

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791999

研究課題名(和文) 歯周病原細菌ヘモグロビンレセプタータンパク質の新規作用解析と歯周炎発症への役割

研究課題名(英文) The role of hemoglobin receptor protein from Porphyromonas gingivalis on periodontitis

研究代表者

中山 真彰(Nakayama, Masaaki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10579105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯周病細菌が作り出すタンパク質の役割に焦点を置き、そのタンパク質が歯周炎に影響を及ぼすかどうかを調べる研究である。そのタンパク質はヘモグロビンレセプター(HbR)タンパク質というが、HbRタンパク質はヒト歯肉上皮由来の株化細胞Ca9-22細胞および正常歯肉上皮細胞に作用して、インターロイキン8(IL-8)の産生を誘導し、HbRタンパク質のIL-8産生に至る分子経路の決定も行なうことができた。従って、HbRタンパク質は歯肉上皮細胞からIL-8の産生を誘導し、歯周炎と関連する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to clarify about the function of hemoglobin receptor (HbR) protein from Porphyromonas gingivalis on the host epithelial cells and the relationship with inflammation in the periodontal diseases. Using gingival epithelial cell line Ca9-22 and primary gingival epithelial cells, HbR protein induce interleukin-8 within at least 3 h after stimulation. Moreover, we revealed the molecular mechanisms by which HbR protein induced IL-8 production through the activation of p38/CREB and Erk1/2/ATF-2, NF- $\kappa$ B. Therefore, these results led us to the possibility that HbR protein is associated with periodontitis by innate immun responses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：歯周病原細菌 歯周炎 シグナル伝達 病原因子

### 1. 研究開始当初の背景

*Porphyromonas gingivalis* (以下、Pg)をはじめとする歯周病原細菌の長期感染は、歯周病態の形成、および全身性の疾患との関与が報告されている。歯周病原細菌の感染局所および周縁部では、歯肉上皮細胞の破壊に引き続き、歯根膜や歯槽骨の破壊・吸収が生じ、歯周炎が惹起される。本研究では、Pgが産生するヘモグロビンレセプタータンパク質(HbR)が、本菌の鉄獲得のため以外に宿主側へ作用することを調べる。これまでに報告されているHbRと宿主細胞に対する作用に関する研究は、HbRが破骨前駆細胞でもある骨髄由来マクロファージ様細胞に作用して破骨細胞分化を抑制する報告のみである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、HbRによる歯肉上皮細胞への作用を調べ、歯周病への関与を明らかにすることが目的である。それが明らかになれば、HbRはPgの新規な病原因子として、歯周病態に関与するターゲットと考えられる。歯周病態における炎症との関連性を考慮して、ケモカイン・サイトカインの産生を調べる。

### 3. 研究の方法

Pg産生HbRを大腸菌BL21でリコンビナントタンパク質(rHbR)として発現・調製した。また一部の調製したHbRを長崎大学口腔病原細菌学から恵与して頂き、それを使用した。歯肉上皮細胞は、歯肉由来株化細胞Ca9-22と正常歯肉上皮細胞(HGEPs)を使用して、rHbRを作用させた。

i) rHbR作用によるCa9-22細胞からのサイトカイン発現の検討 Ca9-22細胞にrHbR(10 µg/µl)を12時間作用させ、細胞の培養上清中のサイトカインをメンブレン型抗体アレイで広範に調べた。

ii) rHbR濃度依存的、および経時的作用によるIL-8産生への影響 Ca9-22細胞へrHbR(0-10 µg/µl)を12時間作用、およびrHbR(10 µg/µl)を0, 3, 6, 12時間作用させて、IL-8産生をELISAにて調べた。

iii) rHbRによるIL-8産生に関する細胞内シグナル伝達経路の解析 Ca9-22細胞へrHbR(10 µg/µl)を作用(0-120分間)させ、MAP kinase経路および転写因子ATF-2, CREB, NF-κBの関与について、各種リン酸化抗体を用いたWestern blottingで評価した。

### 4. 研究成果

歯肉上皮細胞に対するrHbRの作用を調べ、rHbRの病原因子としての役割について検討した。その結果を研究方法に沿って下記に示す。

i) rHbR作用によるCa9-22細胞からのサイトカイン発現の検討 Ca9-22細胞にrHbRを作用させ、12時間後の培養上清におけるサイトカインを抗体アレイで調べた。その結果、IL-8の産生が顕著に認められた。

ii) rHbR濃度依存的、および経時的作用によるIL-8産生への影響 Ca9-22細胞に対するrHbRの作用は、濃度依存的(0-10 µg/µl, 12時間)なIL-8産生増加、また10 µg/µl rHbRの作用により0, 3, 6, 12時間の経過でIL-8産生増加が認められた。時間経過の実験では、3時間後には産生が認められ、添加後6時間後には既にIL-8の産生のピークに近い測定結果を示した。

iii) rHbRによるIL-8産生に関する細胞内シグナル伝達経路の解析 はじめに、rHbR(10 µg/µl)を作用(0-120分間)させ、MAP kinase経路(p38, Erk1/2, JNK)の活性化について調べた結果、p38とErk1/2のリン酸化活性の亢進が認められた。またp38およびErk1/2の阻害剤を用いた実験により、rHbRはp38とErk1/2を活性化していると示唆された。それらの阻害剤によって、IL-8の産生も抑制された。従って、rHbRによるIL-8産生はp38およびErk1/2が重要であることが考えられた。次に、p38およびErk1/2の下流の転写因子ATF-2, CREBおよびNF-κBの関与について検討した。ATF-2, CREBはsiRNA法を用いてIL-8産生への影響を調べた。その結果、共にrHbRによるIL-8産生に関与していることが示唆された。またNF-κBの関与についても阻害剤BAY11-7082を用いて調べたところ、IL-8の産生を50%程減少させた。さらには、これらの転写因子と上流因子を繋ぐ分子カスケードを検討した。その結果、rHbRはp38/CREB, Erk1/2/ATF-2, NF-κBの経路を活性化して、IL-8産生を誘導していることが考えられた。

以上の結果は、*Infection and Immunity* (2014)に報告した。

### 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2件)

1) Yuki Fujita, Masaaki Nakayama, Mariko Naito, Eiki Yamachika, Tetsuyoshi Inoue, Koji Nakayama, Seiji Iida, and Naoya Ohara Hemoglobin receptor protein from *Porphyromonas gingivalis* induces IL-8 production in human gingival epithelial cells through stimulation of the MAPK and NF-κB signal transduction pathways. *Infection and Immunity*. 2014;

82(1):202-11. 査読有り

doi: 10.1128/IAI.01140-12.

2) Hajime Isomoto, Kayoko Matsushima, Naoki Inoue, Tomayoshi Hayashi, Toshiyuki Nakayama, Masaki Kunizaki, Shigekazu Hidaka, Masaaki Nakayama, Junzo Hisatsune, Masahiro Nakashima, Takeshi Nagayasu, Kazuhiko Nakao, and Toshiya Hirayama

Interweaving MicroRNAs and Proinflammatory Cytokines in Gastric

Mucosa with Reference to H. pylori  
Infection

*Journal of Clinical Immunology*, 2012;  
32(2):290-299. 査読有り

doi: 10.1007/s10875-011-9626-3.

〔学会発表〕(計 20 件)

1) 中山 真彰, 井上 哲圭, 内藤 真理子,  
中山 浩次, 大原 直也

題名: *P. gingivalis* ジンジパインのタン  
パク分解作用による PI3K/Akt 経路への影響

学会名: 第 87 回日本細菌学会総会 ポス  
ター発表

場所: 東京・船堀ホール

年月:平成 26 年 3 月 26-28 日 (20140326-28)

2) 井上 哲圭, 田口 裕子, 加野 小奈  
美, 中山 真彰, 黒田 照夫, 大原 直也

題名: *Porphyromonas gingivalis* の薬剤排  
出ポンプ欠損株の薬剤感受性と細胞内侵入  
性

学会名: 第 87 回日本細菌学会総会 ポス  
ター発表

場所: 東京・船堀ホール

年月:平成 26 年 3 月 26-28 日 (20140326-28)

3) 加野 小奈美, 井上 哲圭, 田口 裕  
子, 田川 淳平, 中山 真彰, 山城 隆,  
大原 直也

題名: *Porphyromonas gingivalis* の  
PGN<sub>1202</sub> (rpoN) は必須遺伝子である

学会名: 第 87 回日本細菌学会総会 ポス  
ター発表

場所: 東京・船堀ホール

年月:平成 26 年 3 月 26-28 日 (20140326-28)

4) 田口 裕子, 佐藤 啓子, 井上 哲圭,  
加野 小奈美, 中山 真彰, 前田 博史,  
中山 浩次, 大原 直也

題名: *Porphyromonas gingivalis* PGN<sub>1796</sub>  
は薬剤感受性に関与する

学会名: 第 87 回日本細菌学会総会 ポス  
ター発表

場所: 東京・船堀ホール

年月:平成 26 年 3 月 26-28 日 (20140326-28)

5) 田川 淳平, 井上 哲圭, 佐藤 啓子,  
内藤 真理子, 中山 真彰, 中山 浩次,  
桑原 知己, 大原 直也

題名: *Porphyromonas gingivalis* における  
電気穿孔法に適した新規プラスミドベク  
ターの構築

学会名: 第 87 回日本細菌学会総会 ポス  
ター発表

場所: 東京・船堀ホール

年月:平成 26 年 3 月 26-28 日 (20140326-28)

6) 中山 真彰, 大原 直也

題名: 細菌感染による TLR2/MyD88 を介した  
破骨細胞分化への影響

学会名: 第 33 回岡山免疫懇話会 口頭発表  
場所: 岡山・岡山大学基礎研究棟 1 階大  
学院セミナー室

年月:平成 26 年 3 月 5 日 (20140305)

7) 中山 真彰, 井上 哲圭, 内藤 真理子,  
中山 浩次, 大原 直也

題名: *P. gingivalis* ジンジパインによる  
PI3K/Akt 経路の抑制機序

学会名: 第 1 回 国立感染症研究所 -岡山  
大学 連携大学院シンポジウム 口頭発表

場所: 岡山大学医学部基礎研究棟 1 階大  
学院セミナー室

年月:平成 25 年 12 月 18 日 (20131218)

8) 中山 真彰, 井上 哲圭, 内藤 真理子,  
中山 浩次, 大原 直也

題名: *P. gingivalis* ジンジパインによる  
PI3K/Akt 抑制の分子解析

学会名: 第 66 回日本細菌学会中国・四国  
支部総会 口頭発表

場所: 広島国際大学呉キャンパスメディア  
ホール

年月:平成 25 年 10 月 12, 13 日  
(20131012-13)

9) 井上 哲圭, 中山 真彰, 加野 小奈  
美, 田口 裕子, 黒田 照夫, 大原 直也

題名: *Porphyromonas gingivalis* のマルチ  
コンポーネント型薬剤排出ポンプ系をコ  
ードする遺伝子

学会名: 第 66 回日本細菌学会中国・四国  
支部総会 口頭発表

場所: 広島国際大学呉キャンパスメディア  
ホール

年月:平成 25 年 10 月 12, 13 日  
(20131012-13)

10) 中山 真彰, 井上 哲圭, 中山 浩次,  
大原 直也

題名: *P. gingivalis* ジンジパインによる  
PI3K/Akt 経路の抑制機序

学会名: 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・  
総会 ポスター発表

場所: 岡山コンベンションセンター (岡山)

年月:平成 25 年 9 月 20-22 日

11) 村上 純, 大原 直也, 中山 真彰,  
辻極 秀次, 長塚 仁, 此内 浩信, 柳 文  
修, 浅海 淳一

題名: 口腔癌に対するBCG生菌療法による抗  
腫瘍、延命効果の検討

学会名: 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・  
総会 ポスター発表

場所: 岡山コンベンションセンター (岡山)

年月:平成 25 年 9 月 20-22 日

12) 井上 哲圭, 田口 裕子, 加野 小  
奈美, 中山 真彰, 大原 直也

題名: *Porphyromonas gingivalis* の薬剤排  
出ポンプ様分子をコードする遺伝子

学会名: 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・  
総会 ポスター発表

場所: 岡山コンベンションセンター (岡山)

年月:平成 25 年 9 月 20-22 日

13) 加野 小奈美, 井上 哲圭, 田口 裕  
子, 田川 淳平, 中山 真彰, 山城 隆, 大  
原 直也

題名: *Porphyromonas gingivalis* の  
PGN<sub>1202</sub> (rpoN) は必須遺伝子である

学会名：第 55 回歯科基礎医学会学術大会・  
総会 ポスター発表  
場所：岡山コンベンションセンター（岡山）  
年月：平成 25 年 9 月 20-22 日  
14）田口 裕子，佐藤 啓子，井上 哲  
圭，加野 小奈美，中山 真彰，前田 博史，  
中山 浩次，大原 直也  
題名：*Porphyromonas gingivalis* PGN\_1796  
は薬剤感受性に関与する  
学会名：第 55 回歯科基礎医学会学術大会・  
総会 ポスター発表  
場所：岡山コンベンションセンター（岡山）  
年月：平成 25 年 9 月 20-22 日  
15）中山 真彰  
題名：*Porphyromonas gingivalis* ジンジパ  
インによるPI3K/Akt 伝達経路の抑制  
学会名：第 1 回四大学研究会 口頭発表  
場所：鹿児島・西鉄ソラリアホテル 会議  
場 (20130802)，鹿児島大学歯学部 カンフ  
ァレンスルーム (20130803)  
年月：平成 25 年 8 月 2，3 日 (20130802-03)  
16）中山 真彰，内藤 真理子，中山 浩次，  
大原 直也  
題名：*P. gingivalis* ジンジパインによる  
PI3K/Akt 経路の抑制機序  
学会名：第 86 回日本細菌学会総会 ポスタ  
ー発表  
場所：千葉・幕張メッセ  
年月：平成 25 年 3 月 18-20 日 (20130318-20)  
17）井上 哲圭，中山 真彰，大原 直  
也  
題名：*Porphyromonas gingivalis* における  
薬剤排出ポンプ様遺伝子破壊株の薬剤感受  
性  
学会名：第 86 回日本細菌学会総会 ポスタ  
ー発表  
場所：千葉・幕張メッセ  
年月：平成 25 年 3 月 18-20 日 (20130318-20)  
18）中山 真彰，井上哲圭、内藤 真理子，  
中山 浩次，大原 直也  
題名：*P. gingivalis* ジンジパインによる  
Akt 制御機構とその意義  
学会名：第 65 回日本細菌学会中国・四国支  
部総会 口頭発表  
場所：徳島大学・長井記念ホール（徳島大学  
蔵本キャンパス）  
年月：平成 24 年 10 月 20，21 日  
(20121020-21)  
19）中山 真彰，井上哲圭、大原 直也  
題名：*Porphyromonas gingivalis*による  
Akt/GSK3beta pathwayの制御  
学会名：第 54 回歯科基礎医学会学術大会・  
総会 ポスター発表  
場所：奥羽大学（福島）  
年月：平成 24 年 9 月 14-16 日  
20）中山 真彰、藤田 佑貴、内藤 真  
真理子、中山 浩次、大原 直也  
題名：*Porphyromonas gingivalis*由来タンパ  
ク質HbRのIL-8産生誘導解析  
学会名：第 59 回毒素シンポジウム 口頭発

表  
場所：とかちプラザ  
年月：平成 24 年 8 月 30，31 日 (20120830-31)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
中山 真彰 (Nakayama Masaaki )  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔  
微生物学分野・助教  
研究者番号：10579105

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：