

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592387

研究課題名（和文） 自己免疫性肝疾患に関わる口腔レンサ球菌の病原因子の解明

研究課題名（英文） The study of oral streptococcal pathogenicity of autoimmune hepatitis

研究代表者 弘田 克彦 (HIROTA KASTUHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60199130

## 研究成果の概要（和文）：

自己免疫性肝疾患患者の胆管上皮細胞では、グラム陽性菌の菌体成分や毒素によりアポトーシスあるいはその制御の破綻が起こり、その結果、自己抗原である核膜抗原が細胞表面に表出される可能性が推測されている。本研究では、*S. intermedius*が産生する細胞溶解毒素のインターメディリシン(ILY) 10～40 ng/mlにより誘導される胆管上皮細胞死では、Ca<sup>2+</sup>振動が細胞死に先行してみられ、カルシニューリンNFAT1経路の活性化が生じ、非アポトーシス型胆管上皮細胞死が誘導されることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

In the present study we analyzed possible relationship between calcium oscillations and each phenomenon in order to find out the molecular mechanisms in ILY-induced bile duct epithelial cells. Intracellular free calcium was analyzed by performing calcium imaging analysis of Fura-2 loaded cells. Increased free calcium was initially detected in the nuclei of ILY-treated cells subsequently followed with markedly increase in ER area. Calcineurin inhibitor cyclosporine A prevented ILY-induced calcineurin/NFAT1 activation, cell death, and calcium oscillations. ILY in concentration of 10-40 ng/ml capable of inducing calcium oscillations, activation of calcineurin/NFAT1 signalling pathway; inactivation of PI3K/AKT/MTOR pathway, and caused ER stress disorder resulted non-apoptotic cell death in HuCCT1 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：*S. intermedius*、細胞溶解毒素、胆管上皮細胞、アポトーシス、

Ca<sup>2+</sup>振動、NFAT、サイトカイン、カルシニューリン

## 1. 研究開始当初の背景

肝疾患をはじめとする全身疾患を惹起する原因菌の一つに、ヒトの口腔レンサ球菌 *Streptococcus anginosus* group (SAG) がある。基盤研究 C (平成 10, 11 年度) 研究課題名 (肝疾患を惹起する口腔レンサ球菌の病原因子の解明) を含む現在までの研究結果より、我々は歯周組織からの本菌群に属する *S. intermedius* の持続的な菌液接種により、マウス肝臓の小葉間胆管にヒトの原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis ; PBC) でみられる慢性非化膿性破壊性胆管炎様の像が惹起されることが明らかにしている

(Murakami K, et al. J Dent Res 1998, 77, 728, Haruta I, et al. Clin Immunol, 2008, 127, 245-251, Haruta I, et al. Lab Invest, 2010, 90, 577-588)。PBC は、中年以降の女性に好発し、肝小葉内胆管の変性、破壊による慢性肝内胆汁うっ滞をきたす自己免疫性肝疾患である。発生機序として現在考えられているものには感染症説があるが、今なお不明である。

*S. intermedius* UNS46 株から、ヒトに特異性を示す細胞溶解毒素インターメデイリン (ILY, 54kDa) が同定、精製されている。

## 2. 研究の目的

*Streptococcus intermedius* は膜孔形成毒素 (ILY) を産生する。我々は 10~40 ng/ml ILY により誘導される胆管上皮細胞死では、Ca<sup>2+</sup>振動が細胞死に先行してみられることを見出した。本研究では、ILY により生じる Ca<sup>2+</sup>振動により、カルシニューリン NFAT1 経路の

活性化が生じ、非アポトーシス型胆管上皮細胞死が誘導されることをまずはじめに明らかにすることを目的とした。さらに *S. intermedius* histone-like DNA binding protein (*Si*-HLP) により、培養ヒト単球様細胞 (THP-1) において MEK-ERK1/2 及び SAPK/JNK 経路を介して、炎症性サイトカインの産生を増強することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 毒素 (弘田、三宅)

ILY には *S. intermedius* UNS46 (肝膿瘍由来株) が培養上清中に産生したものを精製して使用。

### 2. 細胞株と細胞培養 (弘田)

ヒト肝内胆管癌細胞由来の HuCCT1 株を、10% Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, USA) と 100U/ml の penicillin, 100µg/ml の streptomycin を加えた RPMI-1640 medium (Gibco BRL, USA) により 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で培養。

### 3. 細胞生存率 (弘田、鹿山)

WST-8 と生細胞染色用蛍光色素 Calcein-AM で検討。

### 4. 蛍光核染色 (弘田、根本)

0, 5, 20, 40 ng/ml 濃度の ILY を、1 h 培養液中に添加する。次に Hoechst33342 による蛍光核染色により核の濃縮について検討する。

### 5. 細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup>の変化 (弘田、三宅)

(1) 蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬 Fura-2 AM を生細胞内に取り込ませ、ARGUS-50 を使用して経時的変化を蛍光強度比 R(E340/E380) をもと

に標準曲線より定量する。

(2) 蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬 Fluo-4 AM を生細胞内に取り込ませ、共焦点単一面タイムラプス画像解析により動態を観察する。

#### 6. ILY 変異体による評価 (弘田)

不活性型の ILY(83 位のグリシンをシステインに、217 位のセリンをシステインにしたもの 20 ng/ml を HuCCT1 細胞に添加しても、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇はみられない。従って、pore が生じないと、Ca<sup>2+</sup>のシグナル伝達が生じないことを示す。

#### 7. 小胞体異常 (弘田)

小胞体・ゴルジ体の形態変化を透過型電子顕微鏡で観察する。小胞体膜タンパクである BiP に対する抗体と直径 5nm の金コロイドを標識した 2 次抗体を用いて免疫電顕を行い、空胞は小胞体が異常膨潤したものであることを示す。異なった ILY 濃度による BiP の経時的変化をウエスタンブロット法により検討する。比較のためミトコンドリアタンパクである Hsp60 の変化も調べる。

#### 4. 研究成果

*Streptococcus intermedius* は膜孔形成毒素 (ILY) を産生する。我々は 10~40 ng/ml ILY により誘導される胆管上皮細胞死では、Ca<sup>2+</sup>振動が細胞死に先行してみられることを見出した。本研究では、ILY により生じる Ca<sup>2+</sup>振動により、カルシニューリン NFAT1 経路の活性化が生じ、非アポトーシス型胆管上皮細胞死が誘導されることを明らかにした。さらに *S. intermedius* histone-like DNA binding protein (Si-HLP) により、培養ヒト単球様細胞 (THP-1) において MEK-ERK1/2 及び SAPK/JNK 経路を介して、炎症性サイトカインの産生を増強することを報告した。

#### 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 4 件)

1. Hirota K, Yumoto H, Miyamoto K, Yamamoto N, Murakami K, Hoshino Y, Matsuo T, Miyake Y. MPC-polymer reduces adherence and biofilm formation by oral bacteria. 90, J Dent Res, 2011, 査読有, 900-905  
DOI:10.1177/0022034511402996
2. Susilowati H, Okamura H, Hirota K, Shono M, Yoshida K, Murakami K, Tabata A, Nagamune H, Haneji T, Miyake Y. Intermedilysin induces EGR-1 expression through calcineurin/NFAT pathway in human cholangiocellular carcinoma cells. 404, Biochem Biophys Res Commun, 2011, 査読有, 57-61  
DOI:10.1016/j.bbrc.2010.11.057
3. Hirota K, Yoneyama T, Sakamoto M, Miyamoto H, Kurihara M, Kayama S, Murakami K, Yumoto H, Matsuo T, Miyake Y. High prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* from oropharyngeal biofilm in patients with cerebrovascular infarction and dysphagia. 138, Chest, 2010, 査読有, 237-238  
DOI:10.1378/chest.10-0240
4. Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, Nakamura M, Miyakawa H, Hirota K, Shibata N, Kato H, Arimura Y, Kato Y, Uchiyama T, Nagamune H, Kobayashi M, Miyake Y, Shiratori K, Yagi J. Long-term bacterial exposure can

trigger nonsuppurative destructive  
cholangitis associated with  
multifocal epithelial inflammation.  
90, Lab Invest, 2010. 査読有, 577-588  
DOI:10.1038/labinvest.2010.40

[学会発表] (計 7 件)

1. Asikin Nur, Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Kanako Takahashi, Keiji Murakami, Yoichiro Miyake. The effect of extracellular DNA on the development of *Streptococcus intermedius* biofilm. 2011. 10 月 22-23 日, 第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 岡山大学津島キャンパス (岡山市)
2. Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, Asikin Nur, Kouji Hirao, Kanako Takahashi, Dali Liu, Keiji Murakami, Takashi Matsuo, Yoichiro Miyake. Gene expression profiling of human monocytic THP-1 cells stimulated with extracellular *Streptococcus intermedius* histone-like DNA binding protein, 2011. September 6-10, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo Convention Center, (Hokkaido, Japan)
3. 近藤洋史, 小野恒子, 弘田克彦, 村上圭史, 三宅洋一郎, 湯本浩通, 高橋加奈子, 平尾功治, 松尾敬志. THP-1 細胞のケモカイン産生に及ぼす口腔レンサ球菌ヒストン様 DNA 結合タンパク質の影響. 2010. 12 月 12 日, 第 34 回徳島県医学検査学会, 徳島大学医学部保健学科 C

棟 (徳島市)

4. 平尾功治, 湯本浩通, 弘田克彦, 高橋加奈子, 木村智子, 三宅洋一郎. *Streptococcus intermedius* 由来 histone 様 DNA 結合タンパク質がヒト単球系細胞のサイトカイン・ケモカイン産生に及ぼす影響. 2010. 10 月 16-17 日, 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 松山大学文京キャンパス (松山市)
5. 弘田克彦, 三宅洋一郎. *Streptococcus intermedius* ヒストン様タンパク質が THP-1 細胞のサイトカインバランスに及ぼす影響. 2010. 9 月 20-22 日, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, タワーホール船堀 (東京都)
6. 弘田克彦, 鹿山鎮男, 村上圭史, 湯本浩通, 三宅洋一郎. Intermedilysin による小胞体異常の分子機構の解明. 2010. 3 月 27-29 日, 第 83 回日本細菌学会総会, パシフィコ横浜 (横浜市)
7. 弘田克彦, 鹿山鎮男, 湯本浩通, 三宅洋一郎. Intermedilysin に誘導される HuCCT1 細胞 gp210 の分布変動. 2009. 10 月 16-17 日, 第 62 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 広島大学霞キャンパス (広島市)

[その他]

ホームページ等

[http://www.dent.tokushima-u.ac.jp/saikin/research\\_J.html](http://www.dent.tokushima-u.ac.jp/saikin/research_J.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

弘田 克彦 (HIROTA KATSUHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号：60199130

(2) 研究分担者

三宅 洋一郎 (MIYAKE YOUICHIROU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：80136093

根本 謙 (NEMOTO KEN)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：10218274

鹿山 鎮男 (KAYAMA SHIZUO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：50432761

(H21 研究分担者)

(3) 連携研究者

なし