

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：44419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11020

研究課題名(和文) 口腔自然免疫SLPIの感染制御機構としての歯周病原性細菌の組織侵入抑制作用

研究課題名(英文) Infection control with secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) via the inhibitory effect on the invasion of periodontopathic bacteria across gingival epithelial barrier

研究代表者

木村 重信 (Kimura, Shigenobu)

関西女子短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：10177917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では定量実験法を用いて歯周病原細菌の上皮バリア突破能を明らかにするとともに、SLPIによる抑制作用について検討した。その結果、今回用いたすべての歯周病原細菌は有意の上皮バリア突破能を有していること、そのルートは*P. gingivalis*が両ルートを、その他の菌ではtranscellularルートが主要ルートであることが明らかとなった。SLPIは*P. gingivalis*のジンジパイン活性を一部阻害したが、*P. gingivalis*の組織内侵入に対する明確な抑制作用は認められなかった。それ故、SLPIは単独で歯周病原細菌の組織侵入を抑制して感染制御に働くには十分でないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study using the quantitation assays of bacteria and FITC-dextran, we assessed the invasion mechanism of the periodontopathic bacteria across gingival epithelial barrier through two putative routes (transcellular and paracellular routes), and assessed the inhibitory effect of the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI). The results indicated that all the periodontopathic bacteria tested could invade significantly across gingival epithelial barrier through the transcellular route, although *P. gingivalis* utilized the both routes. The SLPI could not show the inhibitory effect on the invasion of *P. gingivalis* across gingival epithelial barrier, whereas SLPI showed a direct inhibitory effect on the *P. gingivalis* protease of Lys-gingipain. Thus, the infection control with SLPI by itself could not be sufficient for the bacterial invasion across gingival epithelial barrier.

研究分野：医歯薬学

キーワード：SLPI 感染制御 歯周病原細菌 組織侵入抑制作用

1. 研究開始当初の背景

分泌型白血球プロテアーゼインヒビター, SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) は口腔を含む粘膜系での病原微生物に対する感染防御を担う自然免疫として機能する生体因子であることが示唆されている。我々はこれまで、歯肉上皮細胞が SLPI 産生細胞の一つとして機能すること、その SLPI 産生は *Porphyromonas gingivalis* の感染刺激を通して反応性に増強されることを明らかにしてきたが、さらに最近の研究から、SLPI は *P. gingivalis* のジンジパイン活性を阻害するとの成績を得た (Ishikawa ら; 2010)。ジンジパインは *P. gingivalis* の組織内侵入にも重要な役割を演じていることが示唆されており、*P. gingivalis* をはじめとする歯周病原細菌の組織侵入は、全身疾患のリスクファクターとなる可能性がある。実際、急性冠症候群、大動脈瘤、慢性関節リウマチ、非アルコール性肝炎では病巣への歯周病原細菌の感染/組織侵入が報告されているほか、逆説的ながらも、歯周炎かつ 2 型糖尿病の患者に歯周治療のみを行うことで血糖値が改善することから、歯周炎が 2 型糖尿病のリスクファクターとなっている可能性が強く示唆されている (Grossi ら; 1997, Jones ら; 2007)。そこで本研究では、プロテアーゼ阻害を介した歯周病原細菌の歯肉上皮バリア突破/組織内侵入に対する SLPI の抑制作用という点に焦点を当て、感染門戸としての口腔における口腔自然免疫 SLPI の感染制御機構を分子レベルで明らかにするという着想にいたった。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病原細菌の組織侵入を定量的に測定できる *in vitro* 実験系を作製し、口腔における自然免疫因子である分泌型白血球プロテアーゼインヒビター、SLPI の感染制御機構としての歯周病原細菌の組織侵入抑制作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* の上皮バリア突破機序を検討する目的で、歯肉上皮細胞の double-chamber culture 法を用いた *in vitro* 実験系を作製した。すなわち、株化ヒト歯肉上皮細胞、Ca9-22 細胞をセルカルチャーインサートに播種し、歯肉上皮細胞層を形成させた後、上部チャンバーに *P. gingivalis* を添加、培養した。下部チャンバーに通過した *P. gingivalis* 細菌数、および Ca9-22 細胞間結合の破壊状態から、transcellular および paracellular ルートの *P. gingivalis* の上皮バリア突破能について検討した。

(2) *P. gingivalis* 以外の 'Red complex species' (*Tannerella forsythia* および *Treponema denticola*) および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の

歯肉上皮バリア突破能/組織侵入能についても、上記実験系を用いて比較検討した。

(3) SLPI によるプロテアーゼ阻害作用:

P. gingivalis のプロテアーゼに対する SLPI の阻害活性とその特性について検討するとともに、transcellular および paracellular ルートの上皮バリア突破能に対する SLPI の抑制作用を比較検討した。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* の上皮バリア突破能:

Double-chamber の上部 chamber に Ca9-22 細胞を播種、3 日間培養後、抗菌薬を含まない無血清培地に交換した。上部 chamber に *P. gingivalis* ATCC 33277 株の菌液を添加し、継続的に上部 chamber 中に残存する菌量および下部 chamber へ通過した菌量を real-time PCR により測定した。実験終了後、FITC-dextran を用いて細胞間結合組織の破壊状態についても検討した。その結果 *P. gingivalis* は歯肉上皮バリアを突破して組織内に侵入し得ることが明らかとなり、その侵入ルートとしては上皮細胞内を通過するルートと上皮細胞間隙を通過するルートの両者が関与することが強く示唆された (図 1)。

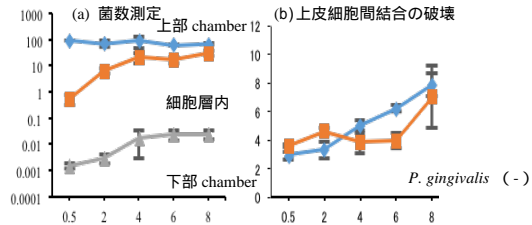


図1 *P. gingivalis* の歯肉上皮バリア突破能

(2) 他の歯周病原細菌の上皮バリア突破能:

主要歯周病原細菌である 3 菌種の 'Red complex species' (*P. gingivalis*, *T. forsythia* および *T. denticola*) および *A. actinomycetemcomitans* の上皮バリア突破能について比較検討した。その結果、*P. gingivalis* 同様、他の歯周病原細菌でも歯肉上皮バリア突破能を有すること、しかし、*T. forsythia* をはじめとする他の歯周病原細菌では transcellular ルートが中心であることが明らかとなった (図 2)。 *P. gingivalis* の上皮細胞間隙を通過するルートには主要病原因子であるジンジパインのうちの Lys-gingipain が関与し、SLPI は Lys-gingipain に対する抑制作用を介して、*P. gingivalis* の歯肉組織侵入を抑制している可能性が強く示唆された。

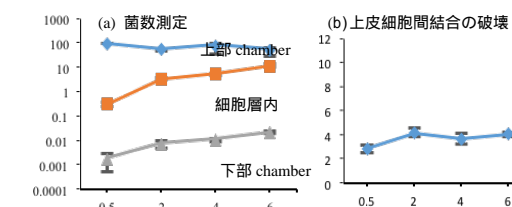


図2 *T. forsythia* の歯肉上皮バリア突破能

(3) SLPI による歯周病原細菌の組織侵入抑制作用：

SLPI を用いた研究より、菌体結合型 Rgp, Kgp の場合、菌体遊離型の Rgp, Kgp と比較して、rSLPI による阻害活性が強いことが示唆された。しかし、ジンジパイン以外の *P. gingivalis* のプロテアーゼ (DPP4, DPP5, DPP7 および DPP11) に対しては、rSLPI はその酵素阻害活性を示さないことが強く示唆された。次に SLPI による歯周病原性細菌の歯肉上皮バリア突破能/組織侵入能に対する抑制効果について検討した。これまでの成績から、上皮細胞内を通過するルートのみを利用して歯肉上皮バリアを突破する *T. forsythia*, *T. denticola* および *A. actinomycetemcomitans* に関しては SLPI による抑制効果は認められないことが予想されたので Arg-gingipain および Lys-gingipain を介して上皮細胞間隙を通過するルートも併用して歯肉上皮バリア突破を果たす *P. gingivalis* に焦点を当て、SLPI による抑制効果を検討した。その結果、SLPI は添加系では、*P. gingivalis* による上皮細胞間結合の破壊ならびに歯肉上皮バリア突破菌数が若干抑制される傾向は観察されたが、有意の差は観察されなかった (図 3)。そのため、Lys-gingipain に対する抑制作用を有する SLPI のみでは、*P. gingivalis* をはじめとする歯周病原細菌の上皮バリア突破、組織侵入を抑制できないことが示唆された。

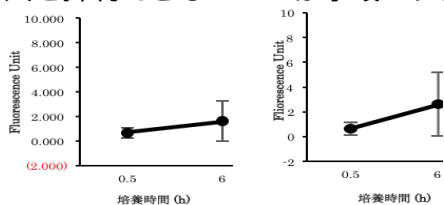


図3 SLPI による *P. gingivalis* の歯肉上皮バリア突破歯肉上皮バリア突破能に対する抑制効果

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4件)

1. Nemoto, T.K., Ohara-Nemoto, Y., Bezerra, G. A., Shimoyama, Y. and Kimura, S.: A *Porphyromonas gingivalis* periplasmic novel exopeptidase, acylpeptidyl oligopeptidase, releases N-acylated di- and tri-peptides from oligopeptides. J. Biol. Chem., 291, 5913-5925, 2016 doi: 10.1074/jbc.M115.687566 査読有
2. 高橋晋平, 下山 佑, 石河太知, 佐々木大輔, 木村重信, 八重柏 隆: 歯周病原細菌の歯肉上皮バリア突破能. 岩医大歯誌, 41 巻, 1-11, 2017 査読有
3. Ohara-Nemoto, Y., Nakasato, M.,

Shimoyama, Y., Baba T.T., Kobayakawa, T., Ono T., Yaegashi, T., Kimura, S. and Nemoto, T.K.: Degradation of incretins and modulation of blood glucose levels by periodontopathic bacterial dipeptidyl peptidase 4. Infect. Immun., 2017 Aug 18;85(9). pii: e00277-17. doi: 10.1128/IAI.00277-17. Print 2017 Sep. PMID:28630069, 2017 査読有

4. Shimoyama, Y., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, M., Nemoto, T.K., Tanaka, M. and Kimura, S.: Dominant prevalence of *Porphyromonas gingivalis fimA* types and in healthy Japanese children. J. Dent Sci., 12, 213-219, 2017 査読有

[学会発表](計13件)

1. 第10回アジア小児歯科学会・第54回日本小児歯科学会 5-26-16~5-28-2016 -Tokyo-
Makinae T., Sakurai M., Shimoyama Y., Oikawa R., Kimura S. and Tanaka M. Quantification of mutans streptococci in children's plaques and its relationship to the caries prevalence.
2. ASM microbe 2016 6-17-16~6-20-16 -Boston, MA, U.S.A.-
Nakasato M., Shimoyama Y., Ohara-Nemoto Y., Nemoto T.K., Sasaki D., Yaegashi T. and Kimura S.: Characterization of dipeptidyl-peptidase 4 from *Tannerella forsythia*.
3. ASM microbe 2016 6-17-16~6-20-16 -Boston, MA, U.S.A.-
Shimoyama Y., Ohara-Nemoto Y., Nemoto T.K., Nakasato M., Ishikawa T., Sasaki M. and Kimura S.: Degradation of incretin by the prokaryotic dipeptidyl-peptidase 4 from *Porphyromonas gingivalis*.
4. 第70回日本細菌学会 東北支部総会 8-18-16~8-19-16 -十和田, 青森-
下山 佑, 根本優子, 石河太知, 佐々木 実, 根本孝幸, 木村重信: *Porphyromonas gingivalis* DPP4 によるインクレチンの分解.

5. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会
8-24-16～8-26-16 -札幌-
蒔苗 剛, 下山 佑, 田中光郎, 石河太知,
古玉芳豊, 佐々木実, 根本優子, 根本孝幸,
木村重信: 小児プラークにおけるミュー
タンスレンサ球菌定着量と齲蝕罹患率の
関連.
6. The 102nd Annual Meeting of the
American Academy of Periodontology
in collaboration with Japanese
Society of Periodontology and
Japanese Academy of Clinical
Periodontology 9-10-16～9-13-16
-San Diego, CA, U.S.A.-
Takahashi S., Ishikawa T., Shimoyama Y.,
Sasaki D., Kimura S. and Yaegashi T.:
Invasion mechanism of 'red complex
species' across the gingival
epithelial barrier.
7. 第 90 回日本細菌学会総会 3-19-17
～3-21-17 -仙台-
Takahashi S., Shimoyama Y., Ishikawa T.,
Sasaki D., Sasaki M., Kimura S. and
Yaegashi T.: Invasion mechanism of
periodontopathic bacteria across
gingival epithelial barrier.
8. 日本薬学会 第 137 年会 3-24-17～
3-27-17 -仙台-
泉澤信太郎, 関谷瑞樹, 櫛桁安生, 芳賀
雅人, 下山 佑, 木村重信, 佐々木由香,
岩本昌子, 中西真弓: プロトン輸送 ATPase
を標的とした抗う蝕化合物の探索
9. 第 60 回春季日本歯周病学会学術大
会 5-12-17～5-13-17 -福岡-
Nakasato M., Shimoyama Y.,
Ohara-Nemoto Y., Kimura S., Sasaki D.,
Ito S., Sasaki M. and Yaegashi T.:
Dipeptidyl-peptidase 4 from
Porphyromona gingivalis and *Tannerella*
forsythia, and the hydrolyzing activity

- toward the incretin.
10. 第 71 回日本細菌学会東北支部総会
8-3-17～8-4-17 -仙台-
古玉芳豊, 下山 佑, 石河太知, 木村重信,
佐々木実: *Streptococcus intermedius* の
上皮細胞付着能および膿瘍形成能に及ぼ
すフィブロネクチン結合タンパク.
11. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会・総会
9-16-17～9-18-17 -松本-
蒔苗 剛, 下山 佑, 木村重信, 石河太知,
古玉芳豊, 佐々木実: 小児プラークにおけ
る口腔レンサ球菌定着量と齲蝕罹患率の
関連.
12. 第 90 回日本生化学会大会 12-6-17
～12-9-17 -神戸-
関谷瑞樹, 泉澤信太郎, 櫛桁安生, 芳賀
雅人, 下山 佑, 佐々木実, 木村重信, 佐々
木由香, 岩本昌子, 中西真弓:
Streptococcus mutans の耐酸性における
F-ATPase の重要性.
13. 第 91 回日本細菌学会総会 3-27-18
～3-29-18 -福岡-
Ishikawa T., Shimoyama Y., Kodama Y.,
Kimura S. and Sasaki M.: Influences of
the butyric acid produced by
periodontopathic bacteria on
ameloblastoma.

〔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:

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kwc.ac.jp>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
木村重信 (KIMURA SHIGENOBU)
関西女子短期大学・歯科衛生学科・教授
研究者番号：10177917
- (2) 研究分担者
根本優子 (OHARA-NEMOTO YUKO)
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：10164667
- (3) 研究分担者
佐々木 実 (SASAKI MINORU)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：40187133
- (4) 研究分担者
下山 佑 (SHIMOYAMA YU)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号：90453331
- (5) 研究分担者
石河太知 (ISHIKAWA TAICHI)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：10569247