

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792102

研究課題名(和文) 歯周病菌 サイトメガロウイルス重複感染モデルによる早産誘発機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the premature birth-induced mechanism by the periodontal disease bacteria - cytomegalovirus superinfection model

研究代表者

稲葉 裕明 (Inaba, Hiroaki)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70359850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* のヒト胎盤栄養膜細胞への感染は、ATR/Chk2/p53のDNA傷害シグナル伝達経路とERK1/2-Ets1の複数経路を介して、G1期細胞周期停止とアポトーシスが促進された。さらに、*P. gingivalis*の感染は、p53の活性化を抑制するMDM2がジンジパインにより特異的に分解されることにより、p53の蓄積が亢進し、G1期細胞周期停止およびアポトーシスが促進されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：P. gingivalis activates ERK1/2-Ets1 and the cellular DNA damage signaling pathways that act through an ATR/Chk2/p53-dependent pathway to cause G1 arrest and apoptosis in human trophoblast cells. Furthermore, P. gingivalis gingipain proteases degrade MDM2, which is the p53 degradation-related protein, thus contributing to p53 accumulation, G1 phase cell cycle arrest and apoptosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：P. gingivalis 早産 シグナル伝達 アポトーシス 細胞周期

### 1. 研究開始当初の背景

米国では低出生体重児のうち 12%に早産の出生が認められ、乳幼児の死亡率や疾病率と関連していることが明らかになっている。また早産・低体重出生児の 20.4%、超未熟児のうち 40%に前期破水が見られ、胎盤の絨毛羊膜炎が原因とされている。大腸菌の尿路感染、サルモネラ菌、リステリア菌やサイトメガロウイルスによる胎盤への感染が原因の 1 つであり、妊娠中における細菌感染は大きな問題となっている。

近年、歯周病は低出生体重児や早産の原因の一つとされ、罹患している場合、低出生体重児が出生する割合は健常者よりも約 5 倍と報告されている。実際にヒト胎盤組織や羊水から歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* が検出され、妊娠動物モデルに *P. gingivalis* が感染すると、羊水や胎盤から菌の検出を認め、低体重出生や胎児吸収が観察された。*in vitro* モデルでは、*P. gingivalis* の付着侵入が胎盤栄養膜細胞株の細胞周期に影響をおよぼし、アポトーシスの誘発により細胞死に至るが明らかになった。これらのことから、*P. gingivalis* は早産・低出生体重児を誘発する原因菌の 1 つであることが示唆されている。一方、サイトメガロウイルスは日本人成人の約 90%が感染していると言われていたが、近年、ウイルス未感染の妊婦が急増している。未感染の妊婦に初感染が起ると、胎児の早産や低体重出生を増加するだけでなく、神経学的に障害を残すことが知られている。*P. gingivalis* とサイトメガロウイルスは、侵襲性歯周炎患者で非常に関連性があり、重複感染した場合、オッズ比 51.4 倍と他の歯周病細菌との関連よりも群を抜いている。

以上のことから、*P. gingivalis* とサイトメガロウイルスに重複感染された胎盤栄養膜細胞の機能調節の一端を明らかにするため、*P. gingivalis* 感染に起因する早産・低出生の病因解明を明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究は、*P. gingivalis* に感染したヒト胎盤栄養膜細胞で傷害されるアポトーシスならびに細胞周期について分子レベルにおいて検討を行い、*P. gingivalis* とサイトメガロウイルスに重複感染されたヒト胎盤栄養膜細胞の機能調節の一端を明らかにするための分子を探索する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用した細胞株と菌株

*P. gingivalis* 33277 株 (野生株)、*P. gingivalis* ジンジパイン変異株である KDP136 株 ( $\Delta rgpArgpBkqp$ ) および線毛欠損株 KDP150 株 ( $\Delta fimA$ ) を使用する。ヒト胎盤栄養膜細胞株 (HTR-8/SVneo) はカナダ・クイーンズ大学 Charles Graham 博士より供与された。

(2) 成熟線毛保有ジンジパイン欠損株の作成 KDP150 株を培養し、培養上清を採取する。0.22  $\mu\text{m}$  フィルターにより濾過された培養上清を用いて KDP136 株を培養する。作成された菌株の線毛ならびにジンジパインの活性の有無を確認する。

(3) DNA 損傷に対する細胞応答を制御するシグナル伝達経路

HTR-8 細胞に *P. gingivalis* 野生株および (2) で作成した変異株を感染する。ウェスタンブロッティングにより p53、Fas、ATR、ATM、Chk1、Chk2、MDM2、ERK1/2、Ets1、Ets2、p16、p21 のリン酸化等を確認する。

(4) 阻害剤と RNA 干渉法による発現抑制

(3) で得られた結果をもとに、ATR を阻害剤、Ets1 および p53 を RNA 干渉法により発現を抑制する。これらの細胞に *P. gingivalis* 野生株を感染し、ウェスタンブロッティングでシグナル伝達経路の解析を行う。

(5) 細胞周期計測

*P. gingivalis* 感染細胞をエタロールで固定し、ヨウ化プロピジウムによる核染色を行う。その後、試料細胞に含まれる G1 期、G2/M 期、S 期細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いて測定する。

(6) アポトーシス計測

*P. gingivalis* 感染細胞をアネキシン V とヨウ化プロピジウムを用いて染色を行い、フローサイトメトリー解析を行う。

(7) カスパーゼ 3 活性計測

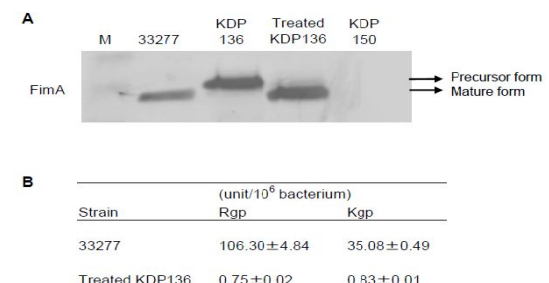
*P. gingivalis* 感染細胞のカスパーゼ 3 活性は、caspase 3/CPP32 colorimetric assay kit を用いて比色定量を行う。

(8) 細菌付着侵入実験

HTR-8 細胞に *P. gingivalis* 野生株および (2) で作成した株を MO1100 あるいは 200 の割合で 2 時間感染し、付着侵入を計測する。

### 4. 研究成果

(1) 成熟線毛保有ジンジパイン欠損株の作成



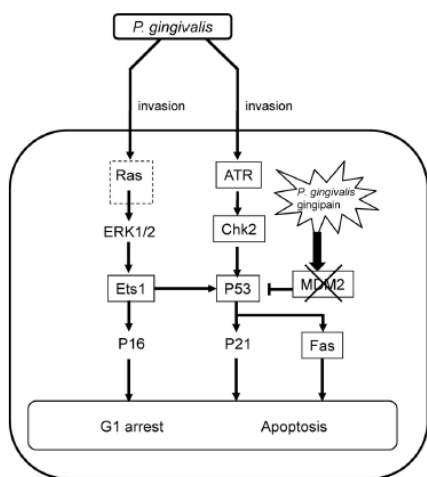
KDP150 株培養上清を用いて、KDP136 株を培

養し、ジンジパイン活性をもたない、成熟線毛保有 *P. gingivalis* 株を作成した。線毛の成熟度 (A) およびジンジパイン活性 (B) を上図に示す。

(2) *P. gingivalis* 野生株感染による DNA 損傷シグナル伝達機構、細胞周期停止とアポトーシスの解析

シグナル伝達の模式図に下に示す。*P. gingivalis* 野生株に感染したヒト胎盤栄養膜細胞は、DNA 損傷シグナル伝達経路である ATR/Chk2/p53 を介して Fas および p21 の発現増加が亢進され、G1 期細胞周期停止およびアポトーシスを促進することが明らかになった。ATR/Chk2/p53 経路が G1 期細胞周期停止およびアポトーシスに参与することは、ATR 阻害剤および siRNA で p53 をノックダウンすることにより証明された。

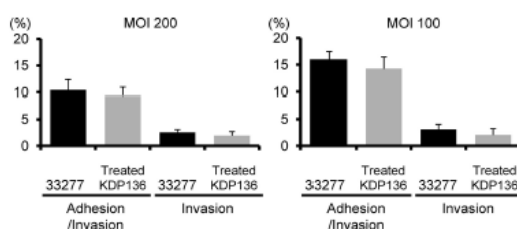
DNA 損傷シグナルの活性と同時に、ERK1/2-Ets1 経路も活性化された。興味深いことに ERK1/2-Ets1 経路は p53/p21・Fas 経路の活性化に影響をおよぼすと共に、Ets1 の下流に存在する、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p16 の発現を亢進させ、G1 期細胞周期停止およびアポトーシスを促進することが明らかになった。また Ets1 の G1 期細胞周期停止およびアポトーシスに対する影響は、siRNA で Ets1 をノックダウンすることにより証明された。



(3) *P. gingivalis* 成熟線毛保有ジンジパイン欠損株感染による DNA 損傷シグナル伝達機構、細胞周期停止とアポトーシスの解析

*P. gingivalis* 成熟線毛保有ジンジパイン欠損株はヒト胎盤栄養膜細胞への付着侵入は、右段上図で示すように、野生株と同様に付着侵入をすることが明らかになった。

そこで、同菌に感染したヒト胎盤栄養膜細胞のシグナル伝達経路を明らかにするためウェスタンブロッティングで解析を行った。野



性株と同様に、ATR/Chk2/p53 ならびに ERK1/2-Ets1 が活性化された。しかしながら、p53 の活性化を抑制する MDM2 のみがジンジパインにより特異的に分解されることが明らかになった。また、成熟線毛保有ジンジパイン欠損株感染したヒト胎盤栄養膜細胞は、DNA 損傷シグナル伝達経路と ERK1/2-Ets1 経路が活性化されるものの、G1 期細胞周期停止およびアポトーシスが抑制されることが明らかになった。

*P. gingivalis* の感染により MDM2 がジンジパインにより特異的に分解されることにより p53 の蓄積が亢進し、G1 期細胞周期停止およびアポトーシスが促進されることが明らかになった。しかしサイトメガロウイルスとの共感染においてのターゲットとして、MDM2 の解析を現在も引き続き検討している。

#### 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 6 件)

1. Inaba H, Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, Morisaki I, Lamont RJ, Amano A, *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation, Cellular Microbiology, 査読有り, 16 巻 1 号, 2014, pp131-145, doi: 10.1111/cmi.12211
2. Yamasaki Y, Nomura R, Nakano K, Inaba H, Kuboniwa M, Shirai M, Kato Y, Murakami M, Naka S, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T, Amano A, Asai F, Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gulae* carrying a new fimA genotype, Veterinary Microbiology, 査読有り, 161 巻 1-2 号, 2012, pp196-205, doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.026.
3. Inaba H, Kuboniwa M, Sugita H, Lamont RJ, Amano A. Identification of signaling pathways mediating cell cycle arrest and apoptosis induced by *Porphyromonas gingivalis* in human trophoblasts, Infection and Immunity, 査読有り, 80 巻 8 号, 2012, pp2847-2857, doi: 10.1128/IAI.00258-12.

4. Moffatt C, Inaba H, Hirano T, Lamont RJ, *Porphyromonas gingivalis* SerB mediated dephosphorylation of host cell cofilin modulates invasion efficiency, *Cellular Microbiology*, 査読有り, 14 巻 1 号, 2012, pp 577-588, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01743.x.
5. Inaba H, Tagashira M, Kanda T, Amano A, Proliferation of smooth muscle cells stimulated by *Porphyromonas gingivalis* is inhibited by apple polyphenol, *Journal of Periodontology*, 査読有り, 82 巻 11 号, 2011, pp1616-1622, doi: 10.1902/jop.2011.100785.
6. Nakano K, Wada K, Nomura R, Nemoto H, Inaba H, Kojima A, Naka S, Hokamura K, Mukai T, Nakajima A, Umemura K, Kamisaki Y, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T, Characterization of aortic aneurysms in cardiovascular disease patients harboring *Porphyromonas gingivalis*, *Oral disease*, 査読有り, 17 巻 4 号, 2011, pp370-378, doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01759.x.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 稲葉裕明, *P. gingivalis* 感染と全身疾患を結ぶ分子基盤の探索, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月, 東京
2. Inaba H, Amano A, *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral cancer through MMP9 activation, 10th World Congress on Preventive Dentistry, 2013 年 10 月, ハンガリー・ブダペスト
3. 久保庭雅恵, Alghamdi Samar, 稲葉裕明, 橋野恵衣, 天野敦雄, 歯肉上皮細胞由来ポリアミンが *Porphyromonas gingivalis* の病原性に及ぼす影響, 第 62 回口腔衛生学会・総会, 2013 年 5 月, 長野・松本
4. 稲葉裕明, 久保庭雅恵, 天野敦雄, *Porphyromonas gingivalis* 感染がヒト口腔癌細胞の浸潤能に及ぼす影響, 第 62 回口腔衛生学会・総会, 2013 年 5 月, 長野・松本
5. Inaba H, Kuboniwa M, Amano A, Multiple pathways regulate apoptosis induced by periodontal pathogen in trophoblast, 第 60 回 JADR, 2012 年 12 月, 新潟

6. 稲葉裕明, 久保庭雅恵, 天野敦雄, ヒト胎盤栄養膜細胞における *P. gingivalis* 感染が DNA 損傷シグナルに及ぼす影響, 第 54 回歯科基礎医学会総会, 2012 年 9 月, 福島・郡山
7. 杉田英之, 稲葉裕明, 天野敦雄, 森崎市治郎, 歯肉上皮細胞 p53 タンパクへの *Porphyromonas gingivalis* 感染の影響, 第 28 回日本障害者歯科学会総会, 2011 年 11 月, 福岡
8. Inaba H, Kuboniwa M, Sugita H, Amano A, Multiple signalling pathways are involved in apoptosis and cell cycle arrest induced by periodontal pathogen in human trophoblast, 第 3 回 EMBO meeting, 2011 年 9 月, オーストリア・ウィーン

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

稲葉 裕明 (INABA Hiroaki)

大阪大学大学院・歯学研究科・助教

研究者番号：70359850

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：