

令和 3 年 2 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462895

研究課題名(和文) 歯周病増悪因子Cot/Tp12を分子標的とした治療法を探る

研究課題名(英文) Research of Exacerbation Factor Cot/ tp12 as Molecular Target of Periodontitis Treatment

研究代表者

柿元 協子 (Kakimoto, Kyoko)

鹿児島大学・歯学部・助教

研究者番号：40274849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Cot/Tp12は病原体の感知受容体であるToll-like receptor (TLR)のシグナル下流に位置するセリンスレオニンキナーゼ(MAP3K)で、TLR4に結合するLPS(歯周病菌体成分)刺激による細胞内ERK活性化に必須である。Cot/Tp12のKOマウスを使った歯周病誘発モデルにより、Cot/Tp12が歯周病の増悪因子であることが示された。そこでLPSによるCot/Tp12の動態を確認したところ、他のMAP3Kと異なり、LPSで発現が誘導されること、ERK(MAPK)のシグナルを介していること、Cot/Tp12の遺伝子上流がLPS刺激による誘導に必要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病の治療薬は多くの研究がなされているが、いまだ決定的なものはない。我々は以前歯周病マウスモデルを、細胞内シグナル分子、Cot/Tp12(MAP3K)のノックアウトマウスで作成し、Cot/Tp12が歯周病増悪因子であることを明らかにした。今回の研究ではLPS(歯周病菌体成分)の刺激により、リン酸化によりシグナルを伝達するCot/Tp12が、それ自身の発現量を増大することを明らかにした。Cot/Tp12の増大が生じる細胞や、歯周病に与える影響を調べることで、Cot/Tp12をターゲットとした歯周病治療薬、歯周病予防薬などの開発の突破口を開くものと期待される。

研究成果の概要(英文)：MAP3K8/Cot/Tp12 is serine/threonine kinase and signaling molecule which controls cytokines production in antigen presenting cells (APC). We previously reported that mouse model of periodontitis using WT mice and Cot/Tp12 knockout mice. It showed that alveolar bone absorption of KO mice is lower than WT mice. It suggests the difference of sensitivity to LPS in both mice. LPS induced mRNA expression of Cot/Tp12 in 2h and decreased slowly. mRNA expression was inhibited by NF-κB inhibitor MG-132. Promoter assay suggested that -230～-50 promoter region containing three NF-κB binding sites is important for LPS-induced Cot/Tp12 mRNA expression. In conclusion, Cot/Tp12 mRNA expression is induced through NF-κB signal pathway.

研究分野：口腔生化学分野

キーワード：Cot/Tp12 歯周病 シグナル分子 LPS 増悪因子 発現調節

1. 研究開始当初の背景

Cot/Tp12 は病原体の感知レセプターである Toll-like receptor (TLR) のシグナル下流に位置するセリンスレオニンキナーゼで、TLR4 のリガンドである LPS 刺激による細胞内 ERK 活性化に必須の役割を果たす。

我々が作製した Cot/Tp12 の KO マウスを使った歯牙結索による細菌性歯周病誘発モデルにおいて、Cot/Tp12 の KO マウスは野生型マウスに比べて歯周病に著しい抵抗性を示した (Ohnishi, Kakimoto et al. J Dent Res. 2010)。これは Cot/Tp12 が歯周病の増悪因子であることを意味し、Cot/Tp12 が歯周病治療の分子標的として利用できる可能性を示唆した。Cot/Tp12 は我々を含めた複数の研究者による報告によって、免疫応答、骨代謝両面に多角的に関与するユニークなキナーゼ分子として知られている。

樹状細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞から抗原刺激を受けたナイーブ CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (T_H) は、サイトカイン産生能の異なる各サブセット ($T_H1/T_H2/T_H17/Treg$) に分化し、その分化方向の違いによって、誘導される免疫応答の性質が決定される。近年同定された T_H17 は IL-17 や TNF α などの炎症性サイトカインや破骨細胞分化を誘導する RANK を強く発現し、様々な慢性炎症や骨吸収に関与するとされる。

T_H 分化調節には抗原提示細胞が発現するサイトカインが重要で、IL-12 は T_H1 、IL-23 は T_H17 分化を促進する。IL-12 と IL-23 は同一のサイトカインファミリーに属し、共通のサブユニット (p40) と、固有のサブユニット (p35、p19) から構成される。

我々は KO マウスを使った実験から、Cot/Tp12 が抗原提示細胞における IL-12 産生を抑制し (Sugimoto, Matsuguchi et al. J. Clin. Invest. 2004)、p19 遺伝子発現と IL-23 産生に促進的に作用することを示した (Kakimoto et al. J. Physiol. Biochem. 2010)。よって、Cot/Tp12 は、抗原提示細胞における TLR 誘導性サイトカイン産生を、

IL-12 から IL-23 (およびそれに続く T_H17 免疫応答) へ切り替える (スイッチング) ことに関与することが明らかになった。

骨吸収は、破骨細胞分化誘導能を持つ骨芽細胞表面の RANKL の発現量によって調節される。

我々は以前、細菌感染に伴う LPS 等の TLR 刺激によって骨芽細胞の RANKL 発現が誘導されること (Kikuchi, Matsuguchi et al. J. Immunol. 2001)、また、Cot/Tp12 がこの RANKL 発現誘導に必須の役割を果たすことを示した (Kikuchi, Matsuguchi et al. J. Dent. Res. 2003)。

Cot/Tp12 の活性化は細菌感染に伴う抗原提示細胞からの IL-23 産生促進により、RANKL を発現する T_H17 細胞の分化誘導を介した歯槽骨吸収を誘導する可能性がある。一方 IL-23/ T_H17 系が破骨細胞分化抑制に働くとの報告も複数あり、IL-23/ T_H17 系の破骨細胞分化への影響の詳細は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

歯周組織の細胞の Cot/Tp12 の発現を確認する細胞について、歯周病における Cot/Tp12 のシグナル分子の発現の変化および発現調節を確認する。

3. 研究の方法

(1) J774,1 細胞株において、LPS で刺激をすると、Cot/Tp12 の発現が増加することが認められた。そこで、歯周病組織に存在するマクロファージ系の細胞が、歯周病原菌由来の菌体成分である LPS で Cot/Tp12 のプロテインレベルがどのように変化するのかを検討した。

(2) マウスの腹腔内にチオグリコレートを注入し、に遊走してきたマクロファージを採取し、LPS で刺激した際に Cot/Tp12 などのシグナル分子の mRNA の発現が上昇するかどうかを確認した。

(3) J774.1 細胞を LPS で刺激した際に Cot/Tpl2 のシグナルやその他のシグナル分子を阻害するインヒビターを用い、リアルタイム PCR 法を用い、Cot/Tpl2 の mRNA の発現に影響するかを確認した。

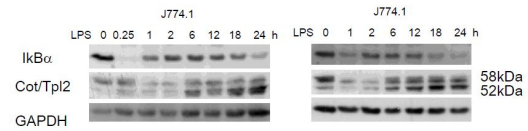
(4) Cot/Tpl2 の遺伝子のプロモーター領域を Luciferase 発現ベクターに挿入し、天敵因子の結合部位を同定した。

4. 研究結果

歯槽骨を吸収する働きを持つ破骨細胞は、血球系の未分化な細胞から分化する際と、破骨細胞が活性化して骨吸収を行う際に、骨の形成に働く骨芽細胞の表面に発現する RANKL の刺激を必要としている。我々は以前、骨芽細胞における Cot/Tpl2 が RANKL の発現に重要であること、歯周病モデルにおいて RANKL の発現誘導が歯槽骨の吸収に関与することを報告している。さらに、最近になって、RANKL の刺激が破骨細胞の分化を誘導する際に Cot/Tpl2 のシグナルが重要であることが報告された。したがって、Cot/Tpl2 は歯周病において骨芽細胞と破骨細胞の双方に働き、歯周病の増悪に関与することが示唆された。

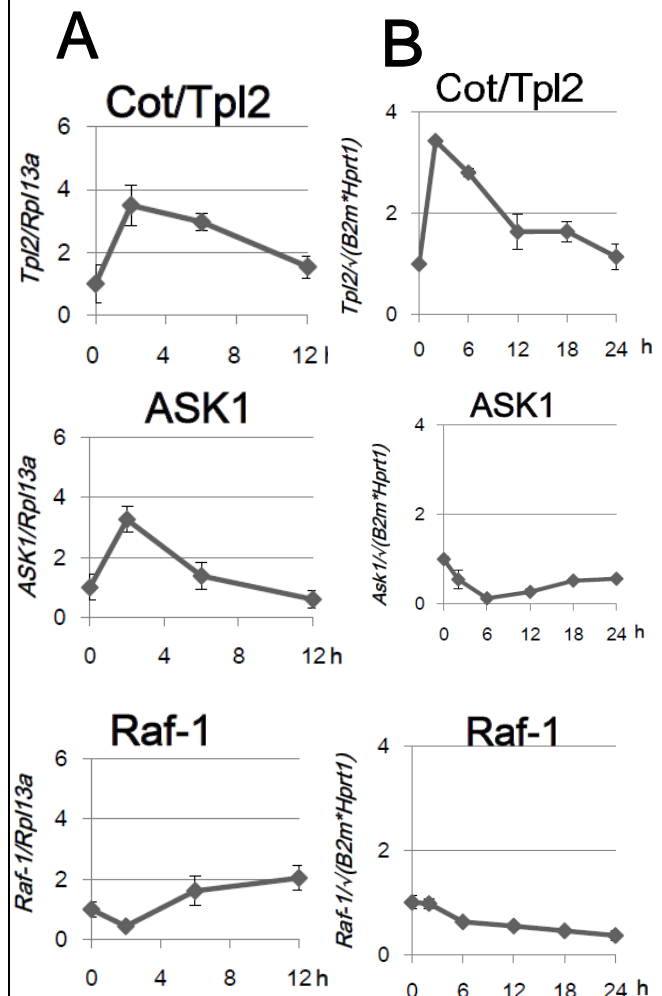
Cot/Tpl2 は歯周病原菌の菌体成分である LPS により活性化されると、その後分解されるユニークな MAP3K である。したがって、歯周病モデルにおいて LPS が Cot/Tpl2 のシグナルを減弱させ、歯周病の抑制に働く可能性も考えられた。そこで Cot/Tpl2 自身が歯周病原菌の菌体成分である LPS によってどのような動態変化を引き起こすのか、またそのメカニズムについて検討を行った。

(1) マウスのマクロファージ株である J774.1 細胞を LPS で刺激し、Cot/Tpl2 タンパク量の変化を観察した。



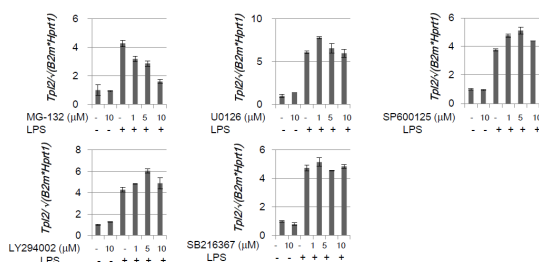
刺激後 1 時間後には Cot/Tpl2 のタンパク量は約 90% 近く減少した。しかしながら 6 時間後から 12 時間後にかけてほぼ刺激前と同程度にまで回復し、その後 24 時間までタンパク量の変化は認められなかった。また、Cot/Tpl2 には、転写開始部位の異なる、非活性型の分解されないアイソフォームが存在するが、これは 6 時間後から増加する傾向が認められた。これらの結果から、Cot/Tpl2 のタンパクは、LPS 刺激により活性化された後分解されるが、その後タンパクの発現が誘導されることにより、その量が維持されることが示唆された。

(2)



Tpl2 のタンパク量の維持のメカニズムを探るため、マウスから分離したマクロファージ(A)および J774.1 細胞(B)を LPS で刺激し、Cot/Tpl2 の mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法で確認したところ、刺激後、2 時間で発現が上昇した後減少し、24 時間後に刺激前のレベルにまで戻った。その他の MAP3K のほとんどが LPS により誘導されないか、もしくは低レベルの誘導しか認められなかった。

(3)



LPS による Cot/Tpl2 の発現に関わるシグナル分子を調べるため、インヒビターを用いた実験を行ったところ、NF-κB の活性化を抑制するプロテアソームインヒビター MG-132 でその発現が抑制された。

(4) Cot/Tpl2 遺伝子のプロモーター領域のレポーターアッセイにより、LPS で発現が誘導されることを確認した。

LPS 刺激による Cot/Tpl2 の発現誘導に関わる NF-κB 結合部位をより詳細に解析することを目的とした実験を行った。初めはまでの実験ではプロモーター領域の比較的上流の-630 から-430bp の間に存在する 2 か所の NF-κB 結合部位について調べてきた。しかしながらその後の実験により、もっと下流の-230 から-50bp の部位に存在する可能性が浮上した。そこで今までとは異なる解析ソフトにより、プロモーター領域に存在する NF-κB 結合部位の解析を行ったところ、NF-κB 結合部位と予想される新たな部位が、-230 から-50bp の間に 3 か所、-50bp から+86 の間に 1 か所の、計 4 か所が見つかった。そこで、-230 から-50bp の

間の 3 か所の NF-κB 結合部位について、変異を行った Luciferase 発現ベクターを作製した。今後どの部位が Cot/Tpl2 の発現誘導に重要であるかを調べるため、実験を行っているところである。

研究の目的では骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、抗原提示細胞における Cot-Tpl2 の役割を調べることにしていた。しかし、マクロファージやマクロファージ細胞株において LPS 刺激が Cot/Tpl2 の発現増大に働くことが明らかになったため、発現調節にターゲットを絞って実験を行った。

破骨細胞が存在する歯周病罹患部位には歯周病原菌の菌体成分 LPS が多く存在している。Cot/Tpl2 は他の MAP3K と異なり、LPS で活性化された後、分解されるため、Cot/Tpl2 のノックアウトマウスと野生型のマウスを用いた歯周病マウスモデルにおいて骨吸収に大きな差が生じることと矛盾していた。そこで Cot/Tpl2 のシグナルの破骨細胞における動態を確認するために、同じ血球系の細胞であるマクロファージを用いて、Cot/Tpl2 タンパクの動態を確認しようとした。しかし、Cot/Tpl2 のタンパクを検出するための抗体の質が悪く、Cot/Tpl2 の細胞での発現や LPS 刺激後の動態のほか、今後の研究に必要な Cot/Tpl2 発現ベクターが機能しているかどうかも判定できず、苦労していた。しかし、最近になって感度の高い抗体が手に入り、LPS 刺激をしていない定常状態での Cot/Tpl2 のタンパク発現も確認できるようになり、実験のスピードアップが可能となった。今後、マウスから採取した初代培養細胞を用いた実験を行うことを予定している。

今後は、Cot/Tpl2 を高感度に検出できる抗体が手に入ったので、培養細胞や初代培養細胞における Cot/Tpl2 タンパクの発現の変化の検出、歯周病マウスモデルでの組

組織切片の染色が容易になった。さらに当講座の所属する研究施設にフローサイトメトリーが導入されたため、細胞の純度の測定や、特定の細胞におけるタンパク発現の確認などが容易にできるようになった。

今後は当講座が所有する Cot/Tpl2 マウス、DUSP16 ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを用いた歯周病マウスモデルを作成し、組織切片の作成や染色を行いたい。また、免疫提示細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞などの初代培養細胞における RANKL の発現や分化マーカーのタンパク発現量の違いなどをフローサイトメトリーで確認していきたい。さらに Cot/Tpl2 の歯周病治療の分子標的としての可能性を探るため、歯周病モデルマウスの治療を行う実験を行いたい。

さらに、様々な菌体成分が、NF- κ B 結合部位を介して Cot/Tpl2 遺伝子発現に与える影響について明らかにしたいと考えている。さらに、歯周組織由来の様々な細胞株および初代培養細胞などにおける発現調節についても同様な結果になるかどうかを確認していきたい。このことにより、どの細胞が Cot/Tpl2 を介した歯周病の増悪により強く関与しているかの予測が得られると同時に、歯周病モデルにおける Cot/Tpl2 遺伝子発現状況との相関性をより詳細に解析することが可能となる。Cot/Tpl2 の歯周病治療の分子標的とするだけでなく、どの細胞をターゲットとした治療法を行うかということも視野に入れた実験を今後も行っていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Kusuyama J., Bandow K., Ohnishi T., Hisadome M., Shima K., Semba I., Matsuguchi T. Osteopontin inhibits osteoblast responsiveness through the

downregulation of focal adhesion kinase mediated by the induction of low molecular weight-protein tyrosine phosphatase. *Mol. Biol. Cell.* 2017 Mar 22. pii: mbc.E16-10-07 doi:10.1091/mbc.E16-10-0716 査読有

2. Hisadome M., Ohnishi T., Kakimoto K., Kusuyama J., Bandow K., Kanekura T., Matsuguchi T. Hepatocyte growth Factor reduces CXCL10 expression in keratinocytes. *FEBS Lett.* 2016 Oct;590(20):3595-3605. doi: 10.1002/1873-3468.12452. Epub 2016 Oct 18. 査読有
3. Maeda A, Bandow K., Kusuyama J, Kakimoto K., Ohnishi T., Miyawaki S, Matsuguchi T. Induction of CXCL2 and CCL2 by pressure force requires IL-1 β -MyD88 axis in osteoblasts. *Bone.* 2015; 74: 76-82. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1. Matsuguchi T.: Dynamic regulation of bone metabolism. Professional Talk Series (招待講演) 2016年7月23日 Universiti Teknologi MARA (Selangor, Malaysia)
2. 大西智和、楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、松口徹也: 骨芽細胞分化による ATP 産生経路の呼吸鎖から解糖系への移行 第88回日本生化学学会大会 2015年12月1日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
3. 楠山譲二、坂東健二郎、大西智和、仙波伊知郎、松口徹也: p46JNK2 の構成的活性は脂肪分化前期における C/EBPd の発現に必須である 第57回歯科基礎医学会 2015年9月11日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)
4. 楠山譲二、成昌ファン、坂東健二郎、柿

元協子、大西智和、松口徹也：LIPUS
による間葉系幹細胞の未分化能の維持
第 18 回超音波骨折治療研究会、2015 年
1 月 17 日、ANA クラウンプラザホテル
神戸（兵庫県神戸市）

5. 坂東健二郎、楠山譲二、大西智和、柿元
協子、松口徹也：軟骨細胞分化における
AMP-activated kinase の役割 第 37 回
日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
25 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜
市）

6. 楠山譲二、坂東健二郎、社本光央、柿元
協子、大西智和、松口徹也：オステオポ
ンチンは LMW-PTP を介して骨芽細胞
の生理的応答性に影響を与える 第 56
回日本歯科基礎医学会、2014 年 9 月 25
日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

7. Kyoko Kakimoto , Joji Kusuyama , Kenjirow
Bandow , Tomokazu Ohnishi , Tetsuya
Matsuguchi MAP3K8/Cot/Tpl2 signaling
molecule is degraded by LPS stimulation,
and recovered by induction of mRNA
expression through NF- κ B signal pathway
in macrophages 第 57 回歯科基礎医学会
学術大会 2015 年 9 月 11 日～9 月 13 日
朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンタ
ー)(新潟県新潟市)

8. 骨芽細胞分化による ATP 産生経路の呼
吸鎖から解糖系への移行 Switch of
metabolic pathway for ATP
production from respiratory chain to
glycolysis during osteoblast
differentiation 大西智和、楠山譲二、
坂東健二郎、柿元協子、松口徹也、神戸
ポートアイランド（兵庫県神戸市）日
本生化学会、2015 年 12 月 1 日～12 月
4 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿元 協子 (KAKIMOTO, Kyoko)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：40274849

(2) 研究分担者

松口 徹也 (MATSUGUCHI, Tetsuya)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：10303629

大西 智和 (OHNISHI, Tomokazu)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：30244247

坂東 健二郎 (BANDOW, Kenjiro)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：50347093

(3) 連携研究者

該当なし。

(4) 研究協力者

該当なし。