

平成21年3月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592114

研究課題名（和文） 歯周病原菌とヒト抗菌ペプチドの相互作用に関する研究

研究課題名（英文） Study on the interaction between periodontal bacteria and human antimicrobial peptides

研究代表者

小松澤 均（KOMATSUZAWA HITOSHI）

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90253088

研究成果の概要：

歯周病原菌の口腔内、特に歯周組織への感染機構の解明を目的とし、本研究では先天性免疫機構の一つの因子である抗菌性ペプチドに着目した。歯周病原菌や本菌の表層成分である外膜タンパクの一部はヒト由来の上皮細胞に接触することで抗菌性ペプチドの産生を誘導すること、産生した抗菌性ペプチドは細菌の細胞への付着効率に影響を及ぼすことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細菌学、口腔細菌学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：先天性免疫、歯周病原菌、感染症、

1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌感染症であり、これまでに *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* など種々の歯周病原菌が同定されている。これらの菌はエンドトキシンであるリポ多糖、線毛、タンパク質分解酵素、コラゲナーゼなど種々の病原性因子を産生し、宿主への侵襲を試みようとする。一方、宿主は細菌の侵襲に対して種々の防御機構を駆使し細菌感染あるいは発症を抑制しようとする。両者の相互作用の結果、細菌感染の成立・不成立

あるいは感染症発症の程度が規定されることが考えられる。宿主の抵抗性としては免疫機構があるが、これには先天性免疫と獲得性免疫機構がある。特に細菌侵襲の初期段階では先天性免疫機構が中心的な役割を果たすことが考えられる。

先天性免疫機構には皮膚などの生理的バリアー、好中球やNK細胞などの食細胞、唾液や歯肉溝液などの分泌液、常在細菌叢などがある。近年、種々の宿主細胞が産生する抗菌性のペプチドが同定され、先天性免疫機構の一端を担っていることが報告されている。ヒト

を含めた哺乳動物は種々の抗菌ペプチド（ディフェンシン）を産生し、innate immunityとして働くことが知られている。ヒトでは主に好中球が主として産生する α -ディフェンシンや上皮系の細胞が産生する β -ディフェンシンが知られている。また、これら以外にヒトの産生する抗菌物質（CAP57、CAP18）も同定されている。これらのディフェンシンは比較的広い抗菌スペクトラムを持ち、またこれらの抗菌物質の中にはケモタキシスとして免疫応答にも関与していることが報告されている。近年、これらの抗菌ペプチドと各種疾患における細菌感染との因果関係も一部明らかになってきている。以上のことから抗菌ペプチドは細菌感染症の防御因子として大きな役割を果たしていると考えられる。しかし、一方で一部の細菌はこれらの抗菌ペプチドに抵抗性を示すことが報告されている。黄色ブドウ球菌の産生する酵素であるstaphylokinaseは抗菌ペプチドと親和性を有することで抗菌ペプチドをトラップすることやプロテアーゼによる抗菌ペプチドの分解、細胞表層の成分を変化することで表層のチャージが変化し抗菌ペプチドに対する感受性が変化することなどが報告されている。また、サルモネラ菌は自身のもつ2成分制御系因子により抗菌ペプチドを認識し、細胞内シグナリングを活性化させ抗菌ペプチドに対して防御的に働く因子の産生量を増大させることなどが報告されている。このように抗菌ペプチドに関する研究は非常に多角的な面から国内外で盛んに研究が行われている。

このような研究がなされている中で口腔内領域においても抗菌ペプチドの役割について、う蝕活動能とディフェンシン産生量との相関性、歯周炎組織における抗菌ペプチド産生性の向上、抗菌ペプチドの口腔内細菌に対する感受性などいくつかの報告がなされている。申請者もこれまでに上皮系細胞が産生する抗菌ペプチドである β -ディフェンシンおよびCAP18に着目し、これらの抗菌ペプチドの口腔内レンサ球菌および歯周病原菌に対する感受性や歯周病原菌の一つである*A. actinomycetemcomitans*が歯肉上皮細胞に接触することにより種々の抗菌ペプチドの産生が誘導されること、また*A. actinomycetemcomitans*の外膜タンパクの一つであるOmp100が β -ディフェンシン2の産生誘導因子であることなどを明らかにしてきた。これらの研究成果により、抗菌ペプチドに対する感受性や歯肉上皮細胞に対する抗菌ペプチド誘導能は菌種あるいは同一菌種においても菌株間でかなり感受性が異なることが明らかになった。また、Omp100は申

請者らにより細胞への付着・侵入因子であり、血清抵抗性やサイトカイン誘導能を有することを報告している。したがってOmp100は宿主に対するビルレンスと宿主の抵抗性を増強するという2つの相反する作用を引き起こすことが示唆された。このことは細菌感染における病原性因子の中には単に宿主に有害に働くものではなく、宿主の抵抗性を高める可能性が考えられた。以上のことから、細菌感染機序について考える際には細菌側と宿主側との相互作用をより綿密に観察する必要性があり、その中で抗菌ペプチドとの関連性も非常に重要であることが考えられる。また、菌株間でかなり抗菌ペプチドに対する応答も異なることから、画一的に細菌種としての応答として捉えるだけでは不十分である可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では抗菌ペプチドの観点から歯周病原菌と歯肉上皮細胞の相互作用について分子レベルにおいて検討を行い、歯周病原菌感染の機序の一端を解明することを目的としている。本研究期間内に以下の5つの点について解明を行うことを目的とした。

(1) 歯周病原菌の表層分子の宿主に対する作用

P. gingivalis, *A. actinomycetemcomitans*など主な歯周病原菌の外膜タンパク成分、リポ多糖、線毛などの因子について主として抗菌ペプチドの産生誘導能を検討し、サイトカイン誘導能、付着・侵入活性の有無などについて検討を行う。特に外膜タンパクについては細胞側のレセプターや細胞内シグナリング機構についても検討を行う。

(2) 歯周病原菌の抗菌ペプチド感受性に影響を及ぼす因子の同定

トランスポゾンの手法が用いることの出来る*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*などを用いて抗菌ペプチドの感受性の変化する株を分離し、その因子を同定する。また、抗菌ペプチド処理による抗菌ペプチド低感受性自然突然変異株を分離およびその頻度について検討する。

(3) 歯周病原菌の抗菌ペプチド認識機能の解析

グラム陰性菌であるサルモネラ菌で2成分制御系因子の一つが抗菌ペプチドを認識し、抗菌ペプチドに抵抗性を示すため種々の応答を引き起こすことから、このセンサータンパクと相同性を有する因子を歯周病原菌で同定し、その変異株を作製し性状解析を行うことで抗菌ペプチド認識機構について明らかにする。

(4) 抗菌ペプチド強発現細胞株の作製と歯周病原菌接触時の応答についての解析
種々の抗菌ペプチド強発現株を作製する。強発現株および親株について歯周病原菌を用いた細胞への付着・侵入実験を用いてその効率を比較する。また、細菌作用時におけるサイトカイン産生性などについても比較検討を行い、抗菌ペプチド間での作用の比較および細菌と宿主細胞との相互作用時における抗菌ペプチドの役割について検討する。

(5) 抗菌ペプチド感受性変異株あるいは臨床分離株を用いた感染実験
種々の変異株あるいは臨床分離株を用いて、細胞を用いた付着・侵入実験などの解析を行い、細菌種および株間での感染性の多様性と抗菌ペプチドとの関連性について検討を行う。また、いくつかの変異株については動物実験モデルにより感染性について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 歯周病原菌の外膜タンパクの同定および変異株の作製

歯周病原菌の外膜タンパクについてゲノム情報および外膜タンパク画分を調整し同定する。大腸菌発現株、欠損株および組換えタンパクを作製する。また、得られた因子について組換えタンパクを作製し、主要なものについてはマウスに免疫することで抗血清を得る。

(2) 抗菌ペプチド感受性変異株の分離

A. actinomycetemcomitans, *P. gingivalis* においてはトランスポゾンを用いた手法により抗菌ペプチド感受性の異なる変異株を分離する。最終的に得られた変異株について、トランスポゾン挿入部位を同定し、そこにコードされる遺伝子を明らかにする。

(3) 歯周病原菌における抗菌ペプチド認識分子の同定

ゲノム情報により得られたセンサータンパクについて検索し *Salmonella* の PhoPQ と高い相同性の認められるタンパクを同定する。抗菌ペプチド処理・未処理における同定したセンサータンパクの発現量について比較検討する。

(4) 抗菌ペプチド強発現細胞株の樹立

上皮細胞で産生が確認されている β -ディフェンシン-1、2、3 および CAP18 について KB 細胞を用いた強発現株を作製する。

(5) 歯周病原菌表層分子の歯肉上皮細胞に及ぼす影響

(1) で得られた種々の変異株をヒト正常歯肉上皮細胞へ作用させ、種々の抗菌ペプチドの産生量、サイトカインの誘導能について

検討する。また、付着・侵入実験も行い表層分子の機能について明らかにする。

4. 研究成果

(1) *F. nucleatum* 外膜タンパクの同定および大腸菌発現株の作製

F. nucleatum のゲノム上に存在する外膜タンパクをコードする遺伝子を 23 個見出し、全ての遺伝子についてそれぞれの大腸菌発現株の作製を行い、23 個のうち 17 個のクローニングに成功した。特に *F. nucleatum* において特徴的な分子量約 200kDa 以上の高分子の外膜タンパクのクローニングは全て終了した。得られた大腸菌発現株を用いて形態観察、自己凝集能、共凝集能、上皮細胞への付着能、補体感受性、抗菌性ペプチド感受性について検討を行った。

形態観察において 2 つの高分子の外膜タンパク (遺伝子 ID: FN2047, FN1893) 発現株において、*F. nucleatum* のような紡錘状の形態を呈することを明らかにした (図 1)。

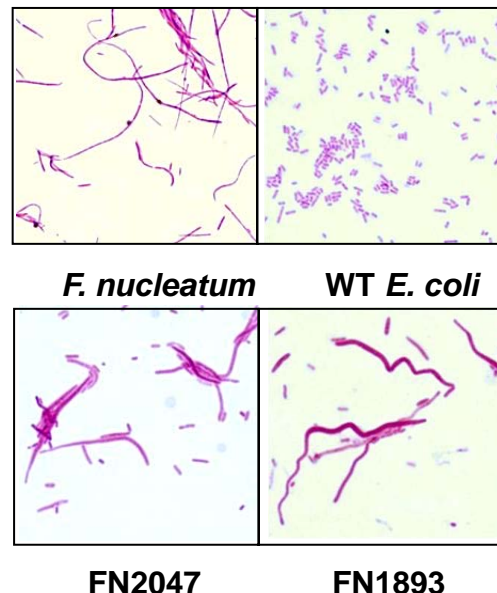


図 1 外膜タンパク発現大腸菌株のグラム染色像

外膜タンパクの 1 つ (FN1893) はタンパク発現させることで大腸菌株では致死的に作用することを明らかにした。

自己凝集能、共凝集能、細胞への付着活性はいくつかの外膜タンパクにおいて変化は認められるものの、まだ安定したデータは得られていない。また、個々の外膜タンパク発現大腸菌株接触時の上皮細胞の抗菌性ペプチドの発現誘導について FN2047 について検討した結果、若干の発現認められた。現在、他の発現株についても検討中である。今後は作製した大腸菌株を用いてさらに詳細な検討を加えていく予定である。

(2) *F. nucleatum* 外膜タンパクの調整および発現解析

F. nucleatum から通法に従い外膜タンパクの調整を行い、電気泳動にて蛋白バンドを確認した。特に高分子の外膜タンパクにおいては4%ポリアクリルアミドゲルを用いて複数の蛋白バンドを分離し確認が出来た。現在、N末端アミノ酸シーケンスを行うためサンプル調整を行っている。

また、特に高分子の外膜タンパクの発現性について定量性PCR法を用いて発現性の確認を行った(図2)。

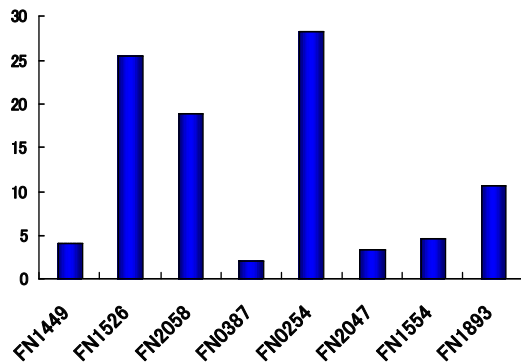


図2: 高分子外膜タンパクの16s rRNA (x1000倍希釈) に対する発現量

(3) *P. intermedia* 外膜タンパクの同定

P. intermedia ゲノム上に存在する23個の外膜タンパクをコードする遺伝子の大腸菌発現株を現在作製中であり、4個の遺伝子についてクローニングを終了している。

今後は *F. nucleatum* と同様の検討を行っていく予定である。

(4) *A. actinomycetemcomitans* の *phoPQ* 類似2成分制御系因子破壊株の作製

抗菌性ペプチドのセンシング能を有し、抗菌性ペプチド感受性に影響を及ぼすことが報告されている *phoPQ* と同様の認められた *A. actinomycetemcomitans* の2成分制御系因子について破壊株の作製を行った。スペクチのマイシン耐性遺伝子を組込んだ遺伝子破壊用のプラスミドを構築したが、最終段階での同源性組み換え体の分離が成功していない。

(5) 抗菌性ペプチド強産生細胞株の構築および細菌付着能に及ぼす影響の検討

抗菌性ペプチドであるβ-ディフェンシン-1、2、3およびLL37をコードする相補DNAを発現用ベクターに組み込み強発現用ベクターを作製した。抗菌性ペプチド非産生株であるHeLa細胞にトランスフェクションを行い、mRNAレベルでの発現を確認した。その後、

stable transformantの細胞株の樹立を試みたが失敗した。

そこで、β-ディフェンシン-2と3についてtransient発現系での*A. actinomycetemcomitans*の細胞付着能について検討した結果、ディフェンシン発現株での付着能の減少傾向が認められた。しかし、安定した結果が得られておらず、現在引き続き検討を行っている。

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 2 件)

① 松尾美樹、小松澤均 口腔内の先天性免疫機構 鹿児島大学歯学部紀要 29:67-77, 2009 査読無

② Kishimoto A, Fujita T, Shiba H, Komatsuzawa H, Takeda K, Kajiya M, Hayashida K, Kawaguchi H, Kurihara H.

Irsogladine maleate abolishes the increase in interleukin-8 levels caused by outer membrane protein 29 from *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* through the ERK pathway in human gingival epithelial cells. J Periodontal Res. 43(5):508-13, 2008. 査読有

[その他]

ホームページ:

<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Saikin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松澤 均 (KOMATSUZAWA HITOSHI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 90253088

(2) 研究分担者

神原 賢治 (KANBARA KENJI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 60305141

大貝 悠一 (OOGAI YUICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 40511259