

歯周病原細菌に対する自然免疫応答がもたらす慢性炎症と生体バリア破綻

多田 浩之

東北大学大学院歯学研究科口腔分子制御学分野

Periodontal bacteria induce innate immune response, resulting in induction of the chronic inflammation and the mucosal barrier dysfunction

Hiroyuki Tada

Division of Oral Immunology, Tohoku University Graduate School of Dentistry

Abstract

Periodontal disease is one of the major diseases afflicting human beings and is caused by a bacterial infection leading to gingival inflammation, periodontal tissue destruction, alveolar bone loss, and eventually to tooth loss. Chronic periodontitis is one of the major periodontal diseases, and the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* is frequently isolated from diseased sites in the patients with this disease. The major virulence factors produced by *P. gingivalis* induce cysteine proteinases, gingipains. We found that gingipains cleave CD14 on human monocytes and human gingival fibroblasts and ICAM-1 on human gingival epithelial cells, resulting in immune evasion by the bacterium in periodontal tissues. Furthermore, gingipains are capable of inducing the production of proinflammatory molecules, such as IL-33 by human gingival epithelial cells, and IL-31 by human mast cells. *Porphyromonas gingivalis*-induced IL-33 and IL-31 attenuated the production of LL-37, an antimicrobial peptide, and the expression of claudin-1, a tight junction molecule, respectively, in gingival epithelial cells. These findings suggest that IL-33 and IL-31 induced by gingipains resulted in the induction of chronic inflammation and the dysfunction of epithelial barrier. On the basis of our findings, the pathogenicity of gingipains is divided into two phases : (a) the acute inflammation during severe infection, where *P. gingivalis* produces a large amount of gingipains resulting in the proteolytic degradation of the host molecules, and (b) chronic inflammation during mild infection, where *P. gingivalis* produce a small amount of gingipains, resulting in the induction of chronic inflammatory conditions and the consequent impairment of innate immunity.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 7~11, 2020

Key words : 歯周病, *Porphyromonas gingivalis*, ジンジパイン, 慢性炎症, 生体バリア破綻

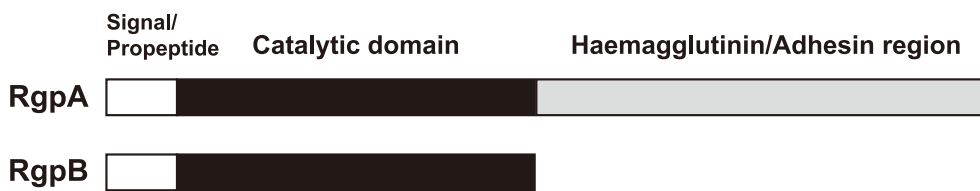
はじめに

歯周病は、口腔に常在する歯周病原細菌による感染症の総称である。歯周病は歯周組織の炎症を主徴とするが、近年は糖尿病、アルツハイマー病、関節リウマチや動脈硬化性疾患など全身疾患の病態形成に影響を及ぼすことが証明されつつあり注目されている。

歯周病は、歯周組織の破壊を伴わない歯肉炎と歯周組織の不可逆的な破壊により歯の喪失に至る歯周炎に大別され、歯周炎は30歳以上の成人が罹患する慢性歯周炎と比較的若年者に好発する侵襲性歯周炎に二分される。ア

メリカ歯周病学会は、2018年に歯周炎の分類から慢性歯周炎と侵襲性歯周炎の別を廃止する改定を行い、歯周組織の破壊度を量的に4段階で評価する“stage”と歯周組織破壊の速度、デンタルプラークバイオフィルムの病原性、全身疾患ならびに喫煙や糖尿病など生活習慣が及ぼす歯周組織破壊の速度にかかわるリスクファクターを3段階で評価する“grade”の2つのカテゴリーを設けた¹⁾。この新たな分類は、歯周病の病態がデンタルプラークバイオフィルムを構成する歯周病原細菌の種類と病原因子、全身疾患、遺伝性疾患ならびに生活習慣などにより修飾されることを受けており、歯周病が通常の感染症と

Gingipain-R (Arg-gingipain, Rgp)



Gingipain-K (Lys-gingipain, Kgp)



図 1 ジンジパインの構造

は異なる複合的な要素で構築されることを示している。

1. 歯周病と歯周病原細菌

口腔細菌叢は出生と同時に定着を始め、口腔内環境や加齢に伴う感染防御能の低下により変遷する。16S rRNA クローニング解析から、ヒト口腔細菌叢は約 1,000 種を超える細菌で構成される²⁾。歯と歯肉の境界に位置する歯肉溝には、1 mg あたり 1 億個を超え約 400 種類から成るデンタルプラークバイオフィルムが局在し、直接的に歯周病とう蝕を引き起こし、間接的に糖尿病、アルツハイマー病、関節リウマチや動脈硬化性疾患など他臓器の病態に影響を及ぼす。

歯周病原細菌のなかで red complex に分類される *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* と *Treponema denticola* の 3 菌種は、重度の慢性歯周炎罹患者に高頻度で検出され³⁾、その病原因子は歯周炎の惹起と進行に大きく影響する⁴⁾。とくにグラム陰性偏性嫌気性桿菌である *P. gingivalis* は、トリプシン様システインプロテアーゼであるジンジパインを始め、リポ多糖 lipopolysaccharide (LPS)、リポタンパク質、線毛や peptidyl arginine deiminase (PAD) など多様なビルレンス因子により自然免疫応答ならびに獲得免疫応答を誘導する⁵⁾。歯周炎の臨床症状はトリプシン様プロテアーゼ活性と相関を示すことから、ジンジパインは本菌の主要な病原因子である。ジンジパインは *P. gingivalis* の総プロテアーゼ活性の少なくとも 85% を占め、宿主タンパク質のアルギニン残基の C 末端側を切断する gingipain-R (Rgp) とリジン残基の C 末端側を切断する gingipain-K (Kgp) に大別される⁶⁾。すべてのジンジパインは signal/propeptide と酵素活性を有する catalytic domain から構成され、さらに RgpA と Kgp は本菌と宿主細胞の接着を担う赤血球凝集/接着活性領域 (haemagglutinin/adhesin region) を持つ (図 1)。*P. gingivalis* は糖分解能を持たず鉄要求性を示すことから、ジンジパインによる宿主タンパク質の分解は本菌の代謝や赤血球からのヘム鉄の摂取に必須となる。歯周炎の臨床経過は、歯周ポ

ケットからの出血ならびに急激な歯肉腫脹を示す急性発作期と、軽微な炎症が長期間持続する慢性期が繰り返され、この反復により歯周組織は徐々に破壊される。急性発作期の歯周ポケットの出血は本菌に格好の発育条件となり、歯周ポケット内のジンジパイン濃度は上昇する。

P. gingivalis は免疫応答を攪乱するという特殊な病原性を示すことから、キーストーン病原体と提唱されている⁷⁾。例えば *Salmonella enterica* serovar Typhimurium のように一般的な細菌感染症では、始めに病原菌自身が増殖し次に病原因子を放出することで疾患が惹起されるのに対し、*P. gingivalis* はジンジパインにより免疫応答を攪乱することで dysbiosis を誘導し疾患を惹起する。

2. ジンジパインによる自然免疫関連分子の分解

2-1. ジンジパインによる CD14 分解と LPS 不応答性の誘導

われわれはジンジパインによる自然免疫応答の攪乱と慢性炎症の誘導について研究に取り組んできた。始めにジンジパインが自然免疫にかかわる宿主分子を破壊する可能性に着目し、ジンジパインはヒト単球やヒト歯肉線維芽細胞の LPS 受容体 CD14 をタンパク分解し、LPS による炎症性サイトカイン産生を喪失させることを見出した^{8,9)}。ジンジパインによる CD14 分解作用には選択性があり、CD14 と同様に GPI アンカー型分子である CD59 や CD157 は分解されず、TLR4 もまた分解を受けなかった。CD14 は LPS、リポタンパク質やリポタイコ酸など多様な菌体成分をパターン認識する受容体であることから、ジンジパインによる CD14 分解は、本菌における自然免疫応答の回避と持続的感染を維持するために必要な戦略と捉えられる。また、ジンジパインはヒト血管内皮細胞の AKT や RIPK1 をタンパク分解し、下流のサイトカイン産生を減弱させることで自然免疫の活性化も抑制させる¹⁰⁾。

2-2. ジンジパインによる ICAM-1 分解と LPS 不応答性の誘導

細胞接着分子や上皮細胞バリアもジンジパインのターゲットとなる。ジンジパインはヒト歯肉上皮細胞に発現する接着分子である ICAM-1 を分解することで ICAM-1-LFA-1 を介する歯肉上皮細胞と好中球の細胞接着を阻害し、好中球の炎症局所への遊走を抑制する¹¹⁾。また、ジンジパインは上皮細胞バリアを担うタイトジャンクション分子の junctional adhesion molecule-1 を分解し、上皮内への LPS 侵入を可能にする¹²⁾。

ジンジパインによる宿主分子群のタンパク分解は、高濃度のジンジパインを要する。つまり、歯周炎の急性発作期において増殖した *P. gingivalis* はジンジパインにより自然免疫の認識回避と上皮バリア破綻を誘導し、持続的な感染へ移行すると考えられる。

3. ジンジパインによる自然免疫におけるアレルギー炎症誘導と生体バリア破綻

3-1. ジンジパインによる歯肉上皮細胞の IL-33 誘導

ジンジパインは宿主分子をタンパク分解する以外に、宿主細胞を活性化させ炎症も誘導する。次に、われわれはジンジパインによるアレルギー炎症の誘導について検討した。アレルギー炎症は、上皮細胞から産生される IL-33、IL-25 ならびに TSLP などが肥満細胞、好酸球や好塩基球などに作用して惹起される¹³⁾。アレルギー炎症を惹起する多くの自然アレルゲンはプロテアーゼ活性を持ち、protease-activated receptors (PARs) を介して細胞を活性化させる。核内に局在する IL-1 ファミリーサイトカイン IL-33 は Th2 型炎症を誘導し、気管支喘息、炎症性腸疾患や慢性関節リウマチなどにおけるアレルギー炎症の誘導にかかわる。ジンジパインは口腔上皮細胞に発現する PAR により認識され¹⁴⁾、歯周炎罹患者の歯肉溝浸出液では PAR-2 mRNA 発現が亢進する¹⁵⁾ことから、PAR-2 発現レベルは歯周炎の炎症症状と相関する。われわれは、慢性歯周炎罹患者の炎症歯肉上皮に IL-33 が発現し、ジンジパイン刺激によりヒト歯肉上皮細胞は IL-33、IL-25 ならびに TSLP 産生することを示した¹⁶⁾。しかしながら、歯肉上皮細胞の IL-33 細胞外放出は微量であり、蛍光免疫染色において IL-33 は *P. gingivails* 刺激により核内から細胞質へ移行したことから、IL-33 は歯肉上皮細胞の生体バリア機能を減弱させる可能性について検討した。その結果、IL-33 は *P. gingivalis* 感染による歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチドである LL-37 産生を著明に減弱させることを見出した¹⁷⁾。ジンジパインは LL-37 をタンパク分解するが、唾液存在下では同作用が抑制される¹⁸⁾ことから、ジンジパインによる歯肉上皮細胞の IL-33 誘導は、合目的的に *P. gingivalis* が歯肉上皮細胞の化学的バリアによる排除を逃れるメカニズムと捉えられる。

3-2. ジンジパインによるマスト細胞の IL-31 誘導

慢性歯周炎では炎症歯周組織にマスト細胞が集積するが¹⁹⁾、慢性歯周炎におけるマスト細胞の役割は不明である。われわれは歯周炎マウスモデルを用いた実験から、*P. gingivalis* 口腔感染により歯肉の IL-31 発現が亢進することを見出した²⁰⁾。IL-6 ファミリーサイトカインである IL-31 は、皮膚、肺や腸管などに発現し、Th2 細胞、マスト細胞、単球/マクロファージや樹状細胞などから産生され慢性炎症性疾患の惹起にかかわる²¹⁾。*P. gingivalis* 感染による IL-31 誘導はマスト細胞欠損マウスではみられず、ヒトマスト細胞株を *P. gingivalis* で刺激するとジンジパイン依存的に IL-31 が産生された²⁰⁾ことから、ジンジパインはマスト細胞に IL-31 産生を誘導することが明らかとなった。加えて、歯肉上皮細胞は構成的に IL-31 受容体を発現し、同細胞に IL-31 が作用すると歯肉上皮バリアを構成するタイトジャンクション分子 claudin-1 発現が減弱し、歯肉上皮バリア機能は低下した²⁰⁾。歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* を重度 (MOI 1,000) で感染させると、高濃度ジンジパインのプロテアーゼ活性により claudin-1 は分解される²²⁾のに対して、軽度の感染 (MOI 1) では低濃度ジンジパインにより claudin-1 発現は亢進する²⁰⁾。しかしながら、*P. gingivalis* は低濃度ジンジパインでマスト細胞から IL-31 産生を誘導することができ、claudin-1 発現を減弱させ上皮バリア破綻を導く。

これらの知見から、*P. gingivalis* が増殖する急性発作期では歯周ポケット内のジンジパイン濃度が高まり、宿主分子群 (受容体、炎症性サイトカイン、補体や抗体など) はタンパク分解されることで自然免疫応答が攪乱される。一方、*P. gingivalis* 感染が軽度になる慢性期では低濃度のジンジパインにより宿主細胞が活性化され、アレルギー炎症 (IL-33 や IL-31) や neutrophil extracellular traps 誘導など免疫応答を巧妙に操る。その結果、慢性炎症と生体バリア破綻に至ると考える (図 2)。

4. ジンジパインと全身疾患

歯周病原細菌は、糖尿病、アルツハイマー病、関節リウマチや動脈硬化性疾患など他臓器の病態形成に影響を及ぼす報告²³⁾に大きな関心が寄せられている。本稿で個々の詳細は言及できないが、*P. gingivalis* が産生する PAD は関節リウマチを悪化させ、PAD を欠損する *P. gingivalis* では関節リウマチマウスモデルのコラーゲン誘導関節炎における病態悪化がみられない²⁴⁾。他方、アルツハイマー病罹患者の脳にはジンジパインが蓄積し、ジンジパインはタウのタンパク分解による神経細胞障害ならびにアミロイド β 42 生成を誘導する²⁵⁾ことが報告された。加えて、*P. gingivalis* 口腔感染マウスモデルにおける脳へのジンジパイン蓄積は、ジンジパイン阻害薬により抑止されることが示された。アルツハイマー病は根

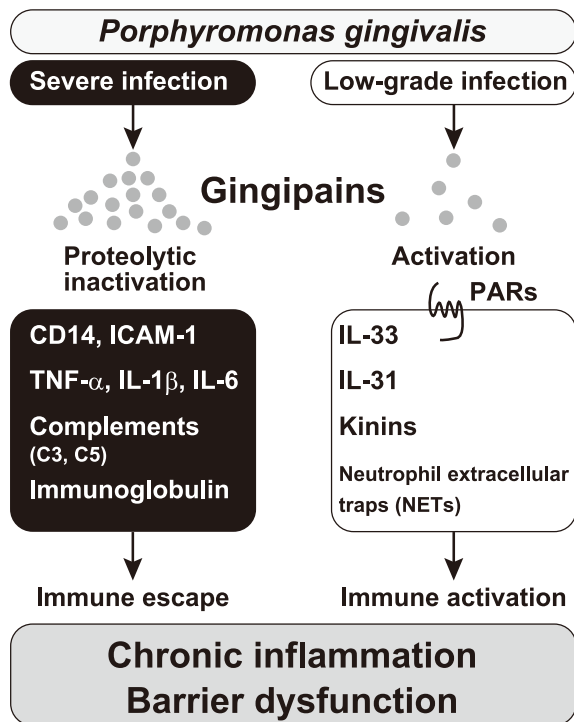


図 2 ジンジパインによる自然免疫応答がもたらす慢性炎症と生体バリア破綻

治的治療薬が無く、エステラーゼ阻害薬の効果は病状進行の遅延に留まることから、ジンジパインは有効な治療ターゲットとなる可能性がある。現在、米国ではアルツハイマー病患者に対するジンジパイン阻害薬の第Ⅱ/Ⅲ相試験が実施されており、将来的に歯周病治療がアルツハイマー病を含む全身疾患の発症予防となる時代の到来が期待される。

おわりに

近年の多くの研究成果により口腔細菌による免疫応答が解明され、歯周病の病態形成に歯周病原細菌の病原因子が深くかかわることが証明された。今後、歯周病原細菌の病原因子がどのように歯周病と全身疾患や生活習慣に双方向的に影響を及ぼすかを解明するの必要があり、新たな展開が予測される。歯周病と全身疾患のかかわりが明らかにされることで、今後予知性の高い診断と治療が開発されると考える。

謝辞

第25回日本エンドトキシン・自然免疫研究会において日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞を受賞するにあたり、受賞対象となった自然免疫に関する一連の研究は多くの研究機関との共同研究により実施されたものであり、さまざまなご助力をいただいた多くの共同研究者の方々に心から感謝する。最後に、ジンジパイン研究に着手する機会を与えていただいた高田春比古博士、菅原俊二博士（東北

大学大学院歯学研究科）ならびに松下健二博士（国立長寿医療研究センター）に深甚なる感謝を捧げる。

文献

- 1) Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. : A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. J Clin Periodontol 45 : S1-S8, 2018
- 2) Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. : The human oral microbiome. J Bacteriol 192 : 5002-5017, 2010
- 3) Socransky SS, Haffajee AD : Dental biofilms : difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 28 : 12-55, 2002
- 4) Feres M, Teles F, Teles R, et al. : The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. Periodontol 2000 72 : 30-53, 2016
- 5) Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC : Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. Periodontol 2000 52 : 218-237, 2010
- 6) Pike R, McGraw W, Potempa J, et al. : Lysine- and Arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. J Biol Chem 269 : 406-411, 1994
- 7) Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA : The key-stone-pathogen hypothesis. Nat Rev Microbiol 10 : 717-725, 2012
- 8) Sugawara S, Nemoto E, Tada H, et al. : Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. J Immunol 165 : 411-418, 2000
- 9) Tada H, Sugawara S, Nemoto E, et al. : Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. Infect Immun 70 : 3304-3307, 2002
- 10) Barth K, Genco CA : Microbial degradation of cellular kinases impairs innate immune signaling and paracrine TNF α responses. Sci Rep 6 : 34656, 2016
- 11) Tada H, Sugawara S, Nemoto E, et al. : Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains. J Dent Res 82 : 796-801, 2003
- 12) Takeuchi H, Sasaki N, Yamaga S, et al. : *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1. PLoS Pathog 15 : e1008124, 2019
- 13) Saenz SA, Taylor BC, Artis D : Welcome to the neighborhood : epithelial cell-derived cytokines license

- innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev* 226 : 172-190, 2008
- 14) Loubakos A, Potempa J, Travis J, et al. : Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun* 69 : 5121-5130, 2001
 - 15) Holzhausen M, Cortelli JR, da Silva VA, et al. : Protease-activated receptor-2 (PAR2) in human periodontitis. *J Dent Res* 89 : 948-953, 2010
 - 16) Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, et al. : *Porphyromonas gingivalis* gingipain-dependently enhances IL-33 production in human gingival epithelial cells. *PLoS One* 11 : e0152794, 2016
 - 17) Tada H, Shimizu T, Matsushita K, et al. : *Porphyromonas gingivalis*-induced IL-33 down-regulates hCAP-18/LL-37 production in human gingival epithelial cells. *Biomed Res* 38 : 167-173, 2017
 - 18) Gutner M, Chaushu S, Balter D, et al. : Saliva enables the antimicrobial activity of LL-37 in the presence of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 77 : 5558-5563, 2009
 - 19) Steinvoll S, Halstensen TS, Schenck K : Extensive expression of TGF- β 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol* 26 : 366-373, 1999
 - 20) Tada H, Nishioka T, Takase A, et al. : *Porphyromonas gingivalis* induces the production of interleukin-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier. *Cell Microbiol* 21 : e12972, 2019
 - 21) Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, et al. : Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5 : 752-760, 2004
 - 22) Groeger SE, Meyle J : Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol* 2000 69 : 46-67, 2015
 - 23) Olsen I, Potempa J : Strategies for the inhibition of gingipains for the potential treatment of periodontitis and associated systemic diseases. *J Oral Microbiol* 6 : 24800, 2014
 - 24) Sakkas LI, Daoussis D, Lioussis SN, et al. : The infectious basis of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Front Microbiol* 8 : 1853, 2017
 - 25) Dominy SS, Lynch C, Ermini F, et al. : *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains : evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv* 5 : eaau3333, 2019