

機関番号 : 33703

研究種目 : 研究活動スタート支援

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21890275

研究課題名 (和文) マトリックス中の毛細血管様ネットワークを応用した歯周病原細菌の病原性の究明

研究課題名 (英文) Investigation of pathological effects of periodontopathic bacteria on endothelial cells forming capillary-like tube networks

研究代表者

猪俣 恵 (INOMATA MEGUMI)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号 : 40553798

研究成果の概要 (和文) : 近年、歯周病原細菌の歯周組織に及ぼす影響が、歯周病のみならず全身の健康に悪影響を及ぼすことが分かってきた。これに従い本研究では、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) を歯周組織に感染させその影響を詳細に調べることを目的とした。Pg 死菌および菌体成分は、Pg 生菌に比べ、強力に宿主細胞を賦活化することが分かった。Pg 生菌は宿主の免疫機構を回避して組織中に潜伏し続け、何らかの理由で殺傷された際に細胞を賦活化することが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Recently, it has been reported that proinflammatory responses of host cells to periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* (Pg) affect not only periodontal functions but also general health. This study therefore investigated the responses of host cells to Pg. Intriguingly, dead Pg cells, but not live cells, had cell-stimulating activity. In addition, Pg components, including LPS, lipid A, and fimbriae also activated cell responses. These results suggested that live Pg cells can evade from host recognition and invade into host cells to conceal themselves. Furthermore, live Pg cells killed by several in-host factors may activate proinflammatory responses of host cells.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野 : 口腔細菌学、歯周病学

科研費の分科・細目 : 病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード : 歯周病原細菌, *Porphyromonas gingivalis*, LPS, 歯周組織由来細胞, 血管内皮細胞, LL-37

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周組織由来細胞の歯周病原細菌に対する細胞応答が、口腔領域だけでなく全身に波及し、歯周病のみならず全身の健康に悪影響を及ぼすことが明らかにされてきている。これに従い、歯周病原細菌の存在が歯周組織にどのような影響を及ぼすのか理解を深めることが今後の基礎研究課題の一つと

して重要な位置を占めると考えられる。

2. 研究の目的

本研究計画では、歯周病原細菌の感染が毛細血管様構造を呈する血管内皮細胞や歯周組織由来の細胞にどのような影響を及ぼすのかを詳細に究明することを目的とした。

研究を開始するにあたりまず歯周病原細菌

菌として、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) に着目した。一方歯周組織由来の細胞としてまず、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に着目し、Pg の HGF に対する感染性と影響を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Pg 菌体ならびに Pg 菌体由来成分

Pg 菌株として、FDC381 株を使用した。Pg は CFU を計測しておき、定量的に実験に供試できるように準備した。熱処理した Pg は、95°C で 5 分間処理した Pg を用いた。Pg 由来の LPS は ATCC33277 株、フェノール水抽出物 (PWE) は FDC381 株より分離精製した。

(2) 抗菌ペプチド LL-37 およびその他の試薬

LL-37 およびその他阻害剤などの試薬類は、市販品を実験に用いた。

(3) Pg 感染時における HGF の炎症性サイトカインの検出

HGF に一定数の Pg を 24 時間感染させた。炎症性サイトカイン量のタンパク質レベルでの検出は、細胞培養上清中の Interleukin (IL)-8 および IL-6 量を ELISA によって定量することで行った。炎症性サイトカイン量の遺伝子レベルでの検出は、*IL6*、*IL8* ならびに *CXCL10* mRNA 量を定量的 PCR によって測定することで行った。

(4) Pg 感染時における HGF の mitogen-activated protein kinases (MAPK) のリン酸化の検出

Pg 感染時における HGF の MAPK のリン酸化の検出は、一定数の Pg を 24 時間感染させた細胞溶解液を用い、ウェスタンブロッティングにより p38、ERK1/2 や JNK1/2 のリン酸化を検出することで行った。加えてその相対量をデンストメトリーで解析した。

(5) Pg 感染時における HGF の *CAMP* mRNA の検出

Pg 感染時における HGF の *CAMP* mRNA は、HGF に Pg を 24 時間作用させ、定量的 PCR にて検出した。この際、無刺激の歯肉上皮細胞株 (HSC-2 ならびに HO-1-u-1) をコントロールとした。

4. 研究成果

(1) まず Pg の HGF に対する感染性と影響を調べるため、HGF に Pg 生菌を 24 時間感染させた。HGF は Pg 生菌感染に対して IL-8 を産生しなかった (図 1A)。一方で HGF は、熱処理を加えた Pg 死菌に対して IL-8 を産生した (図 1A)。加えて HGF は、Pg 菌体から精製したフェノール水抽出物 (PWE)、LPS、lipid A や線毛に対して *IL8* mRNA を産生した (図 1B)。

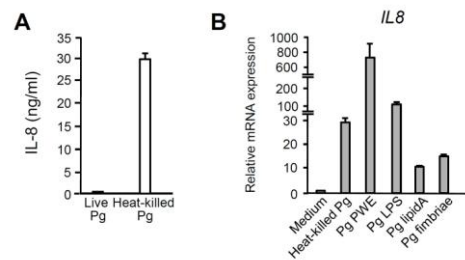


図1 歯周組織由来細胞のPgおよびPg菌体成分に対する応答

(2) 図1の結果より、Pg 生菌および熱処理を加えた Pg 死菌の両者ともが LPS などの菌体構成成分を有しているにも関わらず、HGF 賦活化能の有無に違いがあることが分かった。このことから Pg 死菌のみに HGF 賦活化能が認められた理由として、Pg は熱によって殺傷された場合にその表層構造が崩壊し、細胞壁中に隠れていた構成成分が露出したことで HGF の応答を活性化したことが推測された。そこで歯肉溝の主要な抗菌ペプチドである LL-37 に着目し、生理的な Pg の殺傷を目的として LL-37 の存在下で Pg を HGF に感染させた。その結果予想外に、LL-37 の存在下ならびに非存在下において、HGF の Pg 生菌に対する IL-8 の産生に変化は認めなかった (図 2A)。一方で、HGF の Pg 死菌に対する IL-8 ならびに IL-6 の産生は、LL-37 の存在下で LL-37 の濃度依存的に抑制された (図 2A-C)。

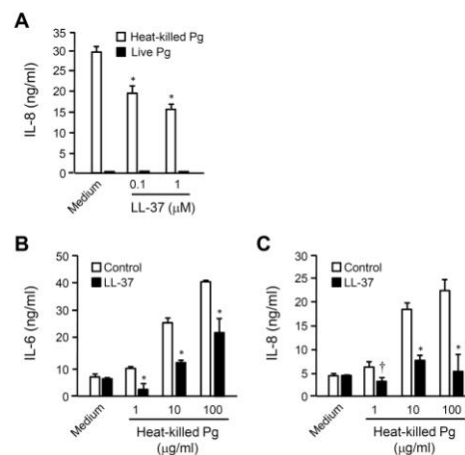


図2 LL-37存在下・非存在下における歯周組織由来細胞のPgに対する応答

(3) 次に LL-37 が Pg 由来構成成分に対する HGF の応答にも抑制的に働くのかどうかを調べた。LL-37 の存在下あるいは非存在下で Pg 由来 LPS、フェノール水抽出物、lipid A や線毛を作用させた。LL-37 の非存在下では Pg 由来成分は *IL6*、*IL8* ならびに *CXCL10* の発現を誘導したが、LL-37 の存在下ではこれらの発現の誘導が抑制された (図 3A-C)。

これまでの結果より、Pg 生菌は、LL-37 の殺傷を受けず熱処理や他の宿主因子によって殺傷された場合にその表層構造が崩壊し、

細胞壁中に隠れていた構成成分が露出することで HGF の応答を活性化することが考えられた。さらにその細胞活性化は、LL-37 によって抑制されることが示唆された。

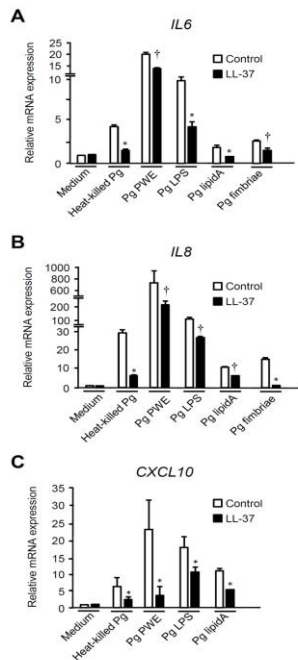


図3 LL-37存在下・非存在下における歯周組織由来細胞のPg菌体成分に対する応答

(4) 現在までに HGF において、Pg ならびにその構成成分が MAPK を活性化することが報告されている。そこで LL-37 が Pg LPS による MAPK の活性化に影響を及ぼすかどうかを調べた。LL-37 の存在下あるいは非存在下で HGF に Pg LPS を作用させ、リン酸化 p38、ERK や JNK をウェスタンブロット法で検出し、その相対量をデンストメトリーで解析した。Pg LPS は p38 (10 - 60 min) ならびに ERK (10 min) のリン酸化を誘導した(図 4)。一方、Pg LPS による JNK のリン酸化誘導は認められなかった (data not shown)、この理由として JNK の発現が弱い (図 4) ことが考えられる。LL-37 は Pg LPS による p38 のリン酸化 (10 ならびに 30 min) および ERK のリン酸化 (10 min) を抑制した (図 4)。LL-37 単独でも、ERK のリン酸化を誘導した (30 ならびに 60 min) (図 4)。ゆえに LL-37 は、Pg 構成成分の誘導する細胞内シグナル伝達を抑制していることが示唆された。

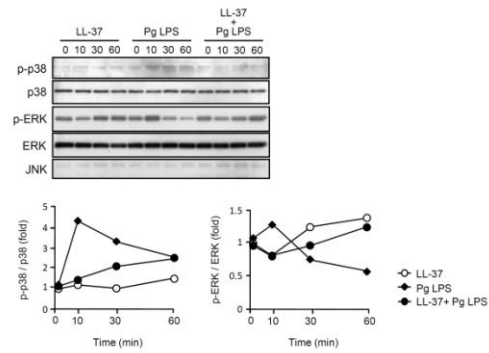


図4 歯周組織由来細胞のPg LPSに対するMAPK活性化に及ぼすLL-37の影響

(5) 現在までに LL-37 は、好中球や上皮細胞で発現していることが報告されている。そこで HGF において LL-37 が発現しているかどうかを調べた。HGF に LL-37 の存在下あるいは非存在下で Pg を 24 時間作用させ、CAMP mRNA の発現を定量的 PCR にて調べた。この際、無刺激の歯肉上皮細胞株 (HSC-2 ならびに HO-1-u-1) をコントロールとした。LL-37 は歯肉上皮細胞では恒常的に発現していたが、HGF では Pg 刺激の有無に関わらず発現は見られなかった (図 5)。以上から、歯肉上皮細胞から産生された LL-37 が歯周組織においてパラクライン的に Pg の細胞賦活作用を抑制することが考えられた。

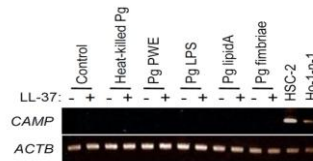


図5 歯周組織由来細胞におけるLL-37の発現

(6) (1)~(5)の実験結果より、Pg の HGF における感染性ならびに影響の詳細が分かった。さらに LL-37 の歯周組織由来細胞における抗炎症作用が明らかになった。そこで、LL-37 による HGF の応答抑制機構にはどのようなメカニズムが関与しているのかをさらに検討した。最近、LL-37 にはオートファジー誘導能があることが明らかにされた。オートファジーとは、自己の不要なタンパク質や細胞内に侵入した細菌を分解・排除する細胞生存機構ならびに感染防御機構として知られている。そこで LL-37 による HGF の炎症応答抑制機構にはオートファジーが関与していると推測し、オートファジー阻害剤の存在下あるいは非存在下で LPS ならびに LL-37 を作用させた。その結果、オートファジー阻害剤の非存在下では LL-37 による NF- κ B 活性化抑制効果が認められたが、オートファジー阻害剤の存在下では LL-37 による NF- κ B 活性化抑制効果が有意に抑制された (図 6)。この結果から、HGF における LL-37 の応答抑制機構は、オー

トファジーに依存的に発揮されることが示唆された。

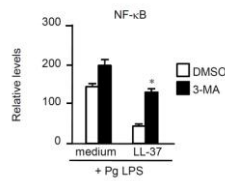


図6 LL-37による歯周組織由来細胞の応答抑制機構に及ぼすオートファジーの影響

本研究の遂行によって得られた結果より、Pg 感染が歯周組織由来細胞に与える影響や歯周組織由来細胞における LL-37 の役割が明らかになった。HGF は細菌感染に対する炎症応答を終息する能力が欠如していることが報告されているため、LL-37 は HGF の Pg 死菌に対する炎症応答の鎮静化に重要な役割を果たすことが考えられた。一方、Pg 感染は LL-37 の存在下においても HGF の応答を惹起しなかったことから、LL-37 は Pg の殺傷能力を欠如しており、歯周組織に存在する他の因子によって殺傷された場合に細胞活性化を誘導することが示唆された。あるいは、Pg 生菌は歯周組織細胞を活性化せず、免疫機構を回避して組織中で潜伏し続ける可能性も示唆された。

本研究ではまず歯周病原細菌として、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) に着目した。一方、歯周組織由来の細胞としてまず HGF に着目した。本研究計画の遂行によって HGF における Pg の感染性について興味深い結果を比較的早く得られ始めることができ、さらに研究を進めることができたため、歯周組織での LL-37 の役割が明らかになったと考える。今後の研究では、本研究で得られた HGF における現象が血管内皮細胞においても見られるのかどうかを本研究計画をベースにして計画的に検討する予定である。また、このような研究をさらに発展させることで、歯周病原細菌が我々宿主に及ぼす影響を詳細に調べていきたいと考える。

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 1 件)

Inomata Megumi, Into Takeshi, Murakami Yoshitaka, Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 induced by *Porphyromonas gingivalis* cells and extracts in human gingival fibroblasts., European Journal of Oral Sciences, 2010, 118, 574-581. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

①猪俣 恵、引頭 毅、村上幸孝、ヒト歯肉線維芽細胞の *Porphyromonas gingivalis* に対する応答における LL-37 の影響、第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010 年 9 月 21 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪俣 恵 (INOMATA MEGUMI)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：40553798

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：