

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592432

研究課題名(和文)

細胞内侵入細菌の排除機構の解明とペプチドグリカンを標的とした歯周治療法の開発

研究課題名(英文)

Biological responses that eliminate invasive bacteria in the periodontal cells

研究代表者

金子 高士 (KANEKO TAKASHI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10284697

研究成果の概要(和文)：

歯周病の原因菌は歯肉の上皮細胞内に侵入する能力を有しており、このことが歯肉に炎症を起こすメカニズムの一つと推測されている。本研究では細胞内に侵入した細菌の検知とそれらの排除に重要な役割をもつ NOD と呼ばれる受容体タンパクに着目し、原因菌がこれらによってどのように認識されるのか調べた。その結果、歯周病の原因菌の種類によって、NOD1 および NOD2 の活性化能が異なることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

Some of periodontal pathogens have an ability to invade gingival epithelial cells. This ability is thought as one of the mechanism to induce periodontal inflammation. In the present study, we focus on NOD proteins that have been shown to play an important role on detection and elimination of invasive bacteria, and investigate whether NODs proteins can recognize periodontal pathogens or not. As results, we find both NOD1- and NOD2-stimulatory activities are different by the species of periodontal pathogens.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病原細菌、ペプチドグリカン、NOD1、NOD2、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

Toll 様受容体 (TLR) はペプチドグリカン (PGN)、リポ多糖 (LPS)、フラジェリンや CpG DNA などの細菌に特有な成分を認識し、NF- κ B や MAPK の活性化することにより、炎症性サイトカインや接着分子の発現を誘導する。TLR は細胞膜やエンドソーム膜に発現し、主に細胞外に存在する病原体の検知に寄与し

ている。一方、病原性を示す細菌の特徴の一つに細胞内侵入・増殖能があげられる。細胞内には抗体や補体による体液性免疫による抗菌作用が及ばないため、細胞侵入能は細菌が生存していくうえで有利に働くと思われる。細胞侵入菌のサルモネラ、シゲラ、リステリアなどの病原体はファゴソームから細胞質内への侵入機序、ファゴソームとリゾソ

ームの融合を阻害することが報告されており、このような機序で細胞内侵入した細菌の検知は TLR のみでは困難と推測されてきた。近年、このような細胞内細菌の認識や除去に、細胞内タンパクの Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 様受容体のファミリーが重要な役割をもつことが明らかになってきている。NOD1、NOD2、NAIP5、IPAF、NALP3 がこれらのファミリーに含まれる。NOD1 はグラム陰性菌 PGN 中に存在する iE-meso-DAP を、そして NOD2 はグラム陽性菌陰性菌に共通に認められる構造の muramyl-di-peptide (MDP) を認識し、NF- κ B や MAPK を活性化することにより、炎症性サイトカインや抗菌ペプチドの発現を誘導する。また NOD1 と NOD2 の刺激は TLR2 や TLR4 刺激と協調的に作用して炎症性サイトカインの産生を相乗的に増加させることも報告されている。さらに NOD はオートファジータンパクの ATG16L1 と相互作用することにより、NF- κ B 非依存的にオートファジーを誘導し、細胞質に存在する細菌の排除にすることが示されている。in vivo における細菌感染実験でも NOD1 および NOD2 の欠損マウスは野生型と比較して除菌する能力が減少している。

NOD1 および NOD2 の歯周炎組織における発現は炎症の強さと関連していたことから歯周炎形成への関与が推測されている。歯周病原細菌の中でも、*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* は歯肉上皮細胞や線維芽細胞などの歯周組織細胞中に侵入、増殖することが示されている。さらに *P. gingivalis* や *F. nucleatum* の PGN は NOD1 の認識に必須の meso-DAP がそれぞれ L-L-DAP と meso-Lanthionine に置換されていることが報告されている。そのためこれらの細菌認識そして排除に NOD1 および NOD2 がどのように関与しているかは不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、以下のとおりである。

- (1) NOD1 および NOD2 の歯周病原細菌やそれらの PGN の認識への関与を明らかにする。
- (2) 歯周病原細菌 PGN による NOD1 および NOD2 刺激時の口腔上皮細胞の炎症性反応を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯周病原細菌と PGN の精製

歯周病原細菌として *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* を、そして非歯周病原細菌としてグラム陰性 *Escherichia coli* とグラム陽性 *Aerococcus*

viridans を実験に使用した。凍結乾燥菌体からの不溶性 PGN の精製は通法に従って行った。精製した不溶性 PGN はさらに mutanolysin で処理し、可溶性の PGN (sPGN) を得た。グラム陰性 PGN としての生物学的活性はショウジョウバエマクロファージ、S2*細胞株の抗菌ペプチド dipterin の誘導能を解析することにより確認した。

(2) NOD1 および NOD2 活性化能

ヒト NOD1 および NOD2 を過剰発現させた Human Embryo Kidney (HEK) 293T 細胞を加熱処理菌体および sPGN で刺激した。NOD 刺激による NF- κ B の活性化を、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイで測定することで種々の歯周病原細菌の NOD 活性化能を比較解析した。

(3) sPGN の口腔上皮細胞に及ぼす影響

精製した sPGN でヒト口腔上皮細胞株の HSC-2 細胞を刺激した。IL-8 の産生量を ELISA で測定することにより、歯周病原細菌 sPGN の口腔上皮細胞に及ぼす影響について比較検討した。

4. 研究成果

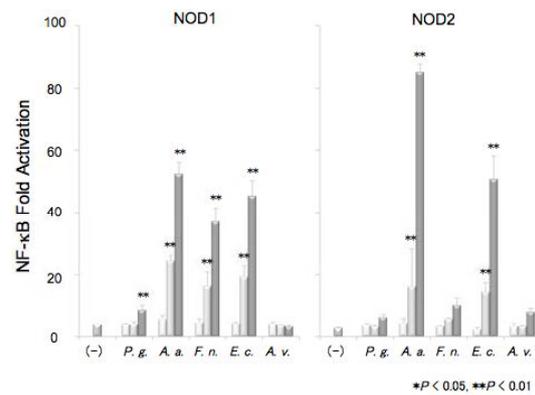


図1 歯周病原細菌加熱処理死菌体のNOD活性化能

図1はNOD1 および NOD2 発現細胞を加熱処理死菌体で刺激した結果を示す。NOD1 発現細胞はグラム陰性菌の中で *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* と *E. coli* が濃度依存的に強い活性を示したが、*P. gingivalis* は 100 μ g/ml まで濃度を上げた時にはじめて活性化がみられた。*A. viridans* は NOD1 を刺激できなかった。

NOD2 発現細胞は *A. actinomycetemcomitans* もしくは *E. coli* 刺激によって NOD2 は濃度依的に活性化されたが、*P. gingivalis*, *F. nucleatum* と *A. viridans* は NOD2 を活性化することができなかった。

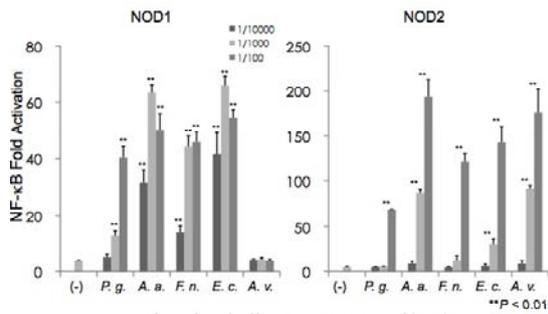


図2 歯周病原細菌sPGNのNOD活性化能

図2はsPGNでNOD1およびNOD2発現細胞を刺激した結果を示す。*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*と*E. coli*はNOD1発現細胞を強く活性化した。*P. gingivalis*はNOD1を活性化できたが、他の歯周病原細菌と比較して、その活性は10-100倍ほど低かった。

また、すべてのsPGNがNOD2発現細胞を刺激することができたが、*P. gingivalis*の活性は弱かった。グラム陽性の*A. viridans*はNOD2のみ活性化した。

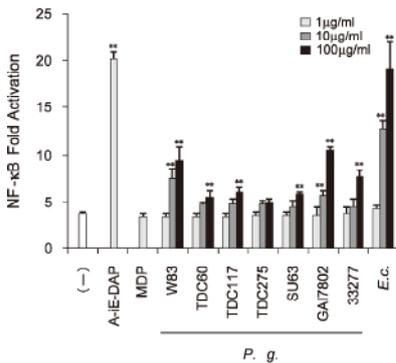


図3 *P. gingivalis* strainのNOD1刺激能

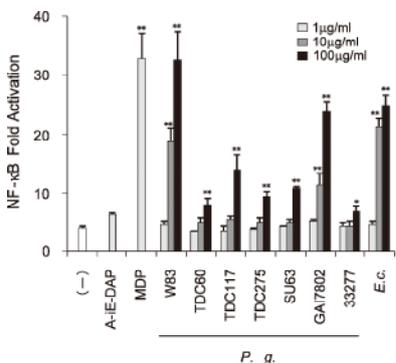


図4 *P. gingivalis* strainのNOD2刺激能

*P. gingivalis*はNOD1, NOD2刺激能が弱いことが明らかになった。そこでこれらの活性は*P. gingivalis*のstrainに共通して認められるのかどうか確認するために、数種類の*P. gingivalis* strain菌体を使ってNOD発現細胞刺激した。NOD1発現細胞では、全ての*P. gingivalis* strainは*E. coli*に比べて弱い傾向を示した(図3)。一方、NOD2発現細胞ではstrainによる活性に差が認められ、W83、GAI7802株が*E. coli*同等の強い活性を示した。他のstrainはそれに比べて活性は弱く100 μg/mlまで濃度を上げて初めて有意な活性を示した(図4)。

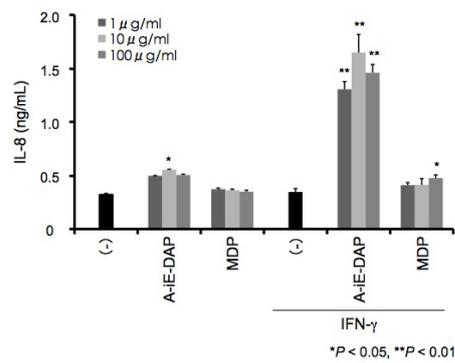


図5 NODリグンドによるHSC-2細胞のIL-8産生

図5は口腔上皮細胞株HSC-2細胞をNODリグンドで刺激した際のIL-8の産生量を示す。A-iE-DAPは10 μg/mlの濃度でIL-8産生を誘導しましたが、MDPは誘導できなかった。IFN-γによる前刺激によってHSC-2細胞のA-iE-DAPに対する反応性は増加した。

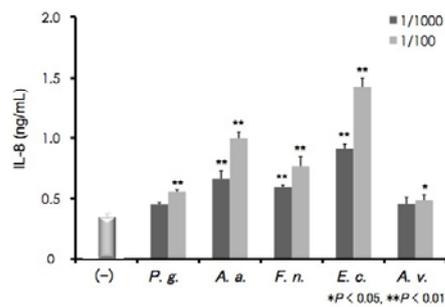


図6 sPGNによるHSC-2細胞のIL-8産生

次に各歯周病原細菌のsPGNでIFN-γ処理HSC-2細胞を刺激した。IL-8の産生量はほぼsPGNのNOD1活性化能と類似した活性を示し、*P. gingivalis* sPGNのIL-8産生能は*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*と比

較して 1/10 以下であった(図 6)。

今回の一連の実験により *P. gingivalis* は NOD1 および NOD2 を強く活性化できないことが明らかになった。*P. gingivalis* LPS は TLR4 の活性化能が弱く、むしろアンタゴニストとして働いているとする過去の報告の結果と考え合わせると *P. gingivalis* のこれらの自然免疫の低刺激特性はこの菌が歯周病局所において生息するうえで有利に働いているかもしれない。

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 10 件)

1. Nakamura H, Fukusaki Y, Yoshimura A, Shiraishi C, Kishimoto M, Kaneko T, Hara Y. Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in C3H/HeJ mice *in vivo*. *Oral Microbiol Immunol*, 23(3): 190-5, 2008.
2. Yoshioka H, Yoshimura A, Kaneko T, Golenbock DT, Hara Y. Analysis of the activity to induce TLR2- and TLR4-mediated stimulation of supragingival plaque. *J Periodontol* 79(5): 920-928, 2008.
3. Yamaguchi M, Ukai T, Kaneko T, Yoshinaga M, Yokoyama M, Ozaki Y, Hara Y. T cells are able to promote lipopolysaccharide-induced bone resorption in mice in the absence of B cells. *J Periodontal Res* 43(5): 549-555, 2008.
4. 中村弘隆、鶴飼孝、吉永泰周、尾崎幸生、金子高士、白石千秋、岸本真実、小野山美穂、阿部嘉裕、安部達也、吉村篤利、原宜興、グリチルレチン酸は LPS 誘導性骨吸収を抑制する。日本歯科保存学雑誌、51(3):323-330, 2008.
5. Yamaguchi R, Yoshimura A, Yoshioka H, Kaneko T, Hara Y. Activity of supragingival plaque to induce Toll-like receptor 4-mediated stimulation is associated with cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *J Periodontol*, 80(3)512-520, 2009.
6. Ozaki Y, Ukai T, Yamaguchi M, Yokoyama M, Haro ER, Yoshimoto M, Kaneko T, Yoshinaga M, Nakamura H, Shiraishi C, Hara Y. Locally administered T cells from mice immunized with lipopolysaccharide (LPS) accelerate LPS-induced bone resorption. *Bone* 44(6)Jun: 1169-1176, 2009.
7. Suzuki AMM, Yoshimura A, Ozaki Y, Kaneko T, Hara Y. Cyclosporin A and phenytoin modulate inflammatory responses. *J Dent Res* 88(12)1131-1136, 2009.
8. Okugawa T, Kaneko T, Yoshimura A, Silverman N, Hara Y. NOD1 and NOD2 Mediate Sensing of Periodontal Pathogens. *J Dent Res* 89(2)186-191, 2010.
9. Li X, Kato N, Mezawa M, Li Z, Wang Z, Yang L, Sasaki Y, Kaneko T, Takai H, Yoshimura A, Ogata Y. Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Cell Biochem* 110(4): 823-833, 2010.
10. 金子高士 歯周組織破壊に導く歯周病原細菌-宿主間相互作用の解明 日歯周誌、53(1):3-12, 2011.

[学会発表] (計 17 件)

1. 奥川剛志、金子高士、吉村篤利、原宜興。歯周病原性細菌の NOD 活性化能に関する研究。第 51 回春季日本歯周病学会春季学術大会。大宮、平成 20 年 4 月 24, 25 日。
2. Suzuki AMM, Yoshimura A, Kaneko T, Hara Y. Effects of Cyclosporin A on TLR-Mediated Responses of Gingival Fibroblasts. 第 51 回春季日本歯周病学会総会、大宮、平成 20 年 4 月 24, 25 日。
3. Li X, Kato N, Maezawa M, Araki S, Kaneko T, Yoshimura A, Ogata Y. *P. gingivalis* lipopolysaccharide regulates bone sialoprotein gene transcription. 日本歯科保存学会 第 128 回春季学術大会、新潟、平成 20 年 6 月 5-6 日。
4. Kaneko T, Okugawa T, Yoshinaga M, Kishimoto M, Yoshimura A, Hara Y. NOD mediates cytoplasmic sensing of periodontal pathogens. 10th Biannual IEIIS Meeting, International Endotoxin and Innate Immunity Society Edinburgh, UK, July 30 - August 2, 2008
5. Kishimoto M, Yoshimura A, Naito M,

Haruyama K, Kaneko T, Nakayama K, Hara Y. Identification of a cell surface component of *Porphyromonas gingivalis* that induces TLR2- and TLR4-independent activation of NF- κ B in CHO cells. 10th Biannual IEIIS Meeting, International Endotoxin and Innate Immunity Society Edinburgh, UK, July 30 - August 2, 2008

6. Yoshimura A, Yoshioka H, Suzuki AMM, Kishimoto M, Kaneko T, Golenbock DT, Hara Y. Analysis of the activity to induce TLR2- and TLR4-mediated stimulation of supragingival and subgingival plaque. 10th Biannual IEIIS Meeting, International Endotoxin and Innate Immunity Society Edinburgh, UK, July 30 - August 2, 2008

7. Suzuki AMM, Yoshimura A, Kaneko T, Kishimoto M, Hara Y. Cyclosporin A modulates TLR-mediated responses in human gingival fibroblasts. 10th Biannual IEIIS Meeting, International Endotoxin and Innate Immunity Society Edinburgh, UK, July 30 - August 2, 2008

8. 吉村篤利, 吉岡英将, 山口竜亮, 金子高士, 原 宜興. 歯肉縁下プラークの Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4 刺激作用と歯周病臨床パラメーターの関連性について. 第 129 回日本歯科保存学会 2008 年度秋季学術大会、富山市富山国際会議場、平成 20 年 11 月 6 日、7 日.

9. Li X, Kato N, Kaneko T, Yoshimura A, Ogata Y, P. gingivalis lipopolysaccharide regulates bone sialoproteins gene transcription, Europerio 6, Stockholm, Sweden, Jun 4-6, 2009.

10. 吉村篤利、山口竜亮、吉岡英将、佐藤佳昌、金子高士、原 宜興、歯肉炎上プラークの TLR4 刺激作用と末梢血単核球からのサイトカイン産生誘導能との関連。第 52 回春季日本歯周病学会学術大会、岡山市岡山コンベンションセンター、平成 21 年 5 月 15 日、16 日.

11. Suzuki AMM, Yoshimura A, Kaneko T, Hara Y, Cyclosporin A and phenytoin differently modulate Toll-Like receptor-mediated responses in human gingival fibroblasts. The 9th World Congress on Inflammation. July 6-10. 2009, Keio plaza hotel, Tokyo.

12. 金子高士、吉村篤利、原 宜興. NOD によ

る歯周病原細菌の認識. 第 131 回日本歯科保存学会 2009 年度秋季学術大会、仙台市仙台国際センター。平成 21 年 10 月 29 日、30 日.

13. 藏本明子, 金子高士, 吉永泰周, 鶴飼 孝, 白石千秋, 岸本真実, 横山美穂, 岸本隆明, 市村育久, 押野一志, 原 宜興. ラット歯肉溝への LPS および抗 LPS IgG の交互滴下によりアタッチメントロスが誘導される 第 53 回春季日本歯周病学会学術大会、盛岡市民文化ホールおよびいわて県情報交流センター (アイーナ)、平成 22 年 5 月 14, 15 日.

14. Kaneko T, Okugawa T, Yoshimura A, Sato K, Hara Y. NOD1 and NOD2 mediate cytoplasmic sensing of periodontal pathogens.

15. Kuramoto A, Yoshinaga Y, Ukai T, Kaneko T, Shiraishi C, Yokoyama M, Sato T, Nagano F, Takamori Y, Hara Y. Immune complex formed in rat gingival sulcus induces attachment loss.

16. Yoshinaga Y, Kuramoto A, Kaneko T, Ukai T, Shiraishi C, Yoshinaga M, Sato T, Nagano F, Hara Y. An experimental model of periodontitis in LPS-Immunized rat.

17. Yoshimura A, Suzuki AMM, Y. Ozaki Y, Sato K, Kaneko T, Hara Y. Cyclosporin A and phenytoin modulate inflammatory responses in gingival fibroblasts.

[その他]

ホームページ等

http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_perio.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 高士 (KANeko TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10284697

(2) 研究分担者

原 宜興 (HARA YOSHITAKA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60159100

吉村 篤利 (YOSHIMURA ATSUTOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70253680