

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 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791796

研究課題名（和文） Toll 様受容体を介した口腔内グラム陽性菌の免疫活性化作用の解明

研究課題名（英文） Elucidation of Toll-like receptor mediated immune activation effects induced by oral gram-positive bacteria

研究代表者

片岡 嗣雄 (KATAOKA HIDEO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60451390

研究成果の概要（和文）：

口腔内グラム陽性菌による歯周疾患誘発の詳細な分子機構は、現在まで明らかにされていない。本研究では、口腔内グラム陽性菌である *Streptococcus* 属ならびに *Actinomyces* 属の菌体由来リポタンパク質が、宿主細胞の Toll-like receptor 2 を介して炎症応答を誘導するという分子機構を明らかにした。このことから、これらのリポタンパク質が歯周疾患誘発因子になっていることが推察された。

研究成果の概要（英文）：

It has not been shown the detail molecular mechanisms of inducing periodontal inflammation by oral gram-positive bacteria. In this study, we showed a molecular mechanism that bacterial lipoproteins of Oral Streptococci and Actinomyces induce inflammatory responses via Toll-like receptor 2 in host cells. This finding suggests that these bacterial lipoproteins could be an inducing factor of periodontal inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は、プラークバイオフィルムの蓄積が原因とされ、その継続的な刺激が歯周組織

に炎症を起こすと考えられている。数種のグラム陰性菌に関しては、リポ多糖 (LPS) や

タンパク質分解酵素が炎症の誘発因子であることが示されていたが、プラーク細菌叢の大部分を占めるグラム陽性菌に関しては、歯周疾患誘発との関連性が不明であった。グラム陰性菌と陽性菌の両方に存在する菌体成分であるリポタンパク質は、大腸菌で初めて発見され、免疫担当細胞を活性化することが明らかにされたが、その病因論的な役割の詳細は不明である。一方、宿主細胞は Toll 様受容体によって微生物由来の分子パターンを認識し、自然免疫応答を誘導することが明らかにされている。この Toll 様受容体の中でも Toll-like receptor 2 (TLR2) は微生物由来のリポタンパク質を認識し、炎症性サイトカインの産生を誘導している。しかしながら、グラム陽性菌由来のリポタンパク質がもつ免疫活性化作用、炎症誘導活性に関しては不明な点が多く、口腔内グラム陽性菌由来のリポタンパク質に関しては、全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

このような背景をふまえて、本研究では、口腔内グラム陽性菌のリポタンパク質が宿主細胞の TLR2 を介して誘導する免疫活性化作用について検討し、口腔内グラム陽性菌のリポタンパク質の病原性と、その歯周疾患誘発への関与について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リポタンパク質の抽出

口腔内グラム陽性菌として *Streptococcus mutans* 109c 株、*Streptococcus sobrinus* NIDR6715 株、および *Actinomyces viscosus* ATCC19246 株を使用し、それぞれの菌体から Triton X-114 を用いた二相分離法で、リポタンパク質を含む脂溶性画分を抽出した。

(2) 炎症・免疫応答のリポタンパク質依存

性の検討

炎症に関わる単球系細胞の口腔内グラム陽性菌に対する応答を調べるために、phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) でマクロファージ様に分化させたヒト単球系細胞 THP-1 (THP-1/PMA) ならびにヒト口腔上皮細胞 HSC-2 を使用し、上記 (1) の菌株の生菌ならびに脂溶性画分で刺激し、炎症性サイトカイン (IL-8、TNF- α) の産生量をサンドイッチ ELISA 法で定量した。

さらに、炎症性サイトカイン産生のリポタンパク質依存性を明らかにするために、刺激活性を示した脂溶性画分をリポプロテインリパーゼで処理し、非処理群との比較を行った。

(3) 炎症・免疫応答の TLR2 依存性の検討

上記 (2) の炎症応答に TLR2 が関与しているかどうかを明らかにするために、TLR2 中和抗体で前処理した THP-1/PMA ならびに HSC-2 における炎症性サイトカイン産生量を定量し、非処理群との比較を行った。さらに、内在性の TLR2 を発現していない HEK293 細胞に転写因子 NF- κ B のレポーター遺伝子を TLR2 遺伝子と共に導入し、生菌ならびに脂溶性画分で刺激した時の NF- κ B 活性化をルシフェラーゼレポーター法で計測した。

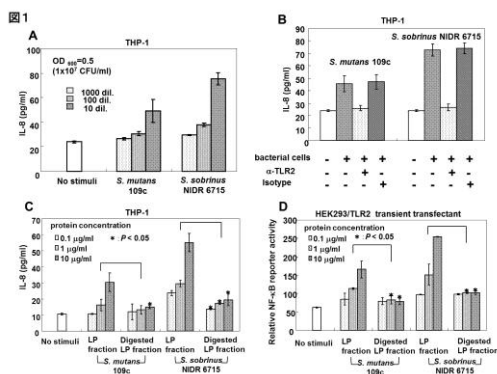
4. 研究成果

(1) *S. mutans* ならびに *S. sobrinus* の炎症誘導活性

*S. mutans*109c 株ならびに *S. sobrinus*NIDR6715 株は、いずれの生菌も THP-1/PMA において IL-8 産生を誘導したが (図 1A)、TLR2 中和抗体の存在下で刺激すると、その活性が完全に阻害された (図 1B)。また、菌体から抽出した脂溶性画分も生菌による刺激と同様に THP-1/PMA において IL-8 産生を誘導し、TLR2 遺伝子を導入した

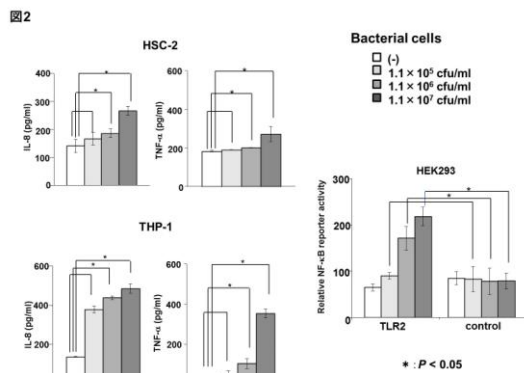
HEK293 において転写因子 NF- κ B を活性化させたが、これらの活性はリポプロテインリパーゼ処理によって完全に失われた (図 1C,D)。以上の結果より、ヒト齲蝕の主要な原因菌として知られる *S. mutans* ならびに *S. sobrinus* は、菌体成分のリポタンパク質が TLR2 に認識されることによって、宿主細胞に炎症応答を誘導しているのではないかと、いう可能性が推測された。

この成果は、第 82 回日本細菌学会ならびに第 3 回ヨーロッパ微生物学会で発表した。

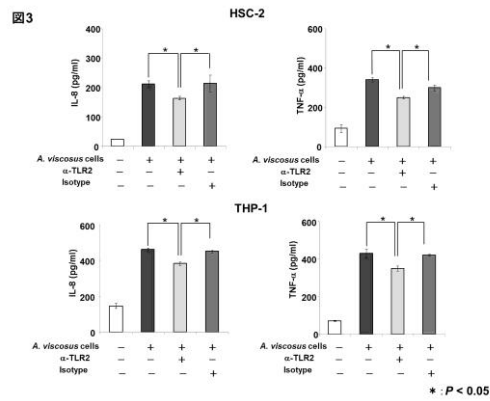


(2) *A. viscosus* の炎症誘導活性

A. viscosus ATCC19246 株の生菌は、HSC-2 ならびに THP-1/PMA において IL-8 ならびに TNF- α の産生を誘導し、TLR2 遺伝子を導入した HEK293 において転写因子 NF- κ B を活性化した (図 2)。

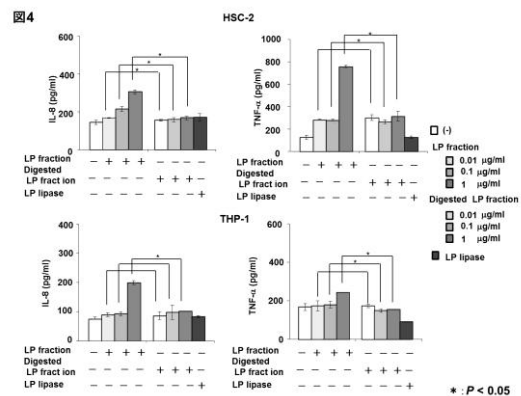


しかし、TLR2 中和抗体で前処理した後に刺激を行うと、IL-8 ならびに TNF- α の産生量が有意に減少した (図 3)。

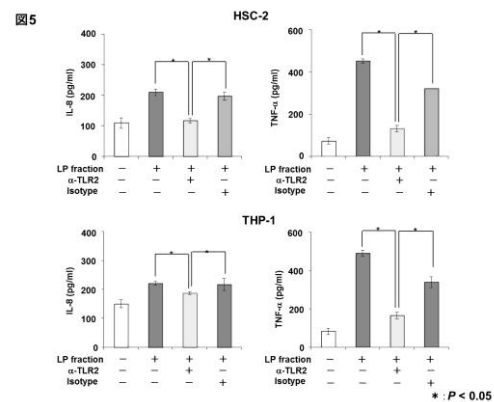


これらの結果から、*A. viscosus* の生菌は、ヒト細胞において炎症応答を誘導する活性を持つことが示され、その炎症応答には TLR2 が関与していることが示唆された。

菌体から抽出した脂溶性画分も生菌と同様の活性を示したが、リポプロテインリパーゼ処理により、その活性は完全に失われた (図 4)。



さらに、TLR2 中和抗体での前処理により、IL-8 ならびに TNF- α の産生量が有意に減少した (図 5)。



これらの結果から、*A. viscosus* 菌体の脂溶性画分に含まれるリポタンパク質に、TLR2 を介した炎症誘導活性があることが示された。

以上の結果より、*A. viscosus* の菌体成分のリポタンパク質が TLR2 に認識されることによって、宿主細胞に炎症応答を誘導しているという分子機構が示唆された。

この成果は、*Microbes and Infection* 誌に採択され、現在印刷中である。

口腔内グラム陽性菌のリポタンパク質は、その病原性が不明であった。上記の研究成果は、口腔内グラム陽性菌のリポタンパク質に炎症誘導活性があることを明らかにしたものであり、病原因子の一つとして歯周疾患の発生・進行に関与していることを強く示唆するものである。本研究の成果は、口腔内グラム陽性菌のリポタンパク質が、歯周疾患の予防法や治療法の開発における新たな標的分子として有用であることを示したと考えられる。さらに、口腔内グラム陽性菌に起因する全身疾患の予防や治療にも役立つものと期待される。

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 1 件)

① Shimada E, Kataoka H, Miyazawa Y, Yamamoto M, Igarashi T. Lipoproteins of *Actinomyces viscosus* induce inflammatory responses through TLR2 in human gingival epithelial cells and macrophages. *Microbes and Infection*. In press (DOI:10.1016/j.micinf.2012.04.015), 2012. 査読有.

[学会発表] (計 1 件)

① Kataoka H, Takahashi M, Shibata Y, Igarashi T, Lipoproteins of human cariogenic bacteria are responsible for inflammation-inducing activity mediated

by Toll-like receptor 2, 3rd Congress of European Microbiologists, June 28-July 2, 2009, Gothenburg, Sweden

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 嗣雄 (KATAOKA HIDEO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60451390