

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592845

研究課題名(和文) 歯周病起因性動脈硬化における歯周病原性細菌の動態及び制御機序についての解析

研究課題名(英文) Monitoring of periodontal pathogen and analysis of regulatory mechanism in periodontitis-induced atherosclerosis

研究代表者

瀧澤 智美(橋爪智美)(HASHIZUME-TAKIZAWA, Tomomi)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：50419785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、歯周病と全身疾患である動脈硬化には関連性があるとの知見が数多く報告されている。本研究は歯周病並びに動脈硬化制御につながるメカニズムの解明であり、歯周病原性細菌の感染後の生体内における動態、局在を解析することを目的としている。このためにAggregatibacter actinomycetemcomitans(A.a.)由来のロイコトキシンプロモーター制御下でGFP発現A. actinomycetemcomitansの作製を行った。

研究成果の概要(英文)：Recently, numerous studies have been demonstrated that the involvement between the progression of atherosclerosis and oral infection by periodontal pathogens. It has been reported that periodontal pathogen-induced atherosclerosis may be regulated by direct (endothelial cell may be infected by periodontal pathogen), and indirect (development of atheromatous plaque may be attributed to endotoxin from periodontal pathogens) mechanisms. In this study, to analyze the direct role of periodontal pathogen to progress of atherosclerosis, we produced green fluorescent protein-expressing Aggregatibacter actinomycetemcomitans, which is one of the major periodontal pathogen, under the control of leukotoxin promoter for monitoring of A. actinomycetemcomitans after oral infection.

研究分野：免疫学

キーワード：歯周病 動脈硬化 A. actinomycetemcomitans GFP

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性炎症性疾患の一つである動脈硬化と口腔内感染症の一つである歯周病との関連に関する知見が数多く報告されている。申請者の所属する研究グループでも、動脈硬化及び歯周病の誘発機序の解明と、制御・予防に有効なワクチンの効果について報告している。また、申請者らによって、血管内皮細胞、単球系細胞の *in vitro* 培養系に歯周病原性細菌の一種である *Porphyromonas gingivalis* を投与することで血管内皮細胞、単球系細胞における細胞接着因子、炎症性サイトカイン、ケモカイン等の発現が増強し、その結果血管内皮細胞と単球系細胞の相互作用がより強固になることでプラーク形成が促進され動脈硬化が進展する可能性があることを報告している。

2. 研究の目的

本研究は、口腔内感染症である歯周病と全身性慢性炎症性疾患である動脈硬化との関連に関するメカニズムのさらなる解明を目的とする。申請者の所属する研究グループで歯周病原性細菌感染が動脈硬化の増悪に関与していると報告しているが、歯周病局所における炎症反応、歯周病原性細菌の内毒素が間接的に動脈硬化誘発の成因になっているのか、局所から血管内に侵入した歯周病原性細菌が直接血管内皮に感染することで動脈硬化が誘発されているのかははっきりしていない。また、歯周病原性細菌感染誘発性動脈硬化の制御につながる、制御性 T 細胞応答などについて解析する必要がある。歯周病はもとより動脈硬化をも効果的に予防できるワクチンの開発、免疫療法の確立を行う上で、制御メカニズム、感染の直接あるいは間接効果による病変部形成メカニズムの解明を行うことは重要である。本研究は主要な歯周病原性細菌の一種であり、報告の少ない *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 感染による動脈硬化促進メカニズムを解明する目的で、*A. actinomycetemcomitans* の感染後の生体内における動態を調べるために GFP 発現 *A. actinomycetemcomitans* の作製を行う。また、*P. gingivalis* 感染誘発性動脈硬化における T 細胞サブセットの解析を行う。

3. 研究の方法

(1) GFP 発現 *A. actinomycetemcomitans* の作製

E. coli の形質転換
CaCl₂ 法を用いカナマイシン、アンピシリン入り培地でスクリーニングを行った。

A. actinomycetemcomitans の形質転換
早期対数増殖期 (3 時間) の培養菌体を用いてエレクトロコンピテントセルの作製を行った。この時 pH5.5 の弱酸性緩衝液を用いた。

2500V、200 Ω 、25mF の条件下でエレクトロポレーションを行い、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン入り培地でスクリーニングを行った。

プラスミド、クロモゾームの精製方法、PCR 法、シーケンス解析、アガロースゲル電気泳動法は定法に従った。

(2) *P. gingivalis* 感染による動脈硬化モデルマウスにおける炎症反応関連分子の解析

動脈硬化モデルマウスであるアポ E ノックアウトマウスに *P. gingivalis* 或はコントロールとして PBS を週 3 回を 3 週にわたり経尾静脈投与する。一定期間飼育後、心臓、脾臓、血液を採取し、近位大動脈における病変部の面積の測定、脾臓細胞の培養上清中における炎症反応関連分子の測定、脾臓細胞のフローサイトメトリー解析、脾臓細胞及び心臓組織における炎症反応関連分子の遺伝子レベルでの発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) GFP 発現 *A. actinomycetemcomitans* の作製

A. actinomycetemcomitans 由来のロイコトキシンプロモーター領域に特異的なプライマー (制限酵素サイトを両端に含む) の設計を行い、*A. actinomycetemcomitans* からクロモゾームを精製しロイコトキシンプロモーター領域を PCR により増幅させベクタープラスミドに挿入後大腸菌に形質転換を行った (plasmid1)。

GFP 構造遺伝子を含んだプラスミド pAcGFP-C1 から GFP 構造遺伝子領域を設計したプライマーを用いて PCR により増幅しようと試みたがうまくクローニングできなかったため、pAcGFP-C1 から GFP 構造遺伝子領域を制限酵素で切り出しベクターに挿入後形質転換を行った (plasmid2)。

plasmid1 に組み込まれたロイコトキシンプロモーター領域のフレームを変えるため (制限酵素サイトの変更) plasmid1 からロイコトキシンプロモーター領域を再度制限酵素で切り出し別のベクターに挿入した (plasmid1')。

plasmid2 から GFP 構造遺伝子領域を制限酵素で切り出し plasmid1' のロイコトキシンプロモーター領域の下流に挿入し大腸菌に形質転換した (plasmid3)。

plasmid3 からロイコトキシンプロモーターと GFP 構造遺伝子領域を制限酵素で切り出し、*A. actinomycetemcomitans* と大腸菌のシャトルベクターに挿入後大腸菌に形質転換した (plasmid4)。

plasmid4 についてシーケンス解析を行った所、転写開始に必要なリボソーム結合部位であるシャインダルカノ配列が欠如していることが判明した。

シャインダルカノ配列を含むよう再設計

したプライマーを用いて、*A. actinomycetemcomitans* クロモソームからロイコトキシンプロモーター+シャインダルカノ配列領域を PCR で増幅させた。plasmid4 からロイコトキシンプロモーター領域を切り出し、新たに増幅させたシャインダルカノ配列入りのロイコトキシンプロモーター領域と入れ換えを行った。しかしながら、制限酵素サイトに問題があり、うまくいかなかった。

再度始めから行い、まず pAcGFP-C1 の GFP 構造遺伝子領域にあるマルチクローニングサイトを制限酵素処理することで消去してから、pAcGFP-C1 から切り出した GFP 構造遺伝子領域を別のベクターに入れ直した (plasmid5) (図 1)。

A. actinomycetemcomitans クロモソームからロイコトキシンプロモーター領域+シャインダルカノ配列+ロイコトキシン C のスタートコドン (制限酵素 Nco I の配列の中に組み込んだ) を PCR で増幅し制限酵素処理し、plasmid5 の GFP 構造遺伝子領域の上流にインフレームで挿入し、大腸菌に形質転換した (plasmid6) (図 1)。

plasmid6 からロイコトキシンプロモーターと GFP 構造遺伝子領域を制限酵素で切り出し、*A. actinomycetemcomitans* と大腸菌のシャトルベクターに挿入後エレクトロポレーション法により大腸菌に形質転換した (plasmid7) (図 1)。

スクリーニングにより得られたコロニーから精製したプラスミドに関してシーケンス解析を行った。

plasmid7 を持った大腸菌と *A. actinomycetemcomitans* を共培養することで起こる接合を利用して *A. actinomycetemcomitans* HK1615 株を plasmid7 で形質転換しようとしたがうまくいかなかった。そこで、plasmid7 を持った大腸菌から plasmid7 を精製し、エレクトロポレーション法を用いて *A. actinomycetemcomitans* HK1615 株を形質転換した (図 1)。

(2)得られた *A. actinomycetemcomitans*-GFP のにかんする分析。

シャトルベクターである plasmid7 (pUTmini-Tn5) はトランスポゾン活性を有しておりホストのゲノムに組み込まれる。一度ホストのゲノムに組み込まれるとアンピシリン耐性遺伝子が抜け落ちることから、アンピシリン感受性となる。得られたコロニー 10 個についてアンピシリン感受性をテストした所、全てアンピシリン感受性となった。また、得られたコロニーからクロモソームを精製し、GFP 構造遺伝子領域特異的なプライマーを用いて PCR したところ、GFP 構造遺伝子領域サイズのコロニーが確認された。GFP 構造遺伝子を組み込んでいない *A. actinomycetemcomitans* のクロモソームから

はバンドは検出されなかった。フローサイトメトリーにより GFP 発現強度を解析した結果、GFP 構造遺伝子を組み込んでいない *A. actinomycetemcomitans* に比較して、*A. actinomycetemcomitans*-GFP では、GFP 強度が僅かに増加した。

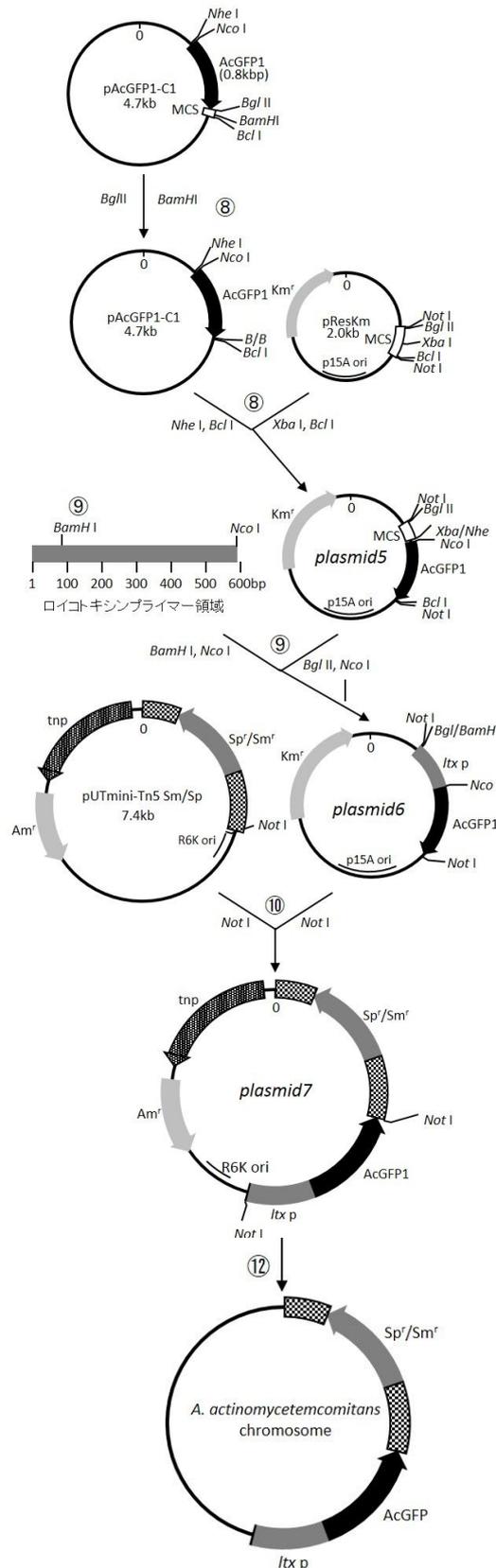


図 1

今後はマウスに投与し生体内における動態について解析をおこなっていく。

(3) *P. gingivalis* 感染による動脈硬化モデルマウスにおける炎症反応関連分子の解析

脂質代謝に関与しているアポリipoprotein E を欠損した動脈硬化モデルマウスであるアポE ノックアウトマウスに歯周病原性細菌の一種である *P. gingivalis* を経尾静脈投与したところ、コントロール群に比較して、心臓における病変部（アテローム性プラーク）の拡大が有意に認められた。

P. gingivalis 感染アポE ノックアウトマウスから採取した脾臓細胞についてイントラセルラー染色をしフローサイトメトリー解析したところ、Th17 型反応関連の炎症反応分子である IL-17A 陽性細胞が *P. gingivalis* 投与群で増加した。一方、Th1 型反応関連の IFN- γ 、及び制御性T細胞（Treg）関連分子である FoxP3 の増加は認められなかった。

P. gingivalis 及び PBS 投与マウスから採取した脾臓細胞の培養上清中に産生されたサイトカインの量を測定した結果、*P. gingivalis* 感染群において IL-17、IL-1 β が有意に高いレベルを示した。一方、IFN- γ 、IL-10 は PBS、*P. gingivalis* 投与群で差が認められなかった。

Th17 型反応関連分子である ROR γ t、Th1 型反応関連分子である T-bet、Treg 反応関連分子である Foxp3 の遺伝子発現量を分析したところ、PBS 投与マウス群に比較して *P. gingivalis* 投与群では、ROR γ t の発現が上昇し、反対に T-bet の発現が減少した。

炎症反応関連分子に関してリアルタイム PCR 解析を行った。脾臓細胞中では *P. gingivalis* 感染群で IL-6、TGF- β 、ROR γ t、STAT3 の発現が有意に増加していた。大動脈中でも *P. gingivalis* 感染群において IL-6、ROR γ t の発現が有意に増加していた。

以上の結果から、*P. gingivalis* を経尾静脈投与したアポE ノックアウトマウスでは、炎症反応系の中でも Th1 型反応ではなくて Th17 型反応が誘導されることで炎症反応を引き起こし動脈硬化促進につながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Y. Cai, R. Kobayashi, T. Hashizume-Takizawa, T. kurita-ochiai, *Porphyromonas gingivalis* infection enhances Th17 responses for development of atherosclerosis, Arch. Oral. Biol., (査読有), 2014, 11:1183-91

〔学会発表〕(計 2 件)

瀧澤智美, 桑原紀子, 落合智子, 私傷病原性細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* GFP 発現株の作製,

第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014 年 9 月 27 日, 福岡

Y. Cai, T. Hashizume, R. Kobayashi, T. kurita-ochiai, M. Yamamoto, Emerging function of Th17 responses for development of atherosclerosis infected by *Porphyromonas gingivalis*, 第 55 回春季歯周病学会, 2012 年 5 月 19 日, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧澤 智美 (橋爪 智美)

(HASHIZUME-TAKIZAWA, Tomomi)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号: 50419785