペシャルニーズ
デンティストリー障害者歯科, (2009),
総 392 ページ
(2-10、91-93、175-203、232-237、251-255
288-293、299-305)

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.osaka-u.ac.jp/~disabl/research/archives.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森崎 市治郎 (MORISAKI ICHIJIRO)
大阪大学・歯学部附属病院・教授
研究者番号: 30116115

(2) 研究分担者

秋山 茂久 (AKIYAMA SHIGEHISA)
大阪大学・歯学部附属病院・准教授
研究者番号: 00283797

村上 旬平 (MURAKAMI JUMPEI)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 70362689

(3) 連携研究者

天野 敦雄 (AMANO ATSUO)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 50193024