

機関番号：32650

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792069

研究課題名(和文) 小児の口腔アレルギー疾患に関与する口腔レンサ球菌と自然免疫応答の破綻

研究課題名(英文) The presence of specific oral streptococci and hyperfunction of innate immune response are causative factors for childhood allergy diseases in oral area.

研究代表者

桜井 敦朗 (SAKURAI ATSUO)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90431759

研究成果の概要(和文)：

本研究では、口腔内で特に病原性を示すことはないと考えられていたサングイスレンサ球菌、アンギノーサスレンサ球菌の一部に上皮細胞内へ侵入する能力があることを明らかにした。その結果上皮細胞の炎症性サイトカイン産生増強、免疫担当細胞の遊走を促すことが示された。さらに線毛構造をつくるタンパク(pili)の有無がサングイスレンサ球菌の細胞侵入性に大きく影響することがわかった。口腔内に多く存在する一つの菌種でも、piliのほかさまざまな因子の有無によって生体に対する病原性が大きく異なり、その機能によってアレルギー疾患やその他の疾患の原因になっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Streptococcus sanguinis is a predominant bacterium in the human oral cavity. Some *S. sanguinis* strains are considered beneficial because they are reported to attenuate inflammatory responses caused by periodontopathogens. We identified *S. sanguinis* strain SK36 had an ability to adhere to and invade into human epithelial cells. Pili of *S. sanguinis* was an important factor to bind to fibronectin, and such binding ability to ECM proteins contribute to such invasion. SK36 enhances the immune responses of host cells such as overexpression of inflammatory cytokines and beta-defensin. A standard *S. sanguinis* strain ATCC10556 and pili defective mutant of SK36 failed to invade into epithelial cells and to stimulate the immune response. Taken together, our results suggest the possible involvement of pili in the pathogenesis of infective endocarditis, oral allergic diseases, and disorder of immune system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児歯科学

キーワード：小児歯科学 口腔レンサ球菌 上皮細胞 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、アトピー性皮膚炎に代表されるようにアレルギー疾患を持つ小児は増加の一途である。口腔内の環境が原因で起こりうるアレルギーとしては、食物アレルギーの他、金属アレルギーがある。歯科材料として使われる金属は、常に唾液に曝されているため溶出しやすくアレルゲンとなりやすい。特に小児の場合、乳歯冠やインレーに使われるニッケル、クロム、亜鉛、スズなどの金属がアレルギーを起こしやすいことが指摘されている。しかし、金属がそのままアレルギーを起こすことは無く、何らかの炎症応答のトリガーが必要であると考えられている。金属と同時に細菌の菌体成分をラットに局所投与したときのみ同部の腫脹が観察されたという報告もあるが、金属や細菌が宿主にどのように認識され、アレルギーを引き起こすのかについては不明の点が多い。

ところで、生体内では、侵入した細菌やウイルスなどの病原体に対する生来のレセプター（TLR 遺伝子群や NLR 遺伝子群）をもつ。これらは、病原微生物の表面構造の一部を認識して自然免疫を作動させ、その後の獲得免疫の誘導にも不可欠なものである。そのうち NLR 遺伝子群は細胞内に発現しているレセプターでその機能については未知のものが多いが、最近になって NLR の一種である Nalp3 が尿酸結晶やアスベストなど、宿主にとっての 'danger signal' をも認識して炎症応答を生じさせることが明らかとなってきており、こうしたレセプターは病原体以外の異物も認識して何らかの応答を起こしている可能性が高い。

口腔内には、齶蝕を引き起こす口腔レンサ球菌をはじめとして数百種の細菌が存在するため、口腔や咽頭粘膜の上皮は常に細菌の存在を認識していると考えられる。しかし口腔上皮細胞は種々の TLR および NLR を発現しているにもかかわらず、これらのリガンド刺激を加えてもほとんど炎症性サイトカインが産生されない。このため、口腔上皮細胞では通常は炎症性応答を起こさない状態に制御されているが、何らかの因子によってひとたび炎症を起こしたり、細胞内外への長時間の定着や侵入を許したりした場合にはさらに強い免疫応答を引き起こすと考えられている。また、上皮細胞から産生されるサイトカインが免疫担当細胞の遊走を招き、単球やリンパ球によって相乗的に更なる炎症を引き起こすことになる。金属アレルギーの症状として金属に触れる口腔粘膜の発赤を起こすことが多い。歯科金属やそのイオン化合物は長期間にわたって上皮に触れ続けることから、上皮細胞に対して強い免疫応答を引き起こすトリガーになりうると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、口腔レンサ球菌をターゲットとし、宿主細胞への付着・侵入能をもつ菌株がどのように TLR や NLR によって認識され、口腔内でどのように免疫応答を起こすのかを検討した。またアレルギーをはじめとする疾患を引き起こす原因として、各種の金属等リガンドの添加下で細菌感染をさせ免疫応答に変化が生じるか調べた。口腔、咽頭上皮細胞、免疫担当細胞としてマクロファージや T 細胞、ラットを用いて炎症性応答、抗菌因子の発現、抗体の産生、アポトーシスの誘導について解析し、口腔内の炎症応答や金属アレルギーへの関与を検討した。

小児におけるアレルギー疾患は近年増加しており、その原因に関する研究も多く行われている。食物・金属アレルギーではアレルゲンになりうる物質の特定も進んでおり、その成因についても肥満細胞やリンパ球などの免疫担当細胞の関与が明らかとなっている。しかし、アレルゲンとなりうる物質と最初に接触するのは上皮組織であり、特に口腔、咽頭上皮は接触機会も非常に多いと考える。口腔レンサ球菌は口腔内では齶蝕以外に感染症を起こすことは少ないと考えられているが、これまでの研究で、口腔レンサ球菌の中にも継続的に細胞に付着・侵入する菌株が存在することが明らかとなった。申請者は、アレルゲンの存在と細菌の長期にわたる付着・侵入という要因が、炎症性免疫応答を抑制している上皮細胞の制御を除去して炎症性応答を生じさせ、そこに免疫担当細胞が遊走して過剰な免疫応答をすることでアレルギーが発生・増悪するのではないかと考えた。アレルギーの発症に対し上皮組織や自然免疫系レセプターの関与を示した報告は少なく、またアレルギーの成立機序についても不明の点が多い。アレルギーの発症機序の詳細を明らかにするために本研究を行うことは疾患の治療法・予防法の確立にも有用であると考えている。

3. 研究の方法

1) 細胞内付着・侵入能をもつ口腔レンサ球菌株の検索

従来、口腔レンサ球菌は一般的に細胞付着・侵入能を示さないと考えられていたが、目的にも述べたとおり、申請者は、強い細胞付着・侵入能を示す臨床分離株が存在することを見出している。そこで、最初に、どのような菌種・菌株が細胞付着・侵入能を有するのかを系統的に検索した。本研究では各種の口腔・咽頭領域由来の上皮細胞株を用い、口腔レンサ球菌の各標準株、臨床分離株を感染させた。1~3 時間培養後、細胞を破碎した液を希釈し BHI 寒天培地に播種して生えてきたコロニーを数えることで細胞付着菌を、感染

後、抗生物質を加えた培地に置き換えてさらに培養することにより細胞外に存在する菌を殺菌し、同様にコロニー数を数えることで細胞内侵入菌を計測した。これまでの実験で細胞に付着、あるいは侵入する菌株が存在することを確認しているが、本研究ではさらに菌種・菌株数を増やし、系統的にスクリーニングを行い、臨床上的病原性との関連付けを行った。

2) 付着，侵入菌体の細胞内での動態の評価

宿主細胞への付着・侵入を認める菌株について、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を行った。細胞内侵入菌は、その多くが細胞膜の陥入によって形成されるエンドソームを介して細胞内に入るため、初期エンドソームマーカーRab5に蛍光タンパクを付した融合タンパクを発現するプラスミドを用いた。これによって、細胞内で菌体がどのような挙動を示すのか、どの程度生存できるのかを観察した。また申請者は細胞侵入に関与する特定のタンパクの発現を抑制するためのmiRNAi発現用プラスミドを保有しており、これらを用いて細胞付着・侵入への影響を検討した。上皮細胞には各種プラスミドをリポフェクション法にて導入して感染実験に供する。臭化プロピジウムにより細胞、細菌の核酸を染色後、顕微鏡を用いて細菌の動態を観察する。

3) 上皮細胞の細菌感染に対する免疫応答の解析

各種の上皮細胞に対し付着・侵入を認める菌株を感染させ、抗菌因子 β -defensin、炎症性サイトカインIL-6、IL-8、アポトーシス誘導因子の発現を解析した。各mRNAおよびタンパクの発現を解析するため、固定した細胞への免疫染色、ELISA法、ウエスタンブロット法、リアルタイムPCRの手法を利用した。上皮細胞にそのまま細菌を感染させても炎症性応答は起きにくいという報告もあることから、細菌侵入に関与する特定のタンパクの発現を、プラスミド導入による強制発現やmiRNAの導入による抑制によって変化させ、免疫応答に与える影響を検討した。

4) アレルギー疾患に対する口腔レンサ球菌感染とTLRs, NLRsの関与の検討

口腔組織に過剰な炎症性免疫応答を起こさせる因子を検討するため、上皮細胞に対し、感染前に歯科材料に使われるニッケル、クロム、亜鉛、スズなどの金属を加え、その上で細菌感染を行った。特に、最近、アスベストや水酸化アルミニウムに対する炎症応答で重要な役割を果たしているNALP3の活性化が起こるかどうかを中心に検討を加えた。その上で抗菌因子、炎症性サイトカインの発現に変化が無いかを検討した。またマクロファ

ージのcell lineも用いて同様の金属の添加、感染を行い、その培養上清を上皮細胞培養中に添加した。アレルギーを引き起こすのは肥満細胞や好塩基球であることが多い。金属アレルギーはIV型に分類されリンパ球や単球の関与が考えられている。上皮組織が炎症を起こすとこれらの免疫担当細胞が遊走すると考えられることから、逆に上皮細胞への感染で得られた培養上清をリンパ球などの培養中に添加し、炎症性サイトカインや抗体の産生を計測した。その上で、免疫応答に変化が認められる細菌と金属の組み合わせを検討した。

これらの研究を通じて、口腔レンサ球菌による付着・侵入と口腔アレルギー発症の関連を明らかにすることが出来ると期待される。

4. 研究成果

まず、口腔由来上皮細胞HSC-2、咽頭由来上皮細胞Hep-2、子宮頸癌由来のHeLaを用い、口腔レンサ球菌を感染させて細胞付着・侵入性の検討を行った。*Streptococcus mutans*, *sobrinus*, *sanguinis*, *gordonii*, *oralis*, *salivarius*, *mitis*, *downei*, *anginosus*, *intermedius*, *constellatus*の各標準株、臨床分離株、対照株として化膿レンサ球菌の*Streptococcus pyogenes*を供試したところ、化膿レンサ球菌のほか、特に病原性を示すことはないと考えられていた*S. sanguinis*およびアンギノサスレンサ球菌の一部に上皮細胞内に強固に付着し、さらには侵入する能力があることが明らかになった。細胞侵入性を示す菌株については、さらに上皮細胞への感染後、パラホルムアルデヒドによる細胞の固定を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて宿主細胞への付着・侵入を観察した。(図1)。特に細胞侵入性をもつ*S. sanguinis*の中にはこれまでに全ゲノム解析がなされ遺伝子構造が公開されている菌株(SK36株)が

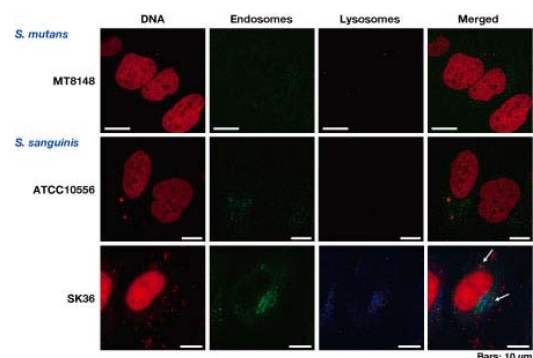


図1: サングイスレンサ球菌の上皮細胞への侵入. 左(赤):DNA, 中(緑):エンドソーム, 右(青):リソソーム. Bars: 10 μ m.

含まれていた。その中で申請者らは、他菌種で報告されている pili (線毛) 様構造物をコードする遺伝子に相同性の高い部分があることに注目した。Pili は *S. pyogenes*, *agalactiae*, *pneumoniae* において近年同定され、宿主細胞への付着性に関与することが報告されているタンパクである。そのため、Pili の細胞付着・侵入に対する影響を検討するため、ノックアウト株を作製した (Δ pili)。その結果、 Δ pili 株では各上皮細胞に対する付着侵入性が有意に減少し、Pili が付着・侵入に関与しうる因子であることが示唆された (図 2)。また、 Δ pili 株では野生株に比べ、唾液をコートした硬組織表面 (歯面モデ

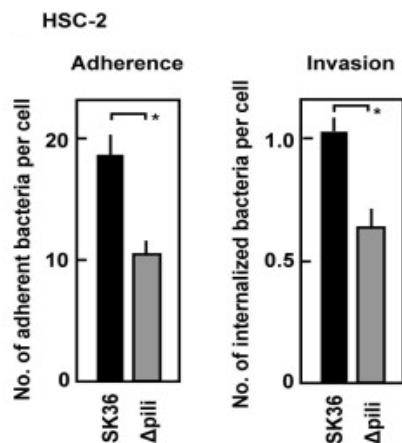
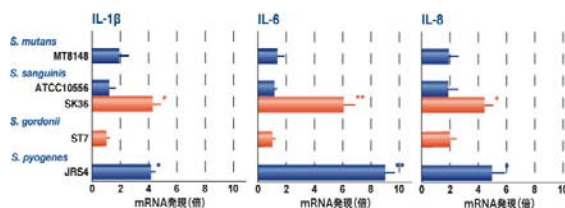


図 2: *S. sanguinis* pili の上皮細胞への付着・侵入に与える影響。

ル) に対する付着性も減少し、Pili が唾液中のアミラーゼに対する吸着性が関与していることが考えられた。*S. sanguinis* は歯面上において特定の齶蝕原性菌や歯周病菌の定着を阻害することが報告されているが、Pili の発現によってはかえって口腔内細菌の歯面への定着を助け、バイオフィルムの形成を促している可能性もある。

次に、上皮細胞への付着・侵入性の有無によって、細胞の免疫応答性に違いがあるかを検討するために、*S. sanguinis* 各菌株を感染させた上皮細胞の炎症性サイトカイン IL-1, IL-6, IL-8 や MCP-1, 抗菌因子 b2-defensin 2, ペプチドグリカン認識タンパク PGRP-1a の産生を RT-PCR や ELISA 法によ



て検討した。その結果、細胞内侵入性をも

図 3: *S. sanguinis* 細胞内付着侵入能を持つ菌株感染に伴う免疫応答。

つ菌株の感染細胞において、炎症性サイトカインの発現がいずれも上昇し、b2-defensin についても発現増強が認められた (図 3)。さらにこうした免疫応答は、 Δ pili 株を感染させた場合では大きく減弱した。

口腔内に多く存在する一つの菌種でも、pili のほかさまざまな因子の有無によって生体に対する病原性が大きく異なり、その機能によってアレルギー疾患やその他の疾患の原因になっている可能性が示唆された。ヒトの複雑かつ多彩な口腔内細菌叢を考えたとき、現在でも培養のできない、研究の進んでいない菌種は多く、口腔内・全身疾患の発症に直接的、間接的に関与している菌もまだまだ多いと推察される。

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 6 件)

1) N. Okahashi, M. Nakata, Y. Terao, R. Isoda, A. Sakurai, T. Sumitomo, M. Yamaguchi, R. K. Kimura, E. Oiki, S. Kawabata, T. Ooshima. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. **Microbial Pathogenesis**. 50:148-154. 2011. 査読有。

2) A. Sakurai, F. Maruyama, J. Funao, T. Nozawa, C. Aikawa, N. Okahashi, S. Shintani, S. Hamada, T. Ooshima, I. Nakagawa. The specific behavior of intracellular *Streptococcus pyogenes* undergone the autophagic degradation is associated with bacterial streptolysin O and host small G proteins Rab5 and Rab7. **Journal of Biological Chemistry**. 285(29):22666-22675. 2010. 査読有。

3) J. Funao-Tanigawa, T. Onishi, A. Sakurai, A. Kojima, H. Homma, T. Ooshima, M. Rakugi, and S. Shintani. Histopathological characteristics of primary teeth in pre-term very low birth-weight child: Case report. **Pediatric Dental Journal**. 20(2):182-185. 2010. 査読有。

4) N. Okahashi, N. Masanobu, A. Sakurai, T. Terao, T. Hoshino, M. Yamaguchi, R. Isoda, T. Sumitomo, K. Nakano, S. Kawabata, T. Ooshima. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 391(2):1192-1196, 2010. 査読有。

5) F. Maruyama, M. Kobata, K. Kurokawa,

K. Nishida, A. Sakurai, K. Nakano, R. Nomura, S. Kawabata, T. Ooshima, K. Nakai, M. Hattori, S. Hamada, I. Nakagawa. Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. **BMC genomics**. 10(Aug. 5): 358-378, 2009. 査読有.

6) F. Maruyama, T. Nozawa, C. Aikawa, A. Sakurai, I. Nakagawa. Cost effective DNA sequencing and template preparation from bacterial colonies and plasmids. **Journal of bioscience and bioengineering**. 107(4):471-473, 2009. 査読有.

〔学会発表〕(計6件)

1) 桜井敦朗 (招待講演). 母乳と齲蝕を細菌学から考察する. 千葉県小児歯科医会セミナー. 2010年8月22日. 千葉.

2) 桜井敦朗, 大川玲奈, 新谷誠康, 大嶋隆. 上顎骨腫瘍摘出術後に長期経過観察を行った一例.

第48回日本小児歯科学会, 2010年5月20日.

3) 岡橋暢夫, 中田匡宣, 桜井敦朗, 寺尾豊, 山口雅也, 星野倫範, 川端重忠, 大嶋隆. 口腔レンサ球菌 *S. sanguinis* 線毛 pili の機能. 第83回日本細菌学会総会. 2010年3月27日.

4) 桜井敦朗, 星野倫範, 岡橋暢夫, 森有可, 丸山史人, 藤原卓, 大嶋隆. *Streptococcus anginosus* の遺伝系統学的分類および宿主病原性に関する解析. 第83回日本細菌学会総会. 2010年3月27日.

5) 桜井敦朗, 岡橋暢夫, 中田匡宣, 寺尾豊, 丸山史人, 川端重忠, 大嶋隆. 口腔領域レンサ球菌による宿主上皮細胞への付着侵入と炎症の誘導. 第18回 Lancefield レンサ球菌研究会, 2009年6月27日.

6) 鎌倉尚史, 小畑充彦, 大川玲奈, 桜井敦朗, 大嶋隆. 石灰化が I 型コラーゲンの発現に与える影響. 第47回日本小児歯科学会, 2009年5月15日.

〔図書〕(計1件)

1) 桜井敦朗 (分担執筆). ①小児齲蝕症 (授乳と齲蝕の関係をどのように指導するか・最新の齲蝕病因論・哺乳齲蝕とその対応). ②歯冠修復処置 (乳臼歯隣接面コンポジットレジジン修復の適応と実際). デンタルダイヤモンド春期特別号「小児歯科はいま, 成育医療へ」. 4頁. p. 94, 96, 101, 138. 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桜井 敦朗 (SAKURAI ATSUO)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 90431759