

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592340

研究課題名（和文）SLPI による歯肉上皮細胞の *P. gingivalis* 感染抑制作用研究課題名（英文）Inhibition of *P. gingivalis* infection by the SLPI from gingival epithelial cells

研究代表者

木村 重信（KIMURA SHIGENOBU）

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：10177917

研究成果の概要（和文）：歯肉上皮細胞は口腔における分泌型白血球プロテアーゼインヒビター（SLPI）の主要な産生細胞であること、また、SLPI は *Porphyromonas gingivalis* プロテアーゼに対して阻害活性を示し、歯肉溝での *P. gingivalis* 感染に対する自然免疫として機能していることが示唆された。さらに、歯肉上皮細胞からの SLPI 産生は *P. gingivalis* の感染刺激を通して増強されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The results indicated that gingival epithelial cells could be a substantial producer of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) that functions inhibitory to the pathogenic *Porphyromonas gingivalis* protease in gingival crevices. It was also suggested that the SLPI production could increase in response to *P. gingivalis* through the stimulation with its pathogenic constituents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：SLPI, 歯肉上皮細胞, *P. gingivalis*, 感染抑制

1. 研究開始当初の背景

SLPI（分泌型白血球プロテアーゼインヒビター）は粘膜分泌液中に存在するプロテアーゼ阻害剤であるが、単なるプロテアーゼ阻害剤としての役割にとどまらず、粘膜系での病原微生物に対する感染防御を担う自然免疫として機能する生体因子であることが示唆されている。しかし、その作用機序に関しては依然不明な点が多く、また、口腔における産生細胞、産生誘導機序、口腔自然免疫における機能/役割等については明らかにされて

いない。

2. 研究の目的

本研究では、Hatakeyama, Ohara-Nemoto（本研究の共同研究者）らにより確立された株化歯肉上皮細胞、GE1 細胞を用いて、歯肉上皮細胞が（歯肉溝/歯周ポケットの自然免疫系において）SLPI 産生細胞として十分な機能を有しているかを明らかにする。次に *Porphyromonas gingivalis* による GE1 細胞からの SLPI 産生誘導活性について検討し、*P.*

gingivalis 刺激後の歯肉上皮細胞の SLPI 産生能の反応性変化を捉える。さらに、リコンビナント SLPI を *Escherichia coli* 発現系で発現させ、得られた rSLPI を用いて SLPI の *P. gingivalis* に対する増殖抑制効果とプロテアーゼに対する抑制効果について明らかにする。これらの研究結果より、歯肉溝/歯周ポケットの自然免疫系における歯肉上皮細胞の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) GE1 細胞は、既報に従い、培養 5 日目ごとに継代培養した。GE1 細胞の重層化と SLPI 産生との関連性を検討するため、無刺激および *P. gingivalis* の抗原による刺激後の SLPI 産生誘導実験を行い、至適の前培養時間を決定した。
- 2) *P. gingivalis* ATCC 33277 株を用いて通法に従い凍結乾燥全菌体 (Pg-WC) を得た。*P. gingivalis* LPS (Pg-LPS) は、その凍結乾燥全菌体より、Hot phenol-water 抽出法を 2 度繰り返して行い、分離、精製した。*E. coli* 由来の LPS は市販の *E. coli* 0128:B12 株由来の LPS を、再度、Hot phenol-water 抽出法を用いて精製し、実験に供した (Ec-LPS)。
P. gingivalis 菌体外プロテアーゼ画分は既報に従い、透析膜上培養から調製した。
- 3) GE1 細胞の SLPI 産生能は、無刺激状態の GE1 細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いた SLPI mRNA 発現増強から解析した。抗原としては、Pg-WC、Pg-LPS あるいは Ec-LPS を用い、さらに、*P. gingivalis* 刺激後の炎症性サイトカイン mRNA 発現についても測定し、SLPI 産生誘導との関連性について解析した。
- 4) *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼに対する SLPI の阻害活性は市販のヒトリコンビナント SLPI を用いて、MCA 合成基質 (Bz-Arg-MCA および Z-His-Glu-Lys-MCA) に対する加水分解活性を指標に検討した。

4. 研究成果

- 1) 無刺激状態での GE1 細胞の SLPI 産生および Pg-LPS 刺激による SLPI 産生誘導：
GE1 細胞は無刺激で SLPI mRNA の弱い発現を示したが、Pg-LPS および Pg-WC 刺激によりその発現が著明に増強したことから、歯肉上皮細胞は無刺激で SLPI を産生しているものの、*P. gingivalis* の付着/刺激により反応性に増強されることが明らかとなった (図 1)。
- 2) *P. gingivalis* 抗原による GE1 細胞からの炎症性サイトカイン産生誘導
Pg-LPS 刺激により炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β および IL-6) の産生も誘導された (図 1)。しかし、炎症性サイトカインおよび SLPI の産生誘導がともに刺激後

6-12 時間で観察されたことから、Pg-LPS による GE1 細胞からの SLPI 産生誘導は産生されたサイトカイン (IL-6) による二次的なものではないことが強く示唆された。

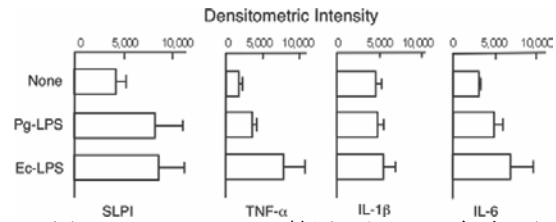


図 1 *P. gingivalis* 抗原による GE1 細胞からの SLPI および炎症性サイトカイン産生誘導

- 3) *P. gingivalis* のプロテアーゼに対する作用

P. gingivalis のプロテアーゼに対する作用は、Bz-Arg-MCA を基質とした場合には阻害効果は認められなかったが、Z-His-Glu-Lys-MCA を基質とした場合には強い阻害/抑制効果が認められたことから、SLPI は *P. gingivalis* の主要プロテアーゼの一つである Lys-gingipain に対して強い抑制効果を示すことが示唆された。

以上の成績より、歯肉上皮細胞は無刺激で SLPI を産生しているものの、*P. gingivalis* の付着/刺激により反応性に増強されることが明らかとなった。また、SLPI は、*P. gingivalis* の病原特異性を担うビルレンス因子の一つである Lys-gingipain に対する抑制効果を示したことから、歯肉上皮細胞の自然免疫による *P. gingivalis* 感染制御機構に重要な役割を演じていることが強く示唆された。

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 15 件)

1. Taira, M., Shimoyama, Y., Kagiya, T., Sasaki, M., Nezu, T., Harada, H. and Kimura, S.: Proteome analyses of human macrophages exposed to low cytotoxic IC90 copper (2+) ions. Dent. Mater. J., 30, 293-299, (2011)
2. Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Kimura, S., Kon, A., Haraga, H., Ono, T. and Nemoto, T. K.: Asp- and Glu-specific novel dipeptidyl peptidase 11 of *Porphyromonas gingivalis* that ensures utilization of proteinoous energy sources. J. Biol. Chem., 286, 38115-38127, (2011)
3. Taira, M., Kagiya, T., Sasaki, M. and Kimura, S.: Quantitative real-time

- RT-PCR analyses of DNA-damage-recovery-related gene expressions of mouse macrophage-like cell line RAW264 when exposed to IC₅₀ nickel ions. *Nano Biomed.*, 3, 294-299, (2011)
5. Taira, M., Kagiya, T., Harada, H., Sasaki, M., Kimura, S., Narushima T., Nezu, T. and Araki, Y.: Microscopic observations and inflammatory cytokine productions of human macrophage phagocytising submicron titanium particles. *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 21, 267-275, (2010)
 6. Ono, T., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Okawara, H., Kobayakawa, T., Baba, T. T., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Amino acid residues modulating the activities of staphylococcal glutamyl endopeptidases. *Biol. Chem.*, 391, 1221-1232, (2010)
 7. Kishi, M., Ohara-Nemoto, Y., Takahashi, M., Kishi, K., Kimura, S. and Yonemitsu, M.: Relationship between oral status and prevalence of periodontopathic bacteria on the tongues of elderly individuals. *J. Med. Microbiol.*, 59, 1354-1359, (2010)
 8. Saitoh, S., Sasaki, K., Nezu, T., Taira, M., Shimoyama, Y., Sasaki, M., Kimura, S. and Ishizeki, K.: Histological and TEM observation of subcutaneous tissues exposed to particulate copper, nickel and titanium. *J. Oral Tissue Engin.*, 8, 102-106, (2010)
 9. Nemoto, T. K., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Ohara-Nemoto, Y.: Determination of three amino acids that caused the alteration of proteolytic activities of staphylococcal glutamyl endopeptidases. *Biol. Chem.*, 390, 277-285, (2009)
 10. Kishi, M., Abe, A., Kishi, K., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S. and Yonemitsu, M.: Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of mutans streptococci in plaque in their 2.5-year-old children. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 37, 241-249, (2009)
 11. Ichinohe, N., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Kimura, S. and Ichinohe, S.: Effects of fosfomycin on Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: quantification of copy numbers of Shiga toxin genes and their expression levels using real-time PCR. *J. Med. Microbiol.*, 58(Pt 7), 971-973, (2009)
 12. Taira, M., Nezu, T., Sasaki, M., Kimura, S., Kagiya, T., Harada, H., Narushima T. and Araki, Y.: Gene expression analyses of human macrophage phagocytizing sub- μ titanium particles by allergy DNA chip (Genopal™). *Biomed. Mater. Eng.* 19, 63-70, (2009)
 13. Taira, M., Sasaki, M., Sasaki, K., Saitoh, S., Nezu, T., Kimura, S. and Araki, Y.: DNA microarray analyses of the effects of LPS-stimulation and IC₅₀ nickel ions on gene expressions of mouse macrophage-like cell line RAW264. *Nano Biomed.*, 1, 59-69, (2009)
 14. Taira, M., Kagiya, T., Sasaki, M., Sasaki, K., Saitoh, S., Nezu, T., Harada, H., Kimura, S. and Araki, Y.: First-stage genome-wide gene expression analyses of human mesenchymal stem cells exposed to IC50 Ni (2+) ions. *J. Oral Tissue Engin.*, 7, 107-120, (2009)
 15. Taira, M., Sasaki, M., Kimura, S. and Araki, Y.: Characterization of aerosols and fine particles produced in dentistry and their health risk assessments. *Nano Biomed.*, 1, 9-15, (2009)
- [学会発表] (計 12 件)
1. Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Fibronectin binding activity of *Streptococcus anginosus* promotes the adherence to mucosal epithelial cells. 4th International Symposium for Interface Oral Health Science. Sendai, Japan. March (2011)
 2. Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S. M. A., Shimoyama, Y., Kimura, S., Ono, T. and Nemoto, T. K.: Auto-catalytic propeptide processing facilitates the final hetero-catalytic maturation of glutamyl endopeptidase GluV8. 111th General Meeting of the American Society for Microbiology. New Orleans, USA. May (2011)
 3. Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Fbp62, fibronectin binding protein of *Streptococcus anginosus* involves the virulence in mouse infection. 10th World Congress of Inflammation. Paris, France. June (2011)
 4. Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Agato, S. and Kimura, S.: The pathogenic involvement of the fibronectin binding

- protein, Fbp62, in *Streptococcus anginosus* infection. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011). Sapporo, Japan. September (2011)
5. 根本孝幸, 小野俊雄, 下山 佑, 木村重信, 根本優子: *Porphyromonas gingivalis* DPP11 の酵素活性と Asp/Glu 特異性を規定する Arg670. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 10 月, 岐阜 (2011)
 6. 根本優子, 下山 佑, 木村重信, 根本孝幸: *Porphyromonas* 属菌が産生する Asp/Glu 特異的新規ジペプチジルペプチダーゼ (DPP) 11. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 10 月, 岐阜 (2011)
 7. Kodama, Y., Sasaki, M., Shimoyama, Y., Tajika, S. and Kimura, S.: Adhesion mechanism of *Streptococcus anginosus* to mucosal epithelial cells. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria. April (2010)
 8. Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S.M.A., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T.K.: Structural chemistry of *Staphylococcus aureus* glutamyl endopeptidase. 88th General Session & Exhibition of the IADR. Barcelona, Spain. July (2010)
 9. Ishikawa, T., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Sasaki, M. and Kimura, S.: SLPI production from gingival epithelial cells against *Porphyromonas gingivalis* infection. 88th General Session & Exhibition of the IADR. Barcelona, Spain. July (2010)
 10. Otake-Asakawa, A., Kimura, S., Asakawa, T. and Tanaka, M.: Maternal transmission of mutans and other oral streptococcal species. 88th General Session & Exhibition of the IADR. Barcelona, Spain. July (2010)
 11. Kishi, M., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S., Aizawa, F., Kishi, K., Takahashi, M. and Yonemitsu, M.: Prediction of colonization of periodontopathogens in plaque by VSC measurement. 88th General Session & Exhibition of the IADR. Barcelona, Spain. July (2010)
 12. Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Three amino acid residues define the proteolytic activities of *Staphylococcal* Glu-specific proteases. 109th General Meeting of the American Society for Microbiology. Philadelphia, USA. May (2009)

[図書] (計 1 件)

1. Ishikawa, T., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Sasaki, M. and Kimura, S.: The production of secretory leukocyte protease inhibitor from gingival epithelial cells in response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides. *In* Interface Oral Health Science 2009 (T. Sasano, et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 275-276, (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ :
<http://hitech-d.iwate-med.ac.jp/micr/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 重信 (KIMURA SHIGENOBU)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 10177917

(2) 研究分担者

根本 優子 (OHARA-NEMOTO YUKO)
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号 : 10164667

(3) 連携研究者

佐々木 実 (SASAKI MINORU)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号 : 40187133

下山 佑 (SHIMOYAMA YU)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：90453331