

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659933

研究課題名(和文) 予測歯科医学の創生に向けた歯周感染感受性の分子基盤解析

研究課題名(英文) Molecular dissection of periodontal susceptibility for generation of predictive dentistry

研究代表者

天野 敦雄 (Amano, Atsuo)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50193024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周細胞の細胞内殺菌機構を解析し、歯周病罹患の遺伝的宿主リスクを判定する予測歯科医学の創生に寄与することを目的とした。

P. gingivalis は歯肉上皮細胞に侵入後、初期エンドソームに存在し、細胞輸送小胞の融合に関わるSNAREタンパク質VAMP2を介した輸送経路により、細菌の約半数は細胞外に脱出し、細胞内に残った細菌の大半はオートファジー経路に輸送されることが示された。さらに細菌を捕獲するオートファゴソームは小胞体とミトコンドリアの接触点で生成されていることも示された。これは、2つの全く異なるオルガネラが協働して第3のオルガネラを産むというユニークな知見である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed microbicidal molecular basis against intercellular pathogens in periodontal cells in order to evaluate host susceptibility to periodontitis for future predictive dentistry.

Following the entry to gingival epithelial cells, *P. gingivalis* is sorted to early endosomes, and the half of the intracellular pathogens are transported to recycling pathway via SNARE protein, VAMP2, which allows the bacterial exit to the extracellular circumstances. While, remaining half are sorted to autophagosome. The machinery is found to be formed in contact sites between endoplasmic reticulum and mitochondria, which is a very unique finding indicating that 2 different organelle make a concerted effort to the formation of another organelle.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：Porphyromonas gingivalis 細胞内感染 歯周炎 SNARE 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

歯周病菌は歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞に侵入し、感染の進行と慢性化を図る。一方、宿主細胞はエンドサイトーシス経路などのメンブレントラフィック機構を用いて侵入細菌を分解する。この「細菌 vs メンブレントラフィック」の戦いの転機が歯周病の発症において大きな影響を与えている。

歯周治療によりバイオフィルムを除去することは出来ても、歯周細胞内に侵入した *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病菌は駆逐できない。そのため、宿主の細胞内殺菌能力の高・低が歯周病の発症と慢性化の大きな決定因子と考えられるようになってきた (Amano *et al*, Periodontol 2000, 2010)。

2. 研究の目的

P. gingivalis をはじめとする歯周病菌は、細胞メンブレントラフィック機構を利用して、細胞侵入と細胞からの脱出を行っている。(メンブレントラフィックとは、細胞内の物質輸送ネットワークであり、細胞内外への物質輸送により免疫系などの高次生体機能を支えている。メンブレントラフィックの自然免疫機能としては、マクロファージによる細菌貪食がよく知られている。) 歯周細胞も、対細菌戦の最前線として、メンブレントラフィックを利用して侵入細菌を分解している。

申請者らは、エンドサイトーシス系を利用して *P. gingivalis* は歯周細胞に侵入し、細胞シグナル分子を分解し、細胞障害を与えていることを示した (Kato *et al*, Cell Microbiol, 2007)。さらに、*P. gingivalis* の細胞内棲息、そして細胞外脱出と隣接細胞への再侵入に関する分子群も明らかにした (Takeuchi *et al*, Cell Microbiol, 2011)。中でも特筆すべきは、本菌の細胞内での挙動パターンは歯肉上皮細胞の個体差によって異なるという知見を得た事である。これは、歯周病に「なる人」と「ならない人」をメンブレントラフィック機構の個人差で説明できることを示している。

メンブレントラフィック機構の個人差と小胞輸送関連タンパク・遺伝子多型の関連を解析し、歯周病発症と宿主の遺伝的背景の関連を示すことができる。そこで本研究では、歯周細胞の細胞内殺菌機構の精査を行った。

3. 研究の方法

P. gingivalis の細胞内選別輸送へのSNARE分子の関与解析

細胞内の輸送小胞の融合に深く関与するSNARE分子は、細胞内 *P. gingivalis* の選別輸送を制御する可能性が高い。そこで、SNAREタンパク群のうち、細胞膜または初期エンドソームに局在するSNAREに焦点を当て、RNAiノックダウン法に

よるスクリーニングにより、全ての輸送経路へのSNAREの関与を解析した。さらに、GFP融合SNAREタンパク質と細胞内細菌との共局在観察、当該SNAREタンパクの dominant-negative と active-formを作成し、解析を行った。

細胞内 *P. gingivalis* を捕獲するオートファジー形成メカニズムの解析

オートライソソームに取り込まれたA群連鎖球菌は、約6時間で分解されるのに比べ、*P. gingivalis* はオートライソソームに強い抵抗性を示し、分解には30時間が必要である。さらに、*P. gingivalis* はオートライソソームの著しい酸性化を誘導する。ライソソームの酸性化ストレスは細胞死を誘導するとされており (Ferri and Kroemer, Nat Cell Biol, 2001)、歯周病進行の一因となっている可能性がある。また、Papillon-Lefevre 症候群などのライソソーム機能に欠陥がある先天性疾患では、重度の歯周疾患を伴う。そこで、*P. gingivalis* を内包するオートライソソームの形成メカニズムをAtg14、Atg5、SNAREタンパク質stx17、小胞体とミトコンドリアのマーカータンパクを用いて解析した。

4. 研究成果

P. gingivalis は歯肉上皮細胞に侵入後、初期エンドソームに存在し、細胞輸送小胞の融合に関わるSNARE・VAMP2などを介した輸送経路により、細菌の約半数は細胞外に脱出する。一方、細胞内に残った細菌の大半はオートファジー経路に輸送されることが示された(図1)。

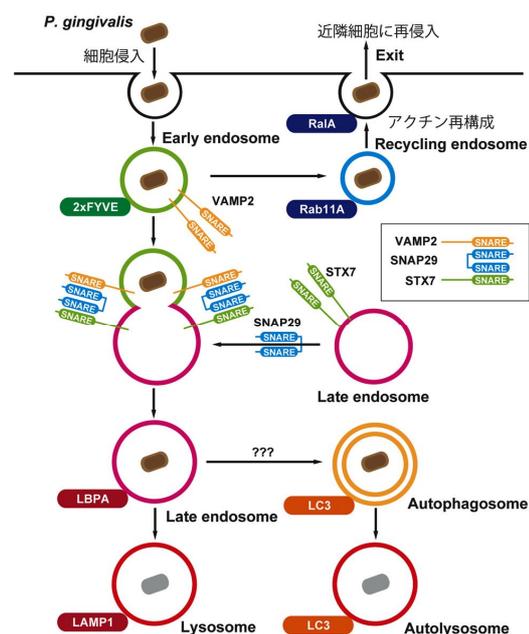


図1 *P. gingivalis* の細胞内移動を制御するSNAREタンパク質

オートファジー誘導初期にはオートファゴソーム

形成初期段階に關与する Atg14 が小胞体とミトコンドリアとの接触部位に集積した。隔離膜のマーカである Atg5 はその接触部位においてオートファゴソームの動的形成に明確に關与していた。また、飢餓条件において細胞を分画すると、Atg14 はミトコンドリアに結合した小胞体膜と同一画分に検出された。小胞体に存在する SNARE タンパク質 stx17 は Atg14 と結合し、オートファゴソーム形成に添って、小胞体とミトコンドリアとの接触部位へと移動した。これらの結果から、オートファゴソームは小胞体とミトコンドリアとの接触部位において形成されていることが示唆された(図 2)。

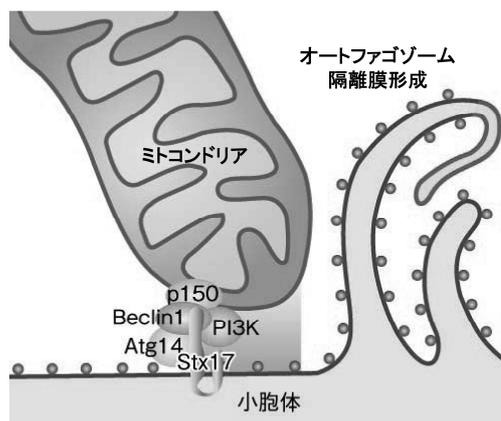


図 2 オートファゴソームの形成機構

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 27 件)

Original Articles

- Inaba H*, Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, Morisaki I, Lamont RJ, Amano A (2014): *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. **Cellular Microbiology**, 16(1):131-145. doi: 10.1111/cmi.12211
- Hashino E, Kuboniwa M*, Alghamdi S, Yamaguchi M, Yamamoto R, Cho H, Amano A (2013): Erythritol alters microstructures and metabolomic profiles of biofilm composed of *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis*. **Molecular Oral Microbiology**, 28(6):435-451. doi: 10.1111/omi.12037
- Kawai S*, Michikami I, Kitagaki J, Hashino E, Amano A (2013): Expression pattern of zinc-finger transcription factor *Odd-skipped related 2* in murine development and neonatal stage. **Gene Expression Patterns**, 13(8): 372–376. doi: 10.1016/j.gep.2013.06.007
- Moon J-H, Herr Y, Lee H-W, Shin S-I, Kim C, Amano A, Lee J-Y* (2013): Genotype analysis of *Porphyromonas gingivalis fimA* in Korean adults using new primers. **Journal of Medical Microbiology**, 62:1290-1294.
- Hamasaki M[†], Furuta N[†], Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Ohmori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A*, Yoshimori T* (2013): Autophagosome forms at the ER-mitochondria contact sites. **Nature**, 495(7441):389-393. doi: 10.1038/nature11910 [†]Equal contributors.
- Takeuchi H, Hirano T, Whitmore SE, Morisaki I, Amano A, Lamont RJ* (2013): The serine phosphatase SerB of *Porphyromonas gingivalis* suppresses IL-8 production by dephosphorylation of NF-κB RelA/p65. **PLoS Pathogens**, 9(4): e1003326. doi: 10.1371/journal.ppat.1003326
- Watanabe T, Nozawa T, Aikawa C, Amano A, Maruyama F*, Nakagawa I (2013): CRISPR regulation of intraspecies diversification by limiting IS transposition and intercellular recombination. **Genome Biology and Evolution**, 5(6):1099-1114. doi: 10.1016/j.gep.2013.06.007
- Maeda K*, Nagata H, Kuboniwa M, Ojima M, Osaki T, Minamino N, Amano A (2013): Identification and characterization of *Porphyromonas gingivalis* client proteins that bind to *Streptococcus oralis* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. **Infection and Immunity**, 81(3):753-763. doi: 10.1128/IAI.00875-12
- Aoki A*, Shibata Y, Okano S, Maruyama F, Amano A, Nakagawa I, Abiko Y* (2012): Transition metal ions induce carnosinase activity in PepD-homologous protein from *Porphyromonas gingivalis*. **Microbial Pathogenesis**, 52(1):17-24. doi: 10.1016/j.micpath.2011.09.003
- Moon JH, Shin SI, Chung JH, Lee SW, Amano A, Lee JY* (2012): Development and evaluation of new primers for PCR-based identification of type II *fimA* of *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 64(3):425-428. doi: 10.1099/jmm.0.054247-0
- Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S,

- Tohnai I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, **Amano A**, Okanou T, Ooshima T, Nakajima A* (2012): Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **BMC Gastroenterology**, 12(1):16. doi: 10.1186/1471-230X-12-16
12. Kawai S*, **Amano A** (2012): BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. **Journal of Cell Biology**, 197(2): 201-208. doi: 10.1083/jcb.201110008
13. Kawai S*, **Amano A** (2012): Negative regulation of *Odd-skipped related 2* by TGF- β achieves the induction of cellular migration and the arrest of cell cycle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 421(4):696-700. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.064
14. Inaba H*, **Kuboniwa M**, Sugita H, Lamont RJ, **Amano A** (2012): Identification of signaling pathways mediating cell cycle arrest and apoptosis induced by *Porphyromonas gingivalis* in human trophoblasts. **Infection and Immunity**, 80(8):2847-2857. doi: 10.1128/IAI.00258-12
15. Yamasaki Y, Nomura R, Nakano K*, Inaba H, **Kuboniwa M**, Hirai N, Shirai M, Kato Y, Murakami M, Naka S, Iwai S, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T, **Amano A**, Asai F (2012): Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gulae* carrying a new *fimA* genotype. **Veterinary Microbiology**, 161 (1): 196-205. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.026
- discoveries from proteomics. **Expert Review of Proteomics**, 9(3):311-323. doi: 10.1586/epr.12.16
20. **Furuta N***, **Amano A** (2012): SNARE mediates autophagosome-lysosome fusion. **Journal of Oral Bioscience**, 54(2):83-85.
21. Kliensky DJ*, **Amano A**, and 1268 others (2012): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 8(4):1-100.
22. **Amano A***, **Furuta N** (2012): Cell entry and exit by periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Oral Bioscience**, 54(1):54-57.

(学会発表) (計 51 件)

- Review**
16. **Amano A***, **Kuboniwa M**, Takeuchi H (2014): Transcellular offensive weapons of *Porphyromonas gingivalis* in host-parasite interactions. **Journal of Oral Bioscience**, 56(3) in press.
17. **Amano A***, Chen C, Honma K, Li C, Settem RP, Sharma A (2014): Genetic characteristics and pathogenic mechanisms of periodontal pathogens. **Advances in Dental Research**, 26(1):15-22. doi: 10.1177/0022034514526237
18. Enersen M*, Nakano K, **Amano A** (2013): *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. **Journal of Oral Microbiology**, 5: 10. doi: 10.3402/jom.v5i0.20265
19. **Kuboniwa M***, Tribble GD, Hendrickson EL, **Amano A**, Lamont RJ, Hackett M (2012): Insights into the virulence of oral biofilms:
1. **Amano A**: Unique strategic system of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. **Kyudai Oral Bioscience 2014, 8th International Symposium**, 2014/3/1 (Hakata).
2. **Amano A**: Molecular basis of periodontal destruction by periodontal bacteria. **Exchange seminar between Osaka University and National Taiwan University**, 2013/12/24 (Taipei).
3. **天野敦雄**: *P. gingivalis* の歯周組織破壊戦略 - 変貌する歯周病因論 - サテライトシンポジウム 10 歯周病菌による歯周組織破壊メカニズム: 現状と展望 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 20 日 (岡山市).
4. **Amano A**: Molecular basis of periodontal destruction by periodontal bacteria. JADR-sponsored symposium. **2nd meeting of IADR-Asia Pacific Region**, 2013/8/21 (Bangkok).
5. **天野敦雄**: 口腔から挑む BioResearch : Dental Science のときめき . シンポジウム「トレンドメーカーによるサイエンティフィック・エクステンジ」第 62 回口腔衛生学会 , 2013 年 5 月 16 日 (松本).
6. **Amano A**: Strategy of periodontal bacteria for periodontal destruction. **Seminar at School of Dentistry University of Louisville**, 2013/3/18 (Louisville, Kentucky).
7. **Amano A**: Strategy of periodontal bacteria for periodontal destruction. **Seminar at Penn Dental**, 2013/3/15 (Philadelphia, Pennsylvania).
8. **Amano A**: Strategy of *P. gingivalis* for periodontal destruction. **First international conference on *Porphyromonas gingivalis* and related**

bacterial species. 2012/8/28 (Nagasaki)

9. **天野敦雄**: 基礎研究が指し示す歯周病因論自由集会5「歯科における健康を科学する」第 61 回口腔衛生学会, 2012 年 5 月 27 日(横須賀)

(図書)(計 6 件)

1. Kuboniwa M, **Amano A*** (2012): Genotyping of periodontal anaerobic bacteria in relationship to pathogenesis. p. 149-166. *In de Filipis I, McKee ML (ed.), Molecular typing in bacterial infections.* Springer, NY, U.S.A..
2. **天野敦雄** (2012): 歯周病の発症 ビジュアル歯周病を科学する (**天野敦雄**, 村上伸也, 岡賢二 編)クインテッセンス出版, 東京, 12-32.
3. **天野敦雄** (2012): 歯周組織内に生息する歯周病菌 ビジュアル 歯周病を科学する (**天野敦雄**, 村上伸也, 岡賢二 編)クインテッセンス出版, 東京, 139-154.
4. **天野敦雄** (2012): 歯周病原菌 red complex の宿主傷害戦略 ビジュアル 歯周病を科学する (**天野敦雄**, 村上伸也, 岡賢二 編)クインテッセンス出版, 東京, 155-180.
5. **天野敦雄** (2012): オートファジーと感染・免疫 オートファジー(水島 昇・吉森 保 編)化学同人, 京都, 150-164.
6. 橋野恵衣, **天野敦雄**(2013): 糖アルコールバイオフィルムへの効果 オーラルヘルスケア機能性食品の開発と応用: アンチエイジングを目指した口腔ケアを中心に(坂上 宏 監修)シーエムシー出版, 東京, p.101-108.

(産業財産権)

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

(その他)

ホームページ

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~prevent/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

天野 敦雄 (AMANO ATSUO)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 50193024

(2)研究分担者

久保庭 雅恵 (KUBONIWA MASAE)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 00303983

古田 信道 (FURUTA NOBUMICHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 50452446
平成 25 年 4 月 17 日削除

(3)連携研究者

なし