

平成22年5月7日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791621
 研究課題名 (和文) 複数菌種における歯周病原性バイオフィーム内における細菌間コミュニケーションの解析
 研究課題名 (英文) Analysis of interspecies communication in oral biofilms

研究代表者
 稲垣 覚 (INAGAKI SATORU)
 東京歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：20385165

研究成果の概要 (和文)：歯周病は口腔内に常在する数種の歯周病原菌によって引き起こされる感染症である。特に *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella. Forsythia* の3種は“Red complex”と言われ重度歯周炎の発症や進行に関与していると考えられている。これらは歯周ポケット内でバイオフィームという強固な細菌コミュニティを形成し、その病原性を発揮している。本研究では、重要な歯周病原菌の一つである *Tannerella. Forsythia* のバイオフィーム形成に関与する因子と、さらに *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* の宿主、特に歯肉上皮に対する病原性について解明した。

研究成果の概要 (英文)：During dental plaque formation, the interaction of different organisms is important in the development of complex communities. We analyzed the bacterial virulence which promotes biofilm formation and cellular invasion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1200,000	360,000	1560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：*Treponema denticola*、バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

近年、日本人の口腔衛生習慣の改善によりう蝕は減少しているにも関わらず、歯周病はいまだ歯の主な喪失原因となっている（厚生労働省歯科疾患実態調査より）。数種の歯周病原菌のうち、特に *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*、*Tannerella. Forsythia* の3種は“Red complex”と言わ

れ重度歯周炎の発症や進行に関与していると考えられ、重要視されている。これら歯周病原菌は歯周ポケット内でバイオフィームを形成し、過酷な外的ストレスから身を守っていると同時に、歯肉の炎症反応や歯槽骨の破壊など歯周組織を破壊している。我々はこれまでに歯周病原菌のバイオフィーム形成には複数菌が関与している現象を明らかに

している。一方、その先のメカニズムやどのように宿主に障害を与えているかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) 歯周病原菌のバイオフィーム形成に関する因子を同定する。

(2) 歯周ポケット内で歯肉組織に障害を与える因子を解明する。

3. 研究の方法

歯周病原菌の中でも red complex といわれ、特に歯周病とのかかわりが深いとされる *T. denticola*, *Porphyromonas. gingivalis*, *Tannerella. forsythia* についてバイオフィーム形成と組織障害性、とくに上皮細胞への侵入について解析した。

(1) バイオフィーム

それぞれの菌の病原性が強いと報告されている遺伝子の欠損株をダブルクロスオーバーで作成する。これらの欠損株を用いてバイオフィーム形成能を調べることにより、バイオフィーム形成に関与する遺伝子をつきとめる。

(2) 細胞侵入

それぞれの菌単独、複数菌種を歯肉上皮細胞に感染させ、その現象を形態的、定量的に解析した。

① 細胞侵入の観察

歯肉上皮細胞 Ca9-22 に細菌を感染させ、共焦点レーザー顕微鏡、透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡などを用いてその様子を観察した。

② 細胞侵入の定量

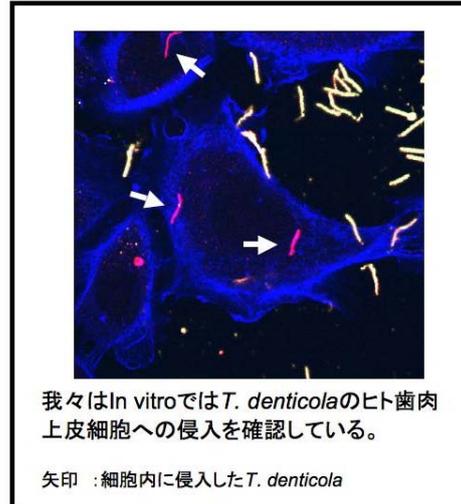
歯肉上皮細胞 Ca9-22 に RI 標識した細菌 (野生株、欠損株) を感染させ、antibiotics protection assay にて細胞侵入レベルを測定した。

4. 研究成果

(1) *T. forsythia* のバイオフィーム形成には *OxyR* という遺伝子が関与していることが明らかになった。

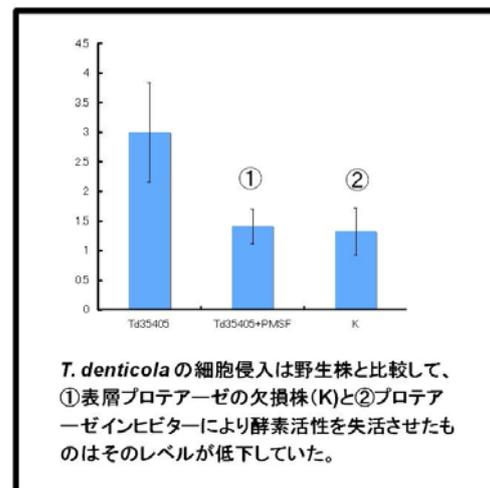
(2) これまで宿主細胞には侵入しないと考えられていた *T. denticola* が条件によっては上皮細胞に侵入することを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。本菌は $10\mu\text{m}$ を超す大きさのものもあり、されだけの大きさの菌が上皮細胞に侵入するという報告はこれまでになく、この現象を突き止めたことは大きな

意義がある。



(3) *T. denticola* の野生株と比較して、表層プロテアーゼの欠損株はその細胞侵入レベルが低下していた。また、プロテアーゼインヒビター (PMSF) で処理した野生株もその細胞侵入レベルが低下していた。

これらのことから、本菌のもつ表層プロテアーゼが細胞侵入に関与していることがわかった。このタンパクは他にも様々な病原性が報告されており、この分子をターゲットにしてワクチン開発も将来的には視野に入れている。



(4) *P. gingivalis* の細胞侵入には *F. nucleatum* が関与することがわかった。この2菌種を共培養すると、*P. gingivalis* の細胞侵入レベルが上昇していた。また、この結果は *T. denticola*, *T. forsythia* が関与するであろうという予想に反していた。

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 Differential ability of periodontopathic bacteria to modulate invasion of human gingival epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*.

Saito A, Inagaki S, Ishihara K

Microb Pathog. 2009

Dec;47(6): 329-33.

査読有り

② The OxyR homologue in *Tannerella forsythia* regulates expression of oxidative stress responses and biofilm formation.

Honma K, Inagaki S, Sharma A (他1名3

番目)

Microbiology. 2009

Jun;155(6):1912-22.

査読有り

③ *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*.

Saito A, Inagaki S, Ishihara K (他3名

2番目)

FEMS Immunol Med Microbiol. 2008

Dec;54(3):394-55.

査読有り

[学会発表] (計12件)

① 第51回歯科基礎医学会学術大会・総会(平成21年9月10日～11日)

朱鷺メッセ(新潟市)

歯周病原菌 *Treponema denticola* のヒト歯肉上皮細胞への侵入

稲垣覚 齋藤淳、君塚隆太、石原和幸

Journal of Oral Biosciences Vol. 51,

2009

② 第92回日本細菌学会関東支部総会(平成21年11月5日～6日)

東京医科歯科大学(東京)

歯周病原菌 *Treponema denticola* のヒト歯肉上皮細胞への侵入

稲垣覚 齋藤淳、君塚隆太、石原和幸

第92回日本細菌学会関東支部総会講演抄録集

③ IADR 87th General Session & Exhibition, Miami 4/1-4 2009

Invasion of host cells by periodontopathic bacteria in polymicrobial infection

A. SAITO, S. INAGAKI, R. KIMIZUKA, and K. ISHIHARA,

Journal of Dental Research 87(Special Issue), #2703, 2009.

④ 第82回日本細菌学会総会(平成21年3月12-14日)

名古屋国際会議場(名古屋市)

歯周病原菌 *Treponema denticola* のヒト歯肉上皮細胞への侵入

稲垣覚、齋藤淳、君塚隆太、石原和幸

日本細菌学会雑誌 64(1): 164, 2008

⑤ 第91回日本細菌学会関東支部総会(平成20年10月24日)

生命の森リゾート 日本エアロビクスセンター(長柄町)

歯周病原菌 *Treponema denticola* のヒト歯肉上皮細胞への侵入

稲垣覚 齋藤淳 君塚隆太 石原和幸

第91回日本細菌学会関東支部総会講演抄録集

⑥ 第4回日中歯科医学会(9/28-29)(西安)

Treponema denticola dentilisin is involved in gingival epithelial cell invasion

Inagaki, S., Kimizuka, R. and Ishihara, K.

The fourth Sino-Japanese Conference on Stomatology Program and abstracts P170, 2008

- ⑦ IADR 86th General Session & Exhibition, Toronto 7/5 2008

Treponema denticola invasion of human gingival epithelial cells

S. INAGAKI, R. KIMIZUKA, K. OKUDA, and K. ISHIHARA,

Journal of Dental Research (CD-ROM) 86(Special Issue A), #3444, 2008.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 覚 (INAGAKI SATORU)

研究者番号 : 20385165