

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18592260
 研究課題名（和文） 歯周病原性細菌由来細胞死誘導因子の機能解析及び診断・治療・予防への臨床応用
 研究課題名（英文） Functional Analysis and Clinical Application of Cell death Inducing Factor from Periodontopathic Bacteria.
 研究代表者
 荒川 真一（ARAKAWA SHINICHI）
 東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：20302888

研究成果の概要：

歯周病原細菌 *Tannerella forsythia* の病原因子である細胞剥離因子（*forsythia* detaching factor: FDF）は、接着細胞を剥離する活性があり、さらに細胞内で IL-8 の産生を促進した。従って、歯周組織に炎症を誘導し歯周炎を発症・進行させる病原因子として重要であると考えられる。また臨床的には、歯周炎患者の歯周ポケットに於ける歯肉溝滲出液（GCF）中の坑 FDF 抗体レベル（単位 GCF 当たりの抗体濃度）は健常者と比較して有意に高い値を示した。さらに歯周炎患者群において、健常部位と歯周炎罹患部位の抗体レベルを比較すると、前者で有意な高値を示した。PCR の結果から、歯周炎罹患部位では *fdf* が検出される割合が高く、一方抗体レベルは低い結果が得られた。GCF 中の坑 FDF 抗体レベルの測定は比較的簡便であり、将来的には的確な診断・予後の判定に有用なツールの一つとなる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	720,000	4,220,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

（1）従来培養が困難であった *T. forsythia* の大量・嫌気培養法を開発し、対数増殖期の細菌を大量に得ることが可能となり、当該因子の抽出が容易となった。
 ミトコンドリアの膜電位低下、細胞膜の破壊

を指標にし、フローサイトメトリー（FCM）を用い細胞死の定性的な検出を行った。WST-1アッセイによる細胞死の定量的な解析を行った。さらに粗抽出物を作用させた細胞（HL-60）の表面微細構造の変化を走査型電子顕微鏡により観察した。その結果、ruffling

を生じ他の歯周病原細菌による変化と比較してsevereな変化が生じていたことが明らかになった。

(2) 当該細菌の病原因子の研究の一環として、sialidaseの遺伝子のクローニングにも成功し報告した(J Med Microbiol, 2003, 52, 1-7)。

(3) 以下の5項目において解析中のCCT-1の本質的な作用を担う部分のタンパク、遺伝子を用いて臨床的解析を行った。細胞死誘導因子の精製：*T. forsythia*の菌体超音波抽出液をDEAE-Sepharose、ゲルろ過、ヘパリンカラムにて精製を行った。その結果、Flow through分画(HepFT)において細胞死活性が認められた。CCT-1-1をSDS-PAGEにて解析した。抗細胞死誘導活性モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立後、抗細胞死誘導活性抗体産製ハイブリドーマを得た。さらにリクローニングにより抗体産生細胞を純化した。CCT-1をコードする遺伝子(*cct-1*)のクローニング：CCT-1のN末端のアミノ酸配列からprimerを決定し*T. forsythia*のgene bank(phage)DNAを鋳型としてPCRを行ない、DNA断片を得、TA cloning後insert DNAを分離した(CCT-11)。さらにCCT-1をプローブとして得られたファージクローンをプラスミドクローン：pCCT-1-2にした後、塩基配列の決定・分析を行なった(GenBank AY368075)。

細胞周期制御：精製CCT-1を細胞に作用させたところ、細胞周期：G2期においてarrestさせ、CyclinB1の分解を阻害し蓄積させることが明らかになった。Deletion mutants由来タンパクの機能解析：大腸菌リコンビナントタンパクが合成不可能であった為、塩基配列の情報を基に変異株タンパクをin vitroで作製し、細胞への影響を解析した。その結果、細胞障害によるChk1を介した細胞周期停止がCCT-1の機能の本質である可能性が示唆された。

(4) ヘパリンカラム精製時に、Binding分画(HepBF)を得て細胞剥離因子(forsythia detaching factor: FDF)と命名し、解析準備が整っている。

2. 研究の目的

(1) ヘパリンカラム精製時カラムに結合したタンパクを溶出後、細胞に対する作用を解析する。当該タンパク質の細胞に対する作用機序の解析、細胞：細胞間、細胞：細胞外マトリックス間接着に関する因子、細胞増殖因子に対する効果の解析を共焦点レーザー顕微鏡(CLM)、Western blot法(WB)を用いて行う。細胞内でのFDFが標的器官を解析するために、共焦点レーザー顕微鏡、作用細

胞の分画物を用いて解析する。

(2) 歯周炎(慢性・侵襲性)患者・健常者の歯肉溝滲出液、末梢血中に含まれる抗FDF抗体レベルを、FDFリコンビナントタンパク質を精製した標品を抗原として用いて測定し、病型・臨床症状・治療経過との関連を考察する。

3. 研究の方法

(1) FDFの細胞に対する作用機序の解析
細胞：細胞間、細胞：細胞外マトリックス間接着に関する因子、細胞増殖因子に対する効果の解析。

歯周炎患者、健常者から採取した細胞(再生医療に用いる幹細胞を含む)に対して、FDFを作用させ、細胞抽出物に対して、抗焦点接着因子抗体、細胞増殖に関する因子の抗体、リン酸化検出抗体を用いてWestern blottingを行い、各因子の消長及びシグナル因子がリン酸化されている否かを解析する。

細胞内でのFDFが標的とする因子を解析するために、細胞を固定後、上記抗体を作用させた後分画後WB法を行い、標的因子の細胞内における局在の変化を解析する。

FDFの標的細胞への作用を解明するために、炎症性サイトカインの産生について検討する。

(2) 歯周炎(慢性・侵襲性)患者・健常者の歯肉溝滲出液中に含まれる抗FDF抗体の抗体レベルを解析し、臨床症状、ならびに治療経過との関連を考察する。

研究対象者は、以下のような選定基準で選択する。患者群：全身疾患が認められない、慢性歯周炎、侵襲性歯周炎患者のうち下記の選定基準を満たす患者を供する。選定基準 1. 1/2顎毎に少なくとも5本の歯が残存、2. 1/2顎において2歯以上に5mm以上の歯周ポケットが存在し、プロービング時の出血有り。対照群：同数の健常者(歯肉溝が2mm以下で、歯槽骨の破壊が認められない)全身疾患があり、過去3ヶ月以内における抗生物質服用者は除外する。

歯周炎患者と健常者のGCFにおける抗FDF抗体レベルを比較し、歯周炎と当該抗体レベルとの関連性を解析する。

歯周炎患者群に対して、歯周炎罹患部位と健常部位のGCFに含有する抗FDF抗体

レベルと臨床的評価指標（ポケット深さ、アタッチメントレベル、プロービング時の出血、対象歯の動揺度）とを比較後関連性を解析し病態の改善との関連性を解析する。

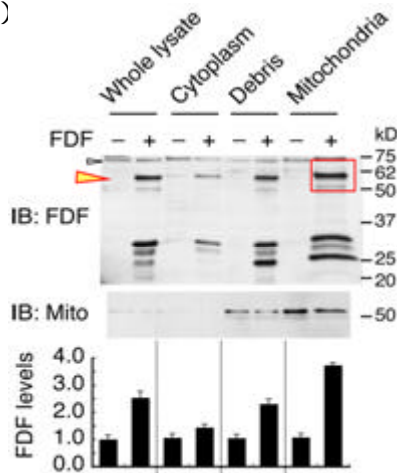
FDFをコードする遺伝子(*fdf*)のクローンから得たりコンビントタンパク質を精製した標品を抗原として用い、歯周炎(慢性・侵襲性)患者・健常者のGCFに含まれるFDFに対する抗体レベルを測定する。歯肉溝滲出液量は、ペリオトロンを用いて測定する。

4. 研究成果

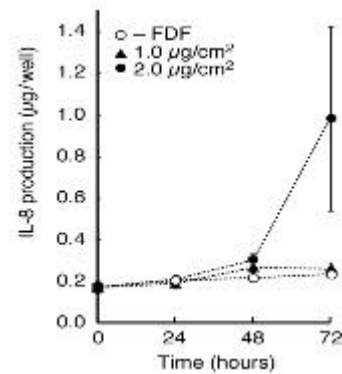
(1) ヘパリンカラム精製時に、Binding 分画 (HepBF) を得た精製タンパクを Forsythia detaching factor (FDF)と命名し正常線維芽細胞 (TIG-3) に作用させたところ、12 時間までは細胞は基質から剥離するが 24 時間までは再び接着することが明らかになった (FDF は少なくとも 4 日間分解されない)。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡によりを用いた解析によって、インテグリン、カテニンなどの様々な焦点接着因子に作用することも明らかになった。FDF は細胞内に取り込まれ (侵入し)、ミトコンドリアに到達後 (図 1) 酸化膜電位を上昇させ、最終的に IL-8 の産生を亢進することが明らかになった (図 2、3)。

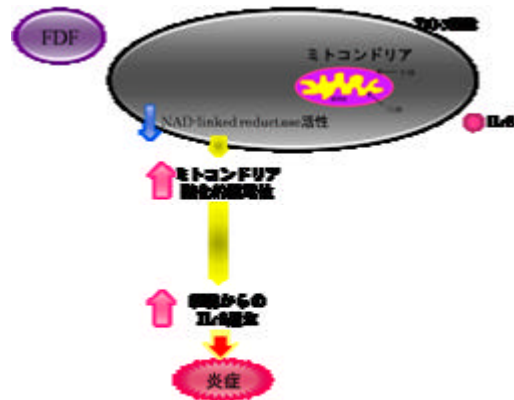
(図 1)



(図 2)



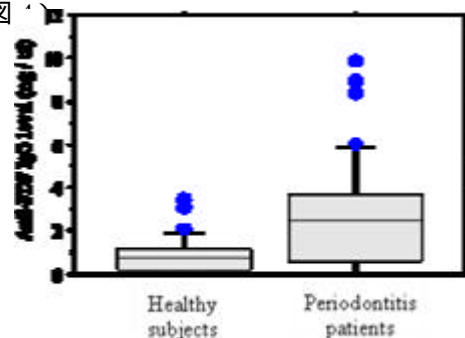
(図 3)



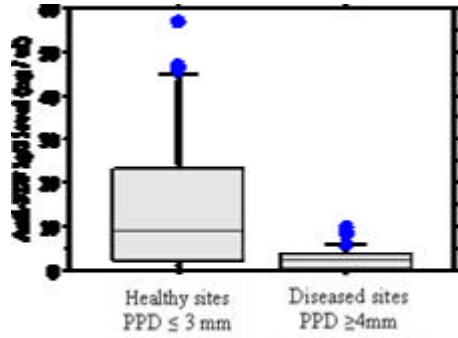
(3) 歯周炎患者の坑 FDF 抗体レベルは健常者と比較して有意に高い値を示した (図 4)。さらに歯周炎患者群において、健常部位と歯周炎罹患部位の抗体レベルを比較すると、前者群で有意な高値を示し、臨床パラメータと負の相関が認められた (図 5 A-C)。

PCR の結果から、歯周炎罹患部位で *T. forsythia* 16SrDNA, *fdf* が検出される割合は高く、一方両者の検出部位において抗体レベルは低い結果が得られた (図 6 A,B)。

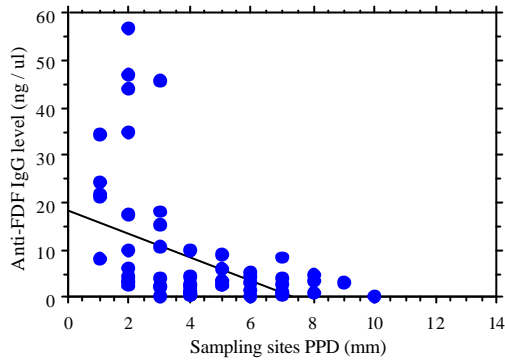
(図 4)



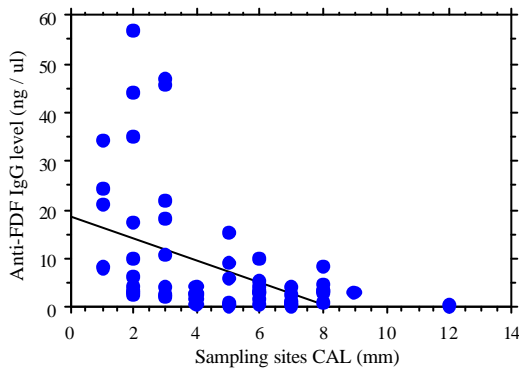
(図 5A)



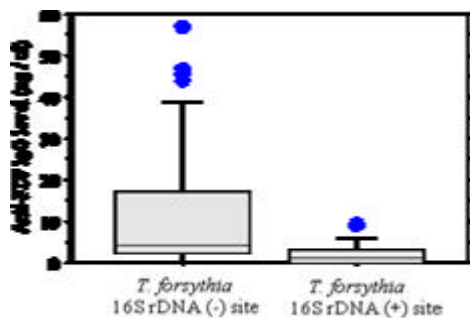
(図 5 B)



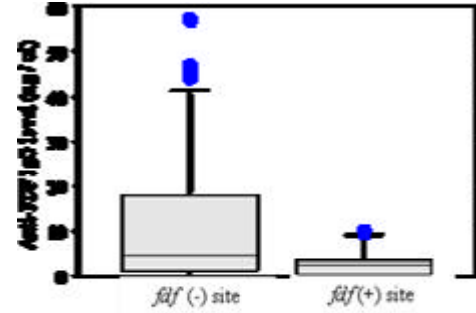
(図 5 C)



(図 6 A)



(図 6B)



以上の結果より、GCF中のIgGは末梢血由来が主であることを併せて、罹患部位ではポケット内に存在する歯周病原細菌由来や宿主由来のIgG分解酵素により分解されていることを示唆している。上述のようにFDFは病原因子としての活性を保有するため、opsonin化に重要なIgGが分解された結果、食細胞に貪食されず歯周炎の悪化に関与していると考えられる。

GCF中の抗FDF抗体レベルの測定は比較的簡便であり、臨床的に的確な診断・予後の判定に有用なツールの一つとして利用することが可能となると予想される。

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. Nakajima T, Tomi N, Fukuyo Y, Ishikura H, Ohno Y, Arvind R, Arai T, Ishikawa I, Arakawa S. Isolation and Identification of a cytopathic activity in *Tannerella forsythia*. BBRC, 2006, 351, 133-139.

2. Naoko Tomi, Yayoi Fukuyo, Shinichi Arakawa, Takuma Nakajima. Proinflammatory cytokine production from normal human fibroblasts is induced by *Tannerella forsythia* detaching factor. JPR, Journal of Periodontal Research, 2008; 43: 136-142.

3. Tomohiko Gunji, Yoshihiro Onouchi, Toshiyuki Nagasawa, Sayaka Katagiri, Hisashi Watanabe, Hiroaki Kobayashi, Shinichi Arakawa, Kazuyuki Noguchi, Akira Hata, Yuichi Izumi, Isao Ishikawa. Functional polymorphism of the FPR1 gene and aggressive periodontitis in Japanese.

BBRC, 2007, 364, 7-13.

4 .Kimika Kamiyama, Shinichi Arakawa, Masayoshi Takahashi, Kaneo Chiba, Nobuo Yamami, Kazuyoshi Yagishita, Yoshihiro Mano. Effects of nano-bubble water on periodontal disease The Jpn J Hyperbaric and Undersea Med. 43:53-60, 2008

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 第 51 回 秋季日本歯周病学会 平成 20 年 11 月 19 日、四日市市文化会館
大西英知、荒川真一、中島琢磨、和泉雄一他 14 名 歯周炎患者と健常者における歯肉溝滲出液中の抗 FDF 抗体レベルの比較

2. 第 50 回 歯科基礎医学会学術大会 平成 20 年 9 月 23 日～9 月 25 日、TOC 有明コンベンションホール
大西 英知、荒川 真一、中島 琢磨、和泉雄一 *Tannerella forsythia* 由来 Forsythia Detaching Factor: FDF の分離及び歯肉溝滲出液中に存在する抗 FDF 抗体レベルと歯周炎の病態との関連性の解析
サテライトシンポジウム

3. 2006 年 6 月 19-22 日 Naoko Tomi, Shinichi Arakawa, Isao Ishikawa and Takuma Nakajima. CCT-1, a novel virulence factor of periodontopathic bacteria *Tannerella forsythia*, induces cell proliferation that leads human cells. 国際生化学会 (IUBMB, Kyoto, Japan)

4. 2006 年 6 月 26-30 日 Naoko Tomi, Shinichi Arakawa, Isao Ishikawa and Takuma Nakajima. *Tannerella forsythia* Cytocidal Toxin-1 (CCT-1) Induces Cell Detachment and Growth Arrest in Fibroblasts. IADR meeting (June 26 -30, 2006, Brisbane,

Australia).

6 . 研究組織
(1)研究代表者
荒川真一

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者
無し