

## 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 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2013

課題番号：22592317

研究課題名（和文）歯周病原菌の複数菌感染による宿主細胞侵入機構の解析と新規制御法の検討

研究課題名（英文）A study on the mechanisms involved in the invasion of host cells by periodontal pathogens and the novel method for its regulation

## 研究代表者

齋藤 淳（SAITO ATSUSHI）

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60266559

研究成果の概要（和文）：複数の歯周病原細菌による宿主細胞侵入の機序と意義の解明を目指し、*Fusobacterium nucleatum* の存在下で、*Porphyromonas gingivalis* のヒト歯肉上皮細胞への侵入が促進されるメカニズムについて検討した。*P. gingivalis* の侵入因子の一つである SerB 欠損株を使用した共焦点レーザー顕微鏡および antibiotic protection assay による解析の結果、*F. nucleatum* による *P. gingivalis* の侵入促進には *P. gingivalis* の SerB は大きな役割をはたしてないことが示唆された。一方で、この現象には宿主細胞の lipid raft が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In order to gain insight into the mechanism and significance of host cell invasion by periodontal bacteria in polymicrobial infection, we assessed *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells enhanced by *Fusobacterium nucleatum*. Confocal scanning laser microscopy and antibiotic protection assay were used to study the role of *P. gingivalis* invasin (SerB) in this phenomena. The results from the experiment using SerB-mutant strain showed that the *P. gingivalis* invasin does not play a major role in this phenomenon. It was demonstrated that lipid raft was involved in fusobacterial enhancement of *P. gingivalis* invasion.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：歯周炎，歯周病原細菌，侵入，バイオフィルム

## 1. 研究開始当初の背景

近年，特定の歯周病原細菌が宿主細胞に

侵入することが明らかとなっている。これは、歯周病原細菌が宿主免疫応答から逃れ、病原性を発揮するうえで重要な機構であると

考えられている。近年、複数の細菌、ウイルスがさまざまな相互作用により病原性を発揮する polymicrobial diseases への関心が高まっている。歯周病原細菌はバイオフィルムとして複雑な相互作用のなかで活動しており、polymicrobial 感染の概念でその病原性と宿主の反応をとらえる必要がある。しかし、歯周病原細菌の宿主細胞侵入に関する従来の研究は、単独の細菌を対象としたものが主であり、複数の特定細菌がどのような相互作用のもとで宿主細胞に侵入し、病原性を発揮するかについては未だ明確にされていない点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究は polymicrobial 感染の視点から、歯周病原細菌の宿主細胞への侵入機構を明らかにすることを目指し、*Fusobacterium nucleatum* の存在下における *Porphyromonas gingivalis* のヒト歯肉上皮細胞への侵入について解析を行った。

## 3. 研究の方法

宿主細胞としてヒト歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) を使用し、*P. gingivalis* ATCC 33277 および *F. nucleatum* TDC 100 を感染させた。細胞侵入は走査型電子顕微鏡 (SEM)、共焦点レーザー顕微鏡 (CSLM) および antibiotic protection assay を使用して検討した。Lipid raft の関与については、そのマーカーである GM-1 を使用した CSLM および阻害実験で、*P. gingivalis* の invasin である SerB の関与については、SerB 欠損株を用いた実験で検討した。

## 4. 研究成果

(1) SEM による観察では、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* が共凝集して Ca9-22 に侵入している像や *P. gingivalis* が独立して侵入している像が認められた (図 1)。

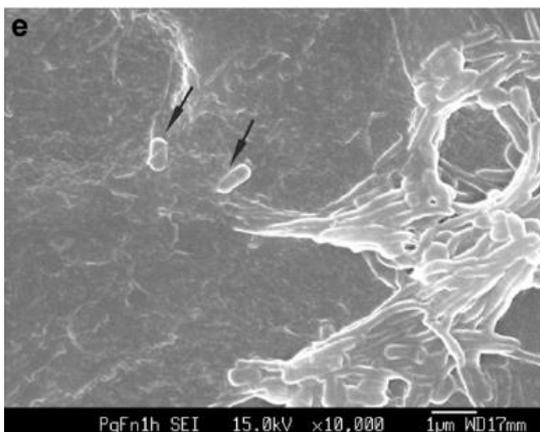


図 1 *F. nucleatum* と *P. gingivalis* によるヒト歯肉上皮細胞への侵入

(2) *F. nucleatum* を Ca9-22 に最初に 1 時間感染させた後に、*P. gingivalis* を加え 1 時間さらにインキュベートし、*P. gingivalis* の侵入能を同時感染の場合と比較検討した。CSLM による解析の結果、同時感染の場合は、*P. gingivalis* が侵入している細胞の比率が多かったが、最初に *F. nucleatum* を感染させ、*F. nucleatum* が侵入した細胞には、その後の *P. gingivalis* の侵入は著しく抑制された。この知見は、複数菌感染では、それぞれの菌の感染のタイミングが重要な影響を与えること、*F. nucleatum* と *P. gingivalis* は異なる機構で宿主細胞へ侵入していることを示している。

(3) *P. gingivalis* 33277 の wild type strain, SerB mutant, そして complement strain を使用し、*F. nucleatum* 存在下で Ca9-22 への侵入率を検討した。*F. nucleatum* により *P. gingivalis* SerB mutant も侵入促進が認められた (図 2)。このことから、*P. gingivalis* による Ca9-22 への侵入促進メカニズムには、*P. gingivalis* の SerB は大きな役割を果たしていないことが示唆された。

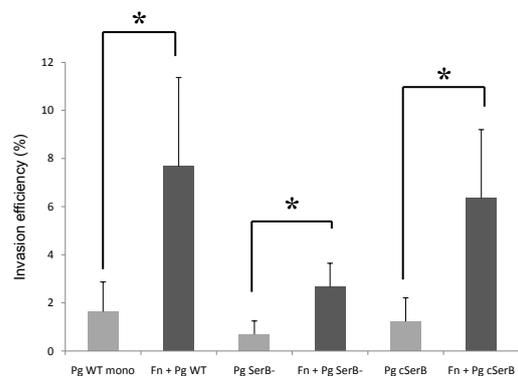


図 2 *F. nucleatum* による *P. gingivalis* SerB 欠

損株の細胞侵入への影響

(4) 続いて、様々な細菌の宿主細胞侵入に関わることが知られている membrane microdomain である lipid raft について、その関わりを検討した。CSLM による解析では、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* とを感染させた Ca9-22 において、これらの菌体と lipid raft マーカーである GM1 との共局在が観察された。

上皮細胞表面のコレステロールを M $\beta$  CD で処理してこれらの菌を感染させ、侵入につい

て antibiotic protection assay で検討したところ、*P. gingivalis* および *F. nucleatum* の侵入は、非処理のコントロール群に比べて約 1/3 に低下した (表 1)。この結果から、*F. nucleatum* による *P. gingivalis* の進入促進には、lipid raft が関与していることが明らかとなった。

表 1 Ca9-22 への侵入に対する M $\beta$ CD の効果

Infection	Invasion of Ca9-22 (% of untreated control)
Mono-infection	
<i>P. gingivalis</i>	33.4 $\pm$ 18.4*
<i>F. nucleatum</i>	13.3 $\pm$ 14.5*
-----	
Poly-infection	
<i>P. gingivalis</i>	14.4 $\pm$ 11.4*
<i>F. nucleatum</i>	27.2 $\pm$ 15.9*

以上の知見は、polymicrobial infection の状況下における歯周病原細菌による宿主細胞への侵入の機序と意義を解明するうえで有用である。歯周病原細菌による宿主細胞への侵入の制御は、歯周炎や動脈硬化症の進展の予防・治療において重要な戦略となる可能性がある。

#### 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 5 件)

①齋藤 淳. 歯科における最近の抗菌薬の使い方, 考え方 5. 歯周病治療と抗菌薬 一宿主に潜む歯周病原細菌への対応. 歯科医療 25:37-43, 2011

<http://www.ds-pub.jp/magazinenumber.htm>

②Hosaka Y, Saito A, Maeda R, Fukaya C, Morikawa S, Makino A, Ishihara K, Nakagawa T. Antibacterial activity of povidone-iodine against an artificial biofilm of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. Archives of Oral Biology 57:364-368, 2012 (査読あり)

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.09.005

③Okuda T, Kokubu E, Kawana T, Saito A, Okuda K, Ishihara K. Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella* species. Anaerobe 18:110-116, 2012 (査読あり)

DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.09.003.

④Okuda T, Okuda K, Kokubu E, Kawana T,

Saito A, Ishihara K. Synergistic effect on biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Campylobacter jejuni*. Anaerobe 18: 157-161, 2012 (査読あり)

DOI:10.1016/j.anaerobe.2012.01.001.

⑤Saito A, Kokubu E, Inagaki S, Imamura K, Kita D, Lamont RJ, Ishihara K. *Porphyromonas gingivalis* entry into gingival epithelial cells modulated by *Fusobacterium nucleatum* is dependent on lipid rafts. Microb Pathog 53:234-242, 2012 (査読あり)

DOI: 10.1016/j.micpath.2012.08.005

[学会発表] (計 5 件)

①齋藤 淳, 稲垣 覚, 国分栄仁, 君塚隆太, 石原和幸. Polymicrobial 感染における歯周病原性菌 *Porphyromonas gingivalis* の宿主細胞への侵入について. 第 93 回日本細菌学会関東支部総会, 東京, 平成 22 年 10 月 21 日

第 93 回日本細菌学会関東支部総会プログラム・抄録集 p.32, 2010.

② Saito A, Inagaki S, Ishihara K. Differential ability of periodontopathogens to modulate invasion of gingival epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. 96<sup>th</sup> Annual Meeting, American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology. Honolulu, USA, 平成 22 年 11 月 1 日.

③Okuda T, Kokubu E, Saito A, Okuda K. Periodontopathic biofilm formation of *Fusobacterium nucleatum* with *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 平成 23 年 9 月 6 日.

④Saito A, Kokubu E, Inagaki S, Imamura K, Kita D, Ishihara K. *Porphyromonas gingivalis* entry into gingival epithelial cells modulated by *Fusobacterium nucleatum* is dependent on lipid rafts. The 98th Annual Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, Los Angeles, CA, USA, 平成 24 年 9 月 30 日.

⑤齋藤 淳, 加藤哲男, 菊池有一郎, 国分栄仁, 今村健太郎. 細菌における免疫回避機構の解明. 平成 24 年度東京歯科大学口腔科学研究センターワークショップ, 平成 25 年 3 月 1 日, 千葉市美浜区. 平成 24 年度東京歯科大学口腔科学研究センターワークショップ プログラムおよび抄録集, p.41, 2013

[図書] (計 2 件)

①Saito A, Inagaki K, Kokubu E, Kimizuka R, Ishihara K. Periodontal Disease: Symptoms, Treatment and Prevention. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2011 (pp. 257-271, ISBN: 978-1-61761-739-3)

② Ishihara K, Saito A, Inagaki K. Capnocytophaga. In Molecular detection of human bacterial pathogens (Liu D eds), CRC Press, Boca Raton, 2011 (pp. 501-509, ISBN: 9781439812389)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 淳 (SAITO ATSUSHI)  
東京歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：60266559

### (2) 研究分担者

石原和幸 (ISHIHARA KAZUYUKI)  
東京歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：00212910  
稲垣 覚 (INAGAKI SATORU)  
東京歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：20385165 (平成 23 年度  
まで)  
国分栄仁 (KOKUBU EITOYO)  
東京歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：70453785

### (3) 連携研究者

なし