

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25年4月12日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592086

研究課題名（和文）歯周病における上皮細胞の病態解析

研究課題名（英文）Pathological analysis of epithelial cells in periodontitis

研究代表者：

福間 裕 (FUKUMA YUTAKA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教務職員

研究者番号：50253688

研究成果の概要（和文）：歯周病は、細菌感染による歯肉上皮細胞の破綻とそれに続く免疫担当細胞によって引き起こされる疾患である。しかし、上皮細胞の病態解析は免疫担当細胞の解析に比べ、殆ど行われていない。本研究では、ヒトのカテプシンCとLystと呼ばれるリソソーム機能に異常をきたすと、重度の歯周病を引き起こすことに着目した。カテプシンCノックアウトマウスおよびLyst遺伝子に変異があるベージュマウスを使用して、歯周病性細菌を感染させて、上皮細胞に関する生理学的・病理学的役割について解明を目指した。

研究成果の概要（英文）：Periodontitis is a bacterial infectious disease that destroys gingival epithelial cells, and develops inflammation of immune-related cells. However, pathological studies on epithelial cells in periodontitis have been less frequently performed compared to those of immune-related cells. In this study, we focused on lysosomal abnormalities, because gene mutants of lysosomal proteins such as cathepsin C and Lyst causes severe periodontal diseases in human. Therefore, we analyzed epithelial cells in cathepsin C deficient mice and Lyst mutant mice (beige mouse) infected by *Porphyromonas gingivalis*, a major periodontal pathogen, in order to clear the physiological and pathological roles of epithelial cells in periodontitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：歯周病、上皮細胞、リソソーム

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は口腔内の大部分を構成することにより、感染などの多様なストレスを遮蔽し、生体防御に寄与している。従って、口腔疾患

の大部分は上皮細胞の機能破綻によって惹起されると言っても過言ではない。口腔内を構成する扁平上皮細胞は主に角化を特徴としており、同細胞は皮膚表皮を構成する細胞と同

じであり、角化性上皮細胞である。この上皮細胞の機能維持にリソソーム機能が重要な役割を果たす事が分かってきた。

リソソームに存在するプロテアーゼはカテプシン群と呼ばれている。特に、カテプシンCはヒトにおいて遺伝子変異を来とし、酵素活性が減少すると、Papillon-Lefevre 症候群、あるいは Haim-Munk 症候群と呼ばれる疾患を発症する。この疾患は上皮の角化異常により、重度の歯周病を呈し、同時に皮膚特に手掌や足底の角化異常を惹起する。

一方、Chediak-Higashi 症候群はリソソーム輸送タンパク質が異常であり、リソソームが巨大化する免疫不全症である。好中球やマクロファージなどの食細胞の数的減少、遊走能低下、殺菌能の低下などを引き起こす。Chediak-Higashi 症候群のモデルマウスは、ベージュマウス (beige mouse) と呼ばれ Chediak-Higashi 症候群と同じ LYST 遺伝子に変異を起こしている自然発症マウスである。しかし、本マウスの歯肉上皮細胞の詳細な解析の報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、カテプシンC欠損マウスとベージュマウスを用いて、歯周病原性細菌を口腔内投与したときに、どのように歯肉上皮細胞とその内部の免疫担当細胞が変化を起こすのかを精査する。そのために、野生型マウスの同細胞と比較する実験を試みた。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス、カテプシンC-KOマウス、およびベージュマウスについて肉眼的変化を比較精査した。さらに歯周病原性細菌 *P. gingivalis* を (1×10^9 CFU) 口腔内に感染させた後、病理組織学的解析を行った。加えて、3種のマウスに関する比較を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色で、炎症反応によ

るものが腫瘍増殖による変化の有無について検討を行った。

(2) その後、特に変化の著しかった免疫担当細胞に焦点を当て、3種のマウスのマクロファージの食食能に関して、比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* 感染後の野生型、カテプシンC欠損、ベージュマウスの歯肉上皮の病理組織像

図1には *P. gingivalis* (1×10^9 CFU) 感染後の口腔内上皮細胞における、野生型マウス、カテプシンC-KOマウス、およびベージュマウスの病理組織学的解析像を示す。

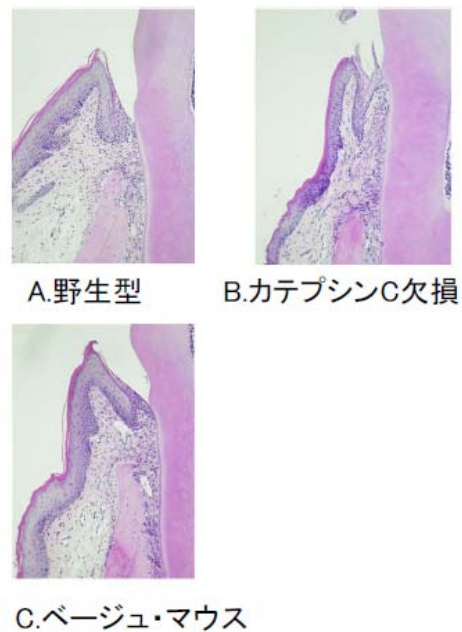


図1：*P. gingivalis* 感染後の歯肉上皮組織

P. gingivalis 投与後の野生型マウスでは適度な炎症像を示した (図1A)。このような条件で、カテプシンC欠損マウスでは、野生型に比べて著しい炎症細胞の浸潤が認められた (図1B)。しかしながら予想に反して、上皮細胞の肥厚は野生型マウスよりも軽度であり、骨吸収の程度も軽度であった (図1B)。一方、ベージュマウスでは、野生型と同じか

やや肥厚した上皮細胞像と顕著な炎症細胞の浸潤が認められた (図 1C)。骨吸収は野生型と同程であった。

現在、さらに激しい炎症を惹起する感染条件で両マウスの病理組織像が異なるかどうかを検討している。

(2) *P. gingivalis* に対する野生型およびベージュマウスのマクロファージの機能

歯肉上皮細胞での個体レベルでの変化が、免疫細胞について顕著であったため、*P. gingivalis* に関するマクロファージの機能に関する実験を行った。

まず初めに、マウスの腹腔からマクロファージを取り出し、Lysotracker で蛍光顕微鏡にて観察を行った。図 2 に示すように野生型マウス由来マクロファージは細胞質全体にリソソームが点在する蛍光顕微鏡像を示した。これに対して、ベージュマウス由来マクロファージでは、核周囲に巨大化したリソソームが凝集していることが確認された。

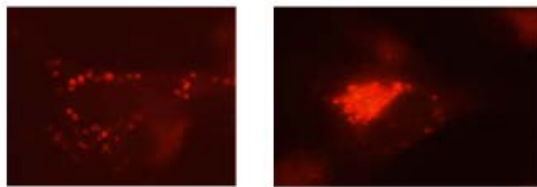


図 2 : 野生型 MΦ

ベージュ MΦ

次に、*P. gingivalis* について殺菌能について検討した。MOI を 10 (1 細胞当たり菌の播種を 10) で設定し、30 分インキュベーションさせ、その後 6 時間まで測定したところ、予想通りベージュマウス由来マクロファージでは殺菌能が低下していることが明らかになった。

以上 *in vivo* および *in vitro* の結果から、重度の歯周病を呈するモデルマウスであるカテプシン C 欠損マウスあるいはベージュマ

ウスにおいて、歯肉上皮細胞と免疫担当細胞の *P. gingivalis* に対して激しい炎症反応とそれに対応するように免疫担当細胞での殺菌能の低下が示された。

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 14 件)

1. Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K: The receptor potential of frog taste cells in response to cold and warm stimuli. *Chem Senses*. Jul; 35(6): 491-499, 2010
2. Kawakubo T, Yasukochi A, Okamoto K, Okamoto Y, Nakamura S, Yamamoto K: The role of cathepsin E in terminal differentiation of keratinocytes. *Biol. Chem. Apr*; 392(6): 571-585, 2011
3. Yukitake H, Naito M, Sato K, Shoji M, Ohara N, Yoshimura M, Sakai E, Nakayama K: Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol*. Mar; 55(3): 141-153, 2011
4. Ikeda H, Sumita Y, Ikeda M, Ikeda H, Okumura T, Sakai E, Nishimura M, Asahina I: Engineering bone formation from human dental pulp- and periodontal ligament-derived cells. *Ann Biomed Eng*. 39(1): 26-34, 2011
5. Yamamoto K, Kawakubo T, Yasukochi A, Tsukuba T: Emerging roles of cathepsin E in host defense mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 1824, 105-112, 2012
6. Okamoto K, Okamoto Y, Kawakubo T, Iwata J, Yasuda Y, Tsukuba T, Yamamoto K.: Role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the murine cathepsin E gene. *J Biochem*. 151, 263-272. 2012
7. Sakai E, Shimada-Sugawara M, Nishishita K, Fukuma Y, Naito M, Okamoto K, Nakayama K, Tsukuba T: Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. *J Cell Biochem*. 113, 486-498. 2012
8. Tsukuba T, Okamoto K, and Yamamoto K.: Cathepsin E is critical for proper trafficking of cell surface proteins *J Oral Biosci*. 54, 48-53, 2012
9. Narahara S, Matsushima H, Sakai E, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Genetic backgrounds and redox conditions influence morphological characteristics and cell differentiation of osteoclasts in mice. *Cell Tissue Res*. 348, 81-94, 2012
10. Fumimoto R, Sakai E, Yamaguchi Y,

- Sakamoto H, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: The Coffee Diterpene Kahweol Prevents Osteoclastogenesis via Impairment of NFATc1 Expression and Blocking of Erk Phosphorylation. *J Pharmacol Sci.* 118(4), 479-486, 2012
11. Sakamoto H, Sakai E, Fumimoto R, Yamaguchi Y, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Deltamethrin inhibits osteoclast differentiation via regulation of heme oxygenase-1 and NFATc1. *Toxicol. in Vitro*, 26, 817-822, 2011
 12. Nishishita K, Sakai E, Okamoto K, Tsukuba T: Structural and phylogenetic comparison of napsin genes: The duplication, loss of function and human-specific pseudogenization of napsin B. *Gene*. 2013 Apr 1;517(2):147-57.
 13. Yamaguchi Y, Sakai E, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Inhibitory effects of tert-butylhydroquinone on osteoclast differentiation via up-regulation of heme oxygenase-1 and down-regulation of HMGB1 release and NFATc1 expression. *J Appl Toxicol.* 2013 in press
 14. Sakai E, Shimada-Sugawara M, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, and Tsukuba T: Fisetin inhibits osteoclastogenesis through prevention of RANKL-induced ROS production by Nrf2-mediated up-regulation of phase II antioxidant enzymes. *J. Pharmacol. Sci.*, in press 2013
- [学会発表] (計 28 件)
1. Takayuki Tsukuba, Michiyo Yanagawa, Tomoko Kadowaki, Yoshiko Okamoto, Kuniaki Okamoto, Kenji Yamamoto: Autophagy impairment associated with increased aberrant mitochondria and oxidative stress in cathepsin E-deficient macrophage 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 2010
 2. Kuniaki Okamoto, Yoshiko Okamoto, Tomoyo Kawakubo, Kenji Yamamoto, Takayuki Tsukuba: Transcription factor Sp1 regulates the expression of the murine cathepsin E gene in gastric adenocarcinoma cells, 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 2009
 3. 筑波隆幸, 岡元邦彰: カテプシン群によるメンブレントラフィックへの影響, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, シンポジウム 松戸, 9 月 2010
 4. 西下一久, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: アスパラギン酸プロテアーゼナプシンの比較遺伝学的分析と生化学的解析, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 松戸, 9 月, 2010
 5. 坂井詠子, 嶋田めぐみ, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 中山浩次, 筑波隆幸: HO-1 は HMGB1 の遊離を抑制し破骨細胞形成を阻害する, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 松戸, 9 月, 2010
 6. 榎原 峻, 松島春菜, 坂井詠子, 筑波隆幸: RANKL 誘導性破骨細胞分化における遺伝子型の影響, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 松戸, 9 月, 2010
 7. 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 福間裕, 坂元 裕, 文元玲子, 山口 優, 山本健二, 筑波隆幸: カテプシン E 欠損における破骨細胞分化への影響, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12 月 2010
 8. 坂井詠子, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: HO-1 の発現誘導は RANKL を介した HMGB1 の細胞外遊離と破骨細胞分化を阻害する, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12 月, 2010
 9. Eiko Sakai, Megumi Shimada, Kazuhiisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto and Takayuki Tsukuba: Receptor activator of NF- κ B ligand dependent heme oxygenase-1 suppression is required for high mobility group box 1 release, caspase-3 activation, and subsequent

- osteoclastogenesis. 第 84 回日本薬理学会, 横浜, 3月, 2011
10. Reiko Fumimoto, Hiroshi Sakamoto, Yu Yamaguchi, Eiko Sakai, Kuniaki Okamoto and Takayuki Tsukuba: Nrf2 activators inhibit osteoclastogenesis induced by receptor activator of NF- κ B ligand. 第 84 回日本薬理学会, 横浜, 3月, 2011
 11. 文元玲子, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Kahweol の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of Kahweol on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 9-10月, 2011
 12. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: *tert*-Butylhydroquinone の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of *tert*-Butylhydroquinone on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 9-10月, 2011
 13. 坂元裕, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Deltamethrin の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of deltamethrin on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 9-10月, 2011
 14. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 福岡裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: RANKL 依存的な HO-1 発現抑制は HMGB1 の遊離に必要である (Suppression of RANKL-dependent HO-1 is required for HMGB1 release.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 9-10月, 2011
 15. 西下一久, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: アスパラギン酸プロテアーゼナプシン A およびナプシン B の生化学的解析 (Biochemical analyses of napsin A and napsin B), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 9-10月, 2011
 16. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 福岡裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞分化における RANKL 依存的な HO-1 発現抑制の役割, 第 64 回日本薬理学会西南部会, 福岡, 11月, 2011
 17. 菅原めぐみ, 坂井詠子, 西下一久, 福岡裕, 岡元邦彰, 吉田教明, 筑波隆幸: フェチンによる破骨細胞分化抑制作用, 第 64 回日本薬理学会西南部会, 福岡, 11月, 2011
 18. Kenji Yamamoto, Tomoyo Kawakubo, Atsushi Yasukouchi, and Takayuki Tsukuba: Cathepsin E-induced growth arrest and apoptosis of cancer cells and the related signaling. 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月 (シンポジウム)
 19. Kuniaki Okamoto, Yoshiko Okamoto, Eiko Sakai, Kazuhisa Nishishita, Kenji Yamamoto, and Takayuki Tsukuba: Identification of two transcripts and in vivo promoter analysis for cathepsin E. 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月
 20. Takayuki Tsukuba, Tomoko Kadowaki, Kuniaki Okamoto, Kenji Yamamoto: Accumulation of NADPH oxidase (NOX2) and increased oxidative stress in cathepsin E-deficient macrophages. 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月
 21. Eiko Sakai, Megumi Sugawara, Kazuhisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto and Takayuki Tsukuba: Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for Receptor activator of NF- κ B ligand

- dependentsuppression is required for high mobility group box 1 and osteoclastogenesis. 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月
22. Megumi Sugawara, Eiko Sakai, Kazuhisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto, Noriaki Yoshida and Takayuki Tsukuba: Fisetin prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月
23. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 福間 裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Fisetin の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 2012 年 9 月
24. 福間 裕, 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Cafestol の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 福島, 2012 年 9 月
25. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 福間 裕, 西下一久, 岩竹真弓, 米嶋枝里香, 岡元邦彰, 筑波隆幸: フィセチンは RANKL を介した ROS の産生と NFATc1 の発現を抑制することで破骨細胞分化を阻害する, 第 85 回日本生化学会大会合同大会, 福岡, 2012 年 12 月
26. 岡元邦彰, 岩田淳一, 坂井詠子, 西下一久, 山本健二, 筑波隆幸: p53 はカテプシン E 遺伝子の発現を制御する, 第 85 回日本生化学会大会合同大会, 福岡, 2012 年 12 月
27. Erika Yoneshima, Kuniaki Okamoto, Eiko Sakai, Noriaki Yoshida, and Takayuki Tsukuba: Up-regulation mechanisms of endosomal/lysosomal proteins during osteoblast differentiation 第 86 回日本薬理学会,

福岡, 2013 年 3 月

28. Fukuma Yutaka, Sakai Eiko, Sugawara Megumi, Erika Yoneshima, Nishishita Kazuhisa, Okamoto Kuniaki, and Tsukuba Takayuki: Cafestol prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation 第 86 回日本薬理学会, 福岡, 2013 年 3 月

[図書] (計 1 件)

筑波 隆幸 (14、25 章 執筆)、岡元邦彰 (16 章、20 章 執筆)、(加藤有三、篠田壽 監修、大谷啓一、鈴木邦明、戸苅彰史編)、医歯薬出版、現代歯科薬理学 第 5 版、2012 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福間 裕 (FUKUMA YUTAKA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教務職員
研究者番号: 50253688

(2) 研究分担者

筑波 隆幸 (TSUKUBA TAKAYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号: 30264055

岡元 邦彰 (OKAMOTO KUNIAKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号: 10311846

西下 一久 (NISHISHITA KAZUHISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号: 20237697

坂井 詠子 (SAKAI EIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号: 10176612