

研究者：竹内 洋輝（所属：大阪大学歯学部附属病院 予防歯科）

研究題目：歯肉上皮細胞に侵入した歯周病原性細菌の細胞内動態の解析

目的：

近年、歯周組織の細胞に歯周病細菌が侵入し、細胞障害性を発揮することが歯周病の慢性化と進行に寄与していると考えられている。しかし、宿主細胞は侵入した細菌を殺菌し分解する機能を有する。この機能は、メンブレントラフィックの自然免疫における役割と考えられる。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神経系や免疫系などの高次生体機能を支える。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知られている。さらに近年、歯周細胞などの非貪食細胞でも、メンブレントラフィックのエンドサイトーシス経路を利用し細菌貪食を行い、自然免疫に貢献していると推測されている。また、もう1つのメンブレントラフィックであるオートファジーは、細胞質の不要成分をオートファゴソームという膜構造で包み分解する機能であるが、細胞質に存在する細菌も捕獲・分解することが知られている。最近まで、非貪食細胞の細菌貪食はエンドサイトーシス経路やオートファジー経路に依存し、この経路を逃れた細菌が宿主細胞から脱出する手段はないと考えられてきた。歯周病関連細菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* は歯肉上皮細胞に侵入することが知られているが、宿主細胞内での分解を回避することで非貪食細胞内に生息し、歯周病の慢性化を図っている可能性がある。そこで本研究では、歯肉上皮細胞内の輸送小胞の融合に関わるタンパク質に焦点を当て、*P. gingivalis* の細胞内動態の転機を決める宿主細胞の分子機構を明らかにすることを目的とする。

対象および方法：

P. gingivalis はエンドサイトーシス経路やオートファジー経路を中心とした細胞内防御機構を回避し、細胞外へ脱出することで、歯周病の慢性化を図ると申請者は推測した。そこで、*P. gingivalis* を含んだ初期エンドソームと種々の細胞内オルガネラとの融合に必要なタンパク質として、細胞内小胞輸送における膜融合に関与する SNARE タンパク質の1つである VAMP2 に焦点を当て、機能解析を以下の方法で行った。

- ① 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* と VAMP2 との局在を共焦点顕微鏡で観察
- ② 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への VAMP2 の関与を、当該遺伝子のノックダウンを用いた Colony formation unit (CFU) assay または共焦点顕微鏡で評価

結果および考察：

- ① 融合蛋白である mCherry-VAMP2 を歯肉上皮細胞に発現させ *P. gingivalis* を感染させた結果、VAMP2 と *P. gingivalis* の共局在を確認し (Figure 1)、その共局在率は感染後5時間まで経時的に減少した。また、歯肉上皮細胞において VAMP2 は初期エンドソームのマーカーである EGFP-2xFYVE、およびリサイクリング経路の制御タンパク質の1つである Rab4A と良く共局在した。

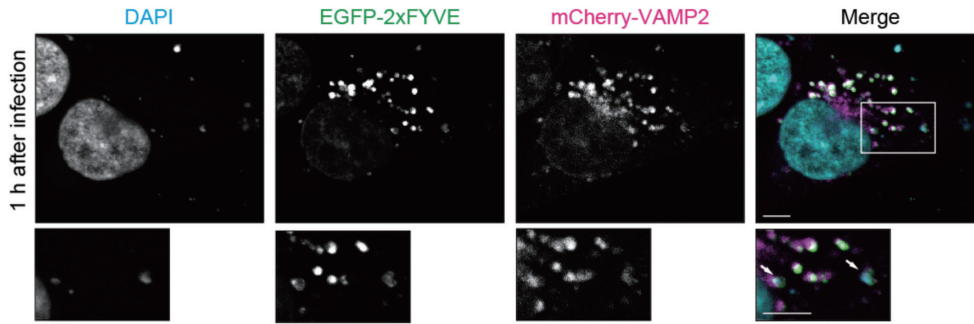


Figure 1. Co-localization of intracellular *P. gingivalis* with VAMP2. Human immortalized gingival epithelial (HIGE) cells expressing EGFP-2xFYVE (green) and mCherry-VAMP2 (magenta) were infected with *P. gingivalis* ATCC 33277 (cyan) for 1 h. HIGE cells were fixed, stained with DAPI, and analyzed using confocal microscopy. Bars, 5 μ m.

② 歯肉上皮細胞において VAMP2 をノックダウンさせ *P. gingivalis* を感染させると、感染後 4 時間において宿主細胞内の生菌数の増加、および感染後 6 時間において培養培地中の生菌数の減少を認めた。また、VAMP2 をノックダウンした歯肉上皮細胞では、感染後 5 時間において EGFP-2xFYVE と *P. gingivalis* の共局在率の増加を認めた (Figure 2)。

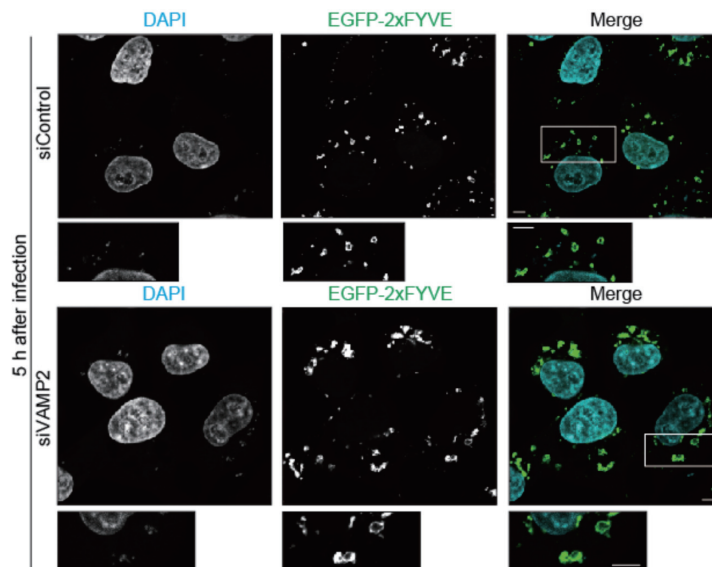


Figure 2. Effects of VAMP2-knockdown on early endosomes containing *P. gingivalis*. HIGE cells expressing EGFP-2xFYVE (green) were treated with RNAi control or RNAi oligonucleotides against VAMP2, infected with *P. gingivalis* ATCC 33277 (cyan) for 1 h, and incubated for 4 h (5 h after infection). HIGE cells were fixed, stained with DAPI, and analyzed using confocal microscopy. Bars, 5 μ m.

これらの結果から、歯肉上皮細胞において VAMP2 は *P. gingivalis* を含む初期エンドソームに存在し、さらに初期エンドソームから他オルガネラへの繫留や融合を調節している可能性がある。さらに、VAMP2 は歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出に関与している可能性が明らかとなった。

成果発表：

学術雑誌

1. Takeuchi H, Amano A. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* exits from gingival epithelial cells via recycling pathways. *J Osaka Univ Dent Soc*, 59 : 13-15, 2014.
2. Amano A, Kuboniwa M, Takeuchi H. Transcellular invasive mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* in host-parasite interactions. *J Oral Biosci*, 56 : 58-62, 2014.

ポスター発表

3. Takeuchi H, Takada A, Amano A. Involvement of VAMP2 in intracellular localization of *Porphyromonas gingivalis*. International Association of Dental Research General Session & Exhibition, 2014/6/28, Cape Town, South Africa.
4. Takeuchi H, Amano A. Involvement of VAMP2 in intracellular localization of *Porphyromonas gingivalis* in recycling endosomes. 56th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology, 2014/9/27, Fukuoka, Japan.
5. Takeuchi H, Amano A. Involvement of Rab4A and VAMP2 in intracellular *Porphyromonas gingivalis* in gingival epithelial cells. 62nd Annual Meeting of Japanese Association of Dental Research, 2014/12/5, Osaka, Japan.

受賞

6. Takeuchi H. JADR/GC Young Investigator Award, 62nd Annual Meeting of Japanese Association of Dental Research, 2014/12/5, Osaka Japan.