

機関番号： 32404

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20592466

研究課題名 (和文) 細胞内侵入した歯周病原性細菌の病原性機構の解析とその細菌除去に有効な抗生剤の検索

研究課題名 (英文) Analysis of virulent mechanism of periodontal pathogen that invades in the mucosal epithelium cells and of effect of antibiotics on the invaded bacterium.

研究代表者

竹下 玲 (TAKESHITA AKIRA) 明海大学・歯学部・准教授 研究者番号: 70236454

研究成果の概要 (和文) :

歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は細胞内への侵入能を有することが広く知られているが、その細胞内侵入が、どのような病原性を発揮するか検討した研究は少ない。そこで、本菌の細胞内侵入によって宿主細胞がどのような反応を示すかについて検討した。その結果、本菌は、粘膜上皮細胞である KB 細胞の炎症性サイトカイン IL-6 を強く誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) :

Although it has been demonstrated that the periodontal disease pathogen *Porphyromonas gingivalis* is able to invade into various types of cell in the periodontal tissue including oral mucosal epithelial cells, there are few studies that examine whether the bacterial invasion contribute to the pathogenic mechanisms involved in the lead of the exacerbation of the disease. Then, we have investigated the effect of the bacterial invasion on the human mucosal epithelial cell line KB cells in this study. Therefore, this study showed that the bacterial invasion is able to induce the expression of IL-6 in the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・社会系歯学

キーワード： 歯周炎、歯周病原性細菌、細胞内侵入、*Porphyromonas gingivalis*、IL-6、炎症性サイトカイン

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

成人性歯周疾患は、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) などの幾つかの病原性細菌の感染により発症する難治性の慢性感染症である。最近の研究は、本菌が上皮細胞内に侵入することを報告している。従来から、リポ多糖などの本菌の構成成分の病原性は明らかにされているが、細胞内侵入が、感染の成立に及ぼす影響と歯周組織の破壊を如何なる機構で誘導するかについて、完全には明らかになっておらず、この「秘境」に科学のメスを入れ、さらに、細胞内侵入細菌を除去する方法を研究することは、歯周炎の効果的な予防法や治療法の確立のため、意義あることと思われる。

2. 研究の目的

わが国では、高齢者の増加とともに歯周炎患者が増加している。ゆえに、本疾患の予防のために様々な方法論が確立されつつある。しかしながら、本疾患の発症機構においては、まだ、不明な点も多く、その点が解明されれば、さらに、効果的な予防法や治療法が開発できるものと考えている。

従来より、幾つかの病原性細菌[赤痢菌や腸管出血性大腸菌(0157H7)など]は、上皮細胞内侵入能を有し、細胞内侵入によって、感染初期段階の宿主の防御(免疫)反応を逃れた後、強力な外毒素により、急激な症状を誘導すると考えられている。一方、最近、細胞内への侵入能力を有しているが、非強毒素産生菌であるブドウ球菌、インフルエンザ菌、緑膿菌、並びにライム病ボレリアなどによる感染症の病態は、慢性かつ難治性であることから、細菌の細胞内侵入は感染の成立のみならず、慢性化病態の成立・進行にも密接に関連する可能性が示されている。

成人性歯周疾患は、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) などの幾つかの病原性細菌の感染により発症する難治性の慢性感染症である。最近の研究は、本菌が上皮細胞内に侵入することを報告している。すでに、リポ多糖などの病原性は明らかにされているが、細胞内侵入による歯周組織の破壊は、完全には明らかになっておらず、この「秘境」に科学のメスを入れることは、歯周炎の効果的な予防法や治療法の確立のため、意義あることと思われる。歯周組織は、狭い部位に多種多様な細胞が秩序正しく存在するユニークな組織である。それ故、*P. gingivalis* の細胞侵入が、細胞種により様々な反応を誘導し、組織破壊に繋がると考え実験を企画した。

口腔粘膜上皮細胞は、歯周組織の最前線に位置し、絶えず病原性細菌の組織への侵

入を、障壁(バリア)として阻害する機能を有している。そのため、実際の歯周炎において、歯周ポケット底部の口腔粘膜上皮細胞は、*P. gingivalis* が、最初に付着し、また、細胞内侵入の対象になる細胞群であると考えられ、実際、歯周病患者の歯周ポケット底部の粘膜上皮細胞に本菌の侵入が確認されている。

近年、歯周炎の発症に、炎症性サイトカインが、密接に関係することが明らかにされている。しかしながら、*P. gingivalis* が、口腔粘膜上皮細胞の細胞内侵入によって、粘膜上皮細胞の炎症性サイトカインを誘導するか否かについての検討はされていない。そこで、本細胞において、炎症性サイトカインの一つである Interleukin-6 の発現を、*P. gingivalis* が誘導するか否かについて、検討を加えた。

また、前述のように障壁(バリア)として機能している粘膜上皮細胞において、CAP-18 や β_2 -defensin などの抗菌タンパク質発現に関するその細胞侵入の影響を検討することは、意義あることと考えられる。また、歯周組織は、狭い部位に多種多様な細胞が秩序正しく存在するユニークな組織である。それ故、*P. gingivalis* の細胞侵入が、細胞種により様々な反応を誘導し、組織破壊に繋がる可能性を考え、歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞、並びに骨芽細胞等、歯周組織を支える細胞群に対して、本菌が、アポトーシス誘導作用を有するか否かについて検討した。

従って、本研究は、*P. gingivalis* の細胞内侵入が、(1) 炎症性サイトカイン誘導作用を有するか否か、(2) 歯周組織の抗菌蛋白質の発現を抑制するか否か、について検討し、さらに、そのような様々な生体への偽害性を有し、細胞内に侵入した (3) 本菌の除去作用を有した薬品を検索することを目的として企画されたものである。

3. 研究の方法

(1) 細胞；ヒト粘膜上皮細胞である KB 細胞を使用した。

(2) *P. gingivalis* ; *P. gingivalis* ATCC33277 株を使用した。

(3) 細胞内侵入能試験；antibiotic protection assay に従い行った。

(4) 遺伝子発現：Northern blot 法にて調べた。

(5) 細胞内侵入阻害剤：MDC、Ouabain、Colchicine、Nocodazole、並びに Cytochalasin D を使用した。

(6) NF κ -B 阻害剤：PDTIC、NAC と Gliotoxin を使用した。

(7) MAPK 阻害剤: PD98059 と SB202190 を使用した。

(8) Western blot: Phospho-p38, p38, Phospho-ERK、並びに、ERK を認識する抗体を用いて検討した。

(9) Gel shift assay: NF- κ -B コンセンサ配列の合成プローブを用いた。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* の細胞内侵入による IL-6 誘導作用

図-1

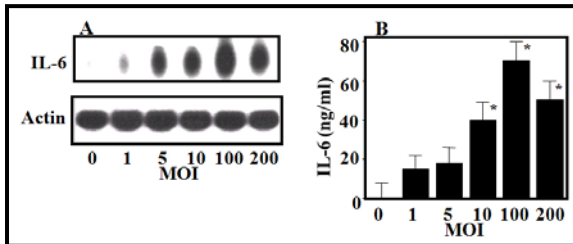


図-1A に示す様に、*P. gingivalis* は、KB 細胞の IL-6 遺伝子発現を強く誘導した。また、図-1B に示す様に、本細胞の IL-6 誘導作用を、タンパク質レベルで確認することが出来た。

図-2

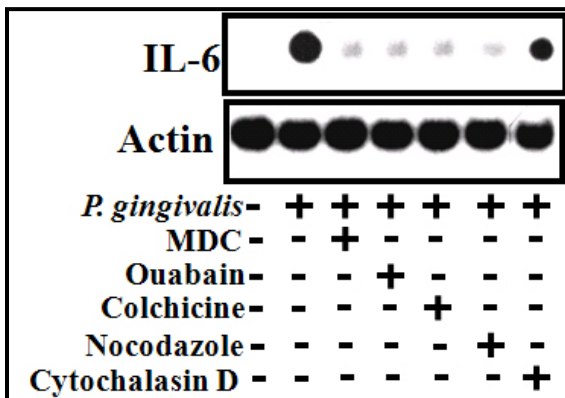
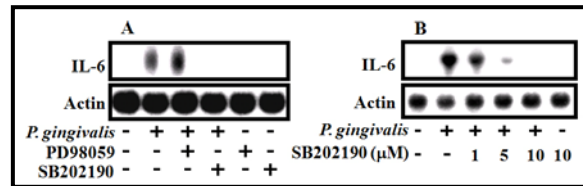


図-2 に示す様に、*P. gingivalis* によって誘導される KB 細胞の IL-6 遺伝子発現について、既に本菌の細胞内を阻害する作用を有していることが報告されている薬剤を使用し検討を行った。その結果、MDC、Ouabain、Colchicine、Nocodazole、並びに Cytochalasin D は、その IL-6 遺伝子発現を強く抑制した。実際に、これらの阻害剤は、実際の本菌の細胞内侵入も強く抑制した。

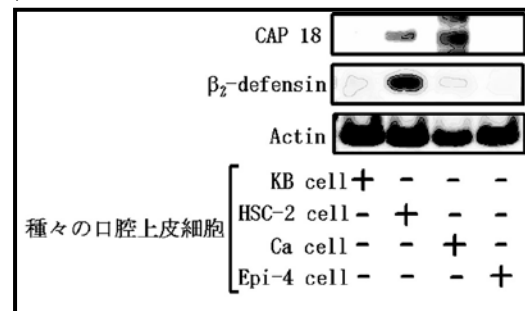
図-3



P. gingivalis の細胞内侵入によって誘導される KB 細胞の IL-6 遺伝子発現に関する NF κ -B 阻害剤 (PDTC、NAC、並びに Gliotoxin) の作用を検討したところ、これらの阻害剤は、この遺伝子発現誘導作用を、抑制しなかった。そこで、MAPK 阻害剤である PD98059 と SB202190 を使用し検討を行った。その結果、*P. gingivalis* 誘導性 IL-6 遺伝子発現は、MAPK の一つである p38 の阻害剤である SB202190 によって強く阻害されることが明らかとなった。

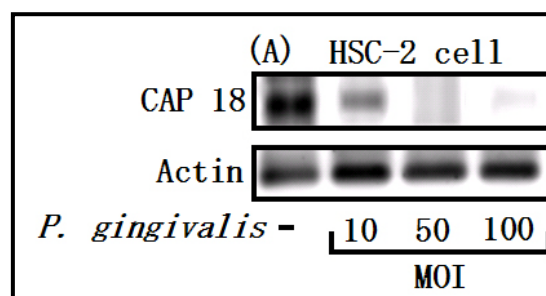
(2) *P. gingivalis* の細胞内侵入による IL-6 誘導作用

図-4



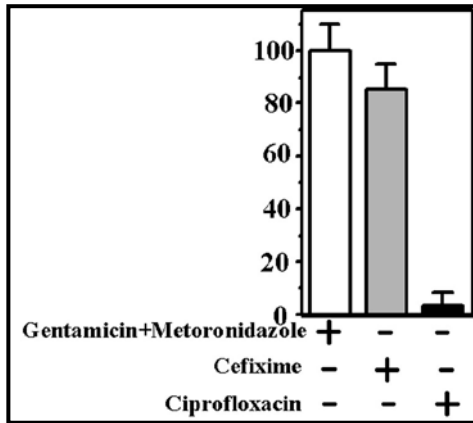
種々の口腔上皮細胞の β_2 -defensin と CAP-18 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。その結果、HSC-2 細胞に、両抗菌蛋白質の発現が認められた。また、CA 細胞に CAP-18 の発現が認められた。そこで、HSC-2 細胞の CAP-18 遺伝子発現に関して、*P. gingivalis* の影響を検討したところ、本菌は、CAP-18 遺伝子発現を強く抑制することが示された (図-4)。

図-2



(2) 細胞内侵入した *P. gingivalis* を除去する抗生物質の検索

図-5



幾つかの報告は、細胞内に侵入した細菌に対する抗生物質を検討し、Cefixime と Ciprofloxacin に、細胞内の細菌を殺滅する作用を有することが報告されている。そこで、KB 細胞に *P. gingivalis* を添加し、それらの抗生物質を作用させ検討したところ、Ciprofloxacin は、細胞内に侵入した本菌を殺滅できる可能性が示唆された (図-5)。

これらの結果は、歯周病原性細菌 *P. gingivalis* が、口腔粘膜上皮細胞に侵入することによって、生体の免疫反応をエスケープし、感染を成立させるだけでなく、サイトカイン誘導と抗菌タンパク質の抑制等によって細胞の生体反応を惹起し、歯周炎の病態形成に関係することを示した。また、細胞内に侵入した本菌を Ciprofloxacin は除去できる可能性を示した。これらの知見は、調べた限りでは、初めての知見であり価値あるものと考えられる。

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 3 件)

- 1) 高野安紀子, 竹下 玲, 末續真弓, 篠田寛幸, 松本 健, 永井明子, 岡安麻里, 大井 迪, 長谷川紘也, 土居孝資, 桃井知子, 高橋明子, 安井利一, 鐘ヶ江晴秀: マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞における一酸化窒素誘導性細胞死に対する酪酸の抗アポトーシス作用, 明海歯科医学, 査読有, Vol. 38, 151-165, 2009.
- 2) 末續真弓, 竹下 玲, 松本 健, 高橋明子, 流石知佳, 安井利一: マクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞における transforming growth

factor- β_1 による一酸化窒素誘導性アポトーシスの増強効果, 明海歯科医学, 査読有, Vol. 38, 166-181, 2009.

- 3) 竹下 玲, 江端 淳, 末續真弓, 流石知佳, 中川和弘, 小山主之, 田中園治, 遠藤浩正, 田中 入, 柏崎秀一, 熊倉 学, 元治茂樹, 大高義文, 杉山卓司, 佐藤 豊, 河野 哲, 川俣富貴子, 佐藤淑郎, 中林靖雄, 中筋宣子, 杉山義祥, 深井 智子, 安井利一: *Porphyromonas gingivalis* 線毛はマウス単球性骨髄性白血病細胞株 M1 細胞のアポトーシスを抑制する. 明海歯科医学, 査読有, Vol. 40, 67-83, 2011

[学会発表] (計 9 件)

- 1) 末續真弓, 骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞においてレチノイン酸は転写因子 AP-1 を c-fos と c-jun 遺伝子発現を抑制することにより阻害する. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2008 年 9 月 25 日, 東京
- 2) 廣瀬公治, レチノイン酸はヒト歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチド産生を誘導する. 第 57 回日本口腔衛生学会・総会, 2008 年 10 月 4 日, さいたま市
- 3) 末續真弓, 骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞においてレチノイン酸は転写因子 AP-1 の発現を強く抑制する. 第 57 回日本口腔衛生学会・総会, 2008 年 10 月 4 日, さいたま市
- 4) 田谷かほる, トレハロースは $I\kappa B-\alpha$ の分解を抑制してマクロファージからの LPS 誘導性 IL-1 β と TNF- α の産生を抑制する. 第 57 回日本口腔衛生学会・総会, 2008 年 10 月 4 日, さいたま市
- 5) 杉 陽子, 特定保健指導における生活習慣からみた歯科質問票の開発について. 第 57 回日本口腔衛生学会・総会, 2008 年 10 月 4 日, さいたま市
- 6) 福浦えり子, 学校安全教育としての「歯と口腔の外傷予防」. 第 10 回日本安全教育学会, 2009 年 9 月 20 日, 小平市
- 7) 末續真弓, 3 歳児のう蝕有病状態に関する 2 歳児歯科健診の有効性. 第 58 回日本口腔衛生学会・総会, 2009 年 10 月 10 日, 岐阜市
- 8) 竹下 玲, 単球様細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞 M1 細胞の細

胞死を *Porphyromonas gingivalis* 線毛は阻害する. 第58回日本口腔衛生学会・総会, 2009年10月11日, 岐阜市

- 9) 竹下 玲, 単球様細胞への分化能を有する M1 細胞のアポトーシスに関する *Porphyromonas gingivalis* 線毛の阻害機構の解析. 第 59 回日本口腔衛生学会・総会, 2010 年 10 月 8 日, 新潟

[図書] (計 2 件)

- 1) 竹下 玲, 真野 博, 和田政裕, 安井利一: 第 3 節口腔環境解析バイオチップ; 第 3 章ヘルスケア分野への応用; バイオチップ実用化ハンドブック: 金子周一, 堀池靖浩 監修, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京, 287-297, 2010 年 3 月
- 2) 竹下 玲, 松本 勝: 2 章 食生活と栄養; 生活健康 - 測定と評価法 -, 荒川浩久, 広瀬公治, 安井利一 編集, 第 4 版, 株式会社学健書院, 東京, 67-80, 2011 年 3 月