

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592817

研究課題名(和文)炎症性骨破壊における歯周病菌由来酵素ジンジパインの作用機序解明

研究課題名(英文)The role of lysine-specific gingipain in inflammatory bone loss in periodontitis.

## 研究代表者

宮本 洋一 (Miyamoto, Yoichi)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：20295132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病はPorphyromonas gingivalis等の感染による慢性炎症性疾患で、歯槽骨の吸収を特徴とする。同菌が産生するリシン特異的ジンジパイン(Kgp)の骨破壊における役割を解析した。KgpはTNF- $\alpha$ とIL-1による破骨細胞分化を促進した。これらのサイトカインは、破骨細胞分化抑制因子であるOPGに比べ、Kgpによる分解に対して安定だった。KgpによるOPGの分解断片はRANKL結合能を失っており、そのN末アミノ酸配列解析から、death domain類似領域を優先的に分解されることが明らかとなった。今回の結果は、タンパク質分解が破骨細胞分化を制御することを示している。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a chronic inflammatory disease accompanied by alveolar bone loss. Porphyromonas gingivalis, which plays a key role in the etiology of periodontitis, produces cysteine proteases called gingipains. Gingipains are classified into two groups based on their cleavage site specificity, i.e., Rgp and Kgp. We found that osteoclast differentiation induced by inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 in co-cultures of mouse osteoblasts and bone marrow cells, whereas RgpB had no effect on osteoclast differentiation under the same experimental conditions. Osteoprotegerin (OPG), a protein that negatively regulates osteoclast differentiation, was degraded by Kgp. Kgp primarily cleaved death-domain-like region of OPG; the fragments containing RANKL-binding domain lost its binding capacity to RANKL. Our data suggests that degradation of OPG by Kgp is a crucial event in the progression of osteolysis in periodontitis.

研究分野：生化学

キーワード：歯周病 破骨細胞 プロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は、*Porphyromonas gingivalis* などの細菌感染によって発症する慢性炎症性疾患で、歯槽骨吸収を伴う。*P. gingivalis* はジンジパインと総称される一群のシステイン・プロテアーゼを産生する。ジンジパインは基質分解部位から Arg ジンジパイン (RgpA および RgpB) と Lys ジンジパイン (Kgp) に分類される。我々は Kgp が、破骨細胞分化抑制因子であるオステオプロテグリン (OPG) を分解することで、LPS などの TLR リガンドや活性型ビタミン D によって誘導される破骨細胞分化を促進することを明らかにした ( , )。これまで破骨細胞の分化・活性化の調節における RANKL/OPG の遺伝子発現比の重要性が強調されて来たが、我々の発見は、プロテアーゼによる RANKL/OPG 比の変化の重要性を示唆するものである。

(2) 歯周病では、歯周病原菌由来の LPS の他、宿主細胞が産生する IL-1 や TNF- $\alpha$ 、IL-17A などの炎症性サイトカインが骨芽細胞における RANKL の発現を誘導することによって ( - ) あるいは RANKL 比依存的に ( ) 破骨細胞分化を誘導する。ジンジパインあるいは *P. gingivalis* がこれらのサイトカインを分解・不活性化することが知られている ( - )。これは、*P. gingivalis* 感染病巣でジンジパインがこれらのサイトカインを分解することで破骨細胞分化を抑制する可能性があることを示唆するものであった。

(3) 骨芽細胞膜上に発現し破骨細胞分化を誘導する RANKL およびその受容体で破骨細胞前駆細胞膜上に発現する RANK がジンジパインによってどのような影響を受けるか全く報告がなかった。

(4) Kgp による OPG の分解・不活性化の機序が明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

(1) ジンジパインは、OPG のみならず、炎症性サイトカインを分解・不活性化すると考えられる。また、これらのサイトカインによって発現が誘導される RANKL および破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の細胞膜上に存在する RANK も Kgp による分解を受ける可能性がある。そこで本研究では、IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-17A による破骨細胞分化にジンジパインがどのような影響を及ぼすかをマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いて解析した。

(2) (1) で得られた結果を考察するために、Kgp による OPG、IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-17A、RANKL および RANK の分解を比較解析した。

(3) Kgp による OPG の分解の重要性を明らかにするために、OPG 遺伝子欠損マウスの骨芽細胞および骨髄細胞の共存培養系における炎症性サイトカイン依存性の破骨細胞分化に対する Kgp の影響を解析した。

(4) Kgp による OPG の分解・不活性化メカニズムを明らかにするために、OPG の分解位置の同定を試みた。

(5) Kgp による断片化が OPG の RANKL 結合能に及ぼす影響を明らかにした。

## 3. 研究の方法

(1) ジンジパイン: Kgp および RgpB は *P. gingivalis* 培養上清から精製し、使用直前にシステインおよびカルシウムイオンによる再活性化を行った ( )。

(2) マウス骨芽細胞および骨髄細胞の共存培養を用いた破骨細胞分化の評価: 野生型マウスあるいは OPG 遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞および骨髄細胞を用いた。骨芽細胞は生後 1 日齢のマウス頭頂骨より分離した。骨髄細胞は 6 週齢マウスの大腿骨および脛骨から採取した。384 穴培養プレートに  $1.25 \times 10^3$  の骨芽細胞と  $2.5 \times 10^4$  の骨髄細胞を 10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 MEM (50  $\mu$ L) で培養した。IL-1、TNF- $\alpha$  あるいは IL-17A および Kgp あるいは RgpB は培養液に添加した。形成された破骨細胞を酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 活性染色し、細胞数を計測した。

(3) Kgp による OPG、IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-17A の分解: 10%FBS を含む MEM に OPG、IL-1、TNF- $\alpha$  あるいは IL-17A と Kgp を加え、37 $^{\circ}$ C でインキュベーションし、経時的に一部を分取し、直ちにメルカプトエタノールおよび SDS にて変性させた。還元条件下に SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) にて分離後、OPG、IL-1、TNF- $\alpha$  あるいは IL-17A に対する特異抗体を用いて Western blotting を行った。バンドの強度を定量することで、Kgp によるこれらのタンパク質の分解を定量的に評価した。

(4) Kgp による RANKL、RANK の分解: マウス骨芽細胞を 10 nmol/L の活性型ビタミン D<sub>3</sub> で刺激し、RANKL 発現を誘導した後、培地 (10%FBS 含有) に Kgp を添加し、経時的に細胞を溶解した。また、マウス骨髄マクロファージを 10%FBS 存在下に培養し、Kgp を添加後、経時的に細胞を溶解した。それぞれの細胞溶解液について抗 RANKL 抗体および抗 RANK 抗体を用いた Western blotting を行い、Kgp による RANKL および RANK の分解を解析した。

(5) Kgp による OPG の切断部位の同定 : OPG (0.5 nmol) と Kgp (2 pmol) を Hanks 液中でインキュベーションし、反応液を SDS-PAGE にて分離後、PVDF 膜に転写し、CBB 染色した。37kDa 付近の主要なバンドおよび 17kDa 付近のバンドを切り出し、そこに含まれるペプチド断片の N 末アミノ酸配列をエドマン法で分析した。

(6) 蛍光ラベル OPG およびその断片の骨芽細胞への結合 : (5) の実験で Kgp によって生じる OPG の主要な分解断片が OPG の N 末断片であることが判明した。そこで、OPG と FITC を pH 8.0 で反応させることで、OPG の N 末を優先的に蛍光ラベルした。蛍光ラベル OPG (F-OPG) および Kgp 処理した F-OPG を活性型ビタミン D<sub>3</sub> 刺激した骨芽細胞培養系に添加し、蛍光顕微鏡下に F-OPG および F-OPG 断片の骨芽細胞への結合を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) Kgp による IL-1 および TNF- による破骨細胞分化の促進と IL-17A による破骨細胞分化の抑制 : 10 ng/mL の IL-1 、 TNF- および IL-17A は、骨芽細胞・骨髄細胞共存培養系における破骨細胞分化を促進した。50 nmol/L の Kgp は IL-1 および TNF- による破骨細胞分化を有意に促進した。一方、IL-17A によって誘導される破骨細胞分化は Kgp によって抑制された。RgpB は、IL-1 、 TNF- あるいは IL-17A によって誘導される破骨細胞分化に影響を及ぼさなかった。

(2) Kgp による OPG、IL-1 、 TNF- 、 IL-17A の分解効率の違い : Kgp による OPG、IL-1 、 TNF- 、 IL-17A の 10% 血清存在下における分解の時間依存性および Kgp の濃度依存性を比較した。OPG は速やかに Kgp によって分解された。IL-1 および TNF- は OPG に比較し、Kgp による分解に対して抵抗性をしめしたが、IL-17A は OPG 以上に Kgp によって速やかに分解された。(1) で得られた結果は、Kgp は、OPG に比較し Kgp による分解を受けにくいサイトカインによる破骨細胞分化を促進し、OPG と同等あるいはそれ以上に Kgp によって分解されやすいサイトカインによる破骨細胞分化は Kgp により抑制されたと考えられる。

(3) Kgp 存在下での RANKL および RANK タンパク質の安定性 : 細胞膜に発現している RANKL および RANK は Kgp による著明な分解を受けなかった。可溶性 RANKL および可溶性 RANK は Kgp により分解されたので、二次元空間に分布するこれらの分子への Kgp のアクセスが制限されることが、Kgp による分解を受けにくい原因と考えられる。

(4) 炎症性サイトカイン誘導性破骨細胞分化に対する Kgp の促進および抑制効果の発現

における OPG の必要性 : 炎症性サイトカイン誘導性破骨細胞分化の促進あるいは抑制に Kgp による OPG の分解が重要な役割を果たしていることを OPG 遺伝子欠損マウスの骨芽細胞および骨髄細胞の共存培養系を用いて解析した。OPG 欠損の共存培養系では、IL-1 、 TNF- 、 IL-17A による破骨細胞分化誘導に Kgp は影響を及ぼさなかった。したがって、Kgp は、OPG の分解を介して破骨細胞分化を制御すると考えられる。

(5) OPG の death domain 類似領域の Kgp による切断 : Kgp による分解で生じた OPG の主要な断片の N 末アミノ酸配列は、OPG の N 末アミノ酸配列と完全に一致した。したがって、Kgp は OPG 分子の N 末側に存在する RANKL 結合部位ではなく、より C 末側の death domain 類似領域内を切断することが明らかである。OPG は C 末端に存在する Cys どうしのジスルフィド結合により形成される OPG 二量体が RANKL 三量体に会合することで RANKL と RANK の会合を阻害することが知られている ( )

(6) OPG の Kgp の切断による RANKL 結合能の消失 : N 末端を蛍光ラベルした F-OPG は RANKL を細胞膜に発現している骨芽細胞に結合した。しかし、Kgp によって 37kDa の主要な N 末断片 (F-断片) は、骨芽細胞膜への結合能を失っていた。一方、非可逆的 Kgp 阻害剤で処理した Kgp と反応させた F-OPG は未処理の F-OPG と同様に、骨芽細胞に結合した。この結果は、OPG が Kgp による分解により、RANKL 結合能を失うことを示唆している。

(7) 本研究で得られた結果は、*P. gingivalis* が産生する Kgp による OPG の分解が歯周病に伴う歯槽骨破壊において極めて重要な役割を果たしていることを示している。

#### < 引用文献 >

- Yasuhara R, Miyamoto Y, Takami M, Imamura T, Potempa J, Yoshimura K, Kamijo R: Lysine-specific gingipain promotes lipopolysaccharide- and active-vitamin D<sub>3</sub>-induced osteoclast differentiation by degrading osteoprotegerin. *Biochem J* 419: 159-166, 2009
- Yasuhara R, Miyamoto Y: Roles of gingipains in periodontal bone loss. *J Oral Biosci* 53:197-205, 2011
- Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, Takahashi N, Nagai K: Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E<sub>2</sub> is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J Immunol* 172:2504-2510, 2004

Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U, Dunstan C, Kollias G, Steiner G, Smolen J, Schett G: Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 50:277-290, 2004

Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC: Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann NY Acad Sci* 1068:225-233, 2006

Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T: IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103:1345-1352, 1999

Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL: IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 115:282-290, 2005

Calkins CC, Platt K, Potempa J, Travis J: Inactivation of tumor necrosis factor- $\alpha$  by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: implications of immune evasion. *J Biol Chem* 273:6611-6614, 1998

Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF: The host cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* is modified by gingipains. *Oral Microbiol Immunol* 24:11-17, 2009

Banbula A, Bugno M, Kuster A, Heinrich PC, Travis J, Potempa J: Rapid and efficient inactivation of IL-6 gingipains, lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 261:598-602, 1999

Schneeweis LA, Willard D, Milla ME: Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand. *J Biol Chem* 280:41155-41164, 2005

## 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 12 件)

Miyamoto S, Miyamoto Y, Shibata Y,

Yoshimura K, Izumida E, Suzuki H, Miyazaki T, Maki K, Kamijo R: In-situ quasi-static and dynamic nanoindentation assessment of calcified nodules: Implication of glucocorticoids responsible for osteoblast calcification. *Acta Biomater* 12:216-226, 2015 (査読有) doi: 10.1016/j.actbio.2014.10.038.

Funato S, Matsunaga A, Oh K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Tanaka J, Suzuki D, Uyama R, Suzuki H, Mishima K, Nakamura M, Namiki O, Baba K, Inagaki K, Kamijo R: Effects of antibody to receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand on inflammation and cartilage degradation in collagen antibody-induced arthritis in mice. *J Neg Results Biomed* 13:18, 2014 (査読有) doi: 10.1186/s12952-014-0018-0.

Akiyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Hoshino M, Imamura T, Akiyama C, Yasuhara R, Mishima K, Maruyama T, Kohda C, Tanaka K, Potempa J, Yasuda H, Baba K, Kamijo R. *Porphyromonas gingivalis*-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 but suppresses that by interleukin-17A. Importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain. *J Biol Chem* 289:15621-15630, 2014 (査読有) doi: 10.1074/jbc.M113.520510. Miyamoto Y: Molecular mechanisms for bone resorption by gingipains: Degradation of osteoprotegerin by lysine-specific gingipain is a key factor for enhanced osteoclastogenesis. *J Oral Biosci* 56: 120-124, 2014 (査読有) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2014.06.002>

Shibuya I, Yoshimura K, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Suzuki D, Ikumi N, Hiura F, Anada T, Suzuki O, Kamijo R. Octacalcium phosphate suppresses chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Cell Tissue Res* 352:401-412, 2013 (査読有) doi: 10.1007/s00441-012-1548-8

Maruyama T, Miyamoto Y, Yamamoto G, Yamada A, Yoshimura K, Suzawa T, Takami M, Akiyama T, Hoshino M, Iwasa F, Ikumi N, Tachikawa T, Mishima K, Baba K, Ryutaro Kamijo R. Downregulation of carbonic anhydrase IX promotes Col10a1 expression in chondrocytes. *PLoS ONE* 8:e56984, 2013

( 査 読 有 ) doi:  
10.1371/journal.pone.0056984  
Miyamoto Y: A search for backseat  
players in regulation of  
differentiation and function of cells  
constituting hard tissues -  
Phagocyte-type NADPH oxidase,  
monocarboxylate transporter-1, and  
lysine gingipain. *Dent Med Res* 33:  
51-55, 2013 ( 査 読 有 )  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/dentalmedres/33/1/33\\_51/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/dentalmedres/33/1/33_51/_pdf)  
吉村健太郎, 宮本洋一, 上條竜太郎: 「歯  
周病と骨吸収」 *CLINICAL CALCIUM* 22:  
1685-1692, 2012. ( 査 読 無 ) doi:  
CliCa121116851692

(他 4 報)

〔学会発表〕(計 22 件)

秋山智人, 安原理佳, 宮本洋一, 今村隆  
寿, 馬場一美, 美島健二, 上條竜太郎:  
歯周病原菌の毒素による破骨細胞分化の  
促進. (第 14 回東京骨関節フォーラム, 東京,  
2014 年 7 月 19 日)

宮本洋一: (シンポジウム)ジンジパイン  
による骨破壊分子メカニズムの解明.(第  
55 回歯科基礎医学会学術大会 サテライト  
シンポジウム 10 歯周病原菌による歯  
周組織破壊メカニズム: 現状と展望, 岡  
山, 2013 年 9 月 20 日)

Akiyama T, Miyamoto Y, Yamada A, Takami  
M, Yasuhara R, Yoshimura K, Hoshino M,  
Maruyama T, Mishima K, Baba K, Kamijo  
R: Importance of proteolytic  
degradation of osteoprotegerin by  
lysine-specific gingipain in  
periodontal osteoclastogenesis.  
(American Society for Bone and Mineral  
Research 2012 Annual Meeting,  
Minneapolis, MN, USA, October 12-15,  
2012)

秋山智人, 宮本洋一, 山田 篤, 高見正  
道, 吉村健太郎, 星野真理江, 宮本 尚,  
榎 宏太郎, 馬場一美, 上條竜太郎: 歯  
周病原菌由来リシン特異的ジンジパイン  
はオステオプロテゲリンを優先的に分解  
し TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  による破骨細胞分  
化を促進する (第 54 回歯科基礎医学会学  
術大会, 郡山, 2012 年 9 月 14-16 日)

(他 18 報)

〔図書〕(計 1 件)

吉村健太郎, 宮本洋一, 上條竜太郎: アン  
チエイジングシリーズ 3 骨研究最前  
線~代謝・疾病のメカニズムから再生医  
療・創薬・リハビリ機器・機能性食品開  
発まで~, 第 3 編 第 5 章 第 3 節「骨代  
謝疾患から歯科治療へのアプローチ」  
(株)エヌ・ティー・エス出  
版, 257-171, 2013

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

ホームページ

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 洋一 (MIYAMOTO, Yoichi)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号: 2 0 2 9 5 1 3 2

(2) 研究分担者

高見 正道 (TAKAMI, Masamichi)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号: 8 0 3 0 7 0 5 8

(3) 連携研究者

今村 隆寿 (IMAMURA, Takahisa)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号: 2 0 1 7 6 4 9 9

(4) 研究協力者

秋山 智人 (AKIYAMA, Tomohito)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号: 9 0 7 1 0 3 1 9