

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23593100

研究課題名(和文) 歯周病原性細菌の細胞内侵入に及ぼす口腔内連鎖球菌の影響

研究課題名(英文) Effect of oral streptococci on the invasion ability of periodontopathic bacterium.

研究代表者

竹下 玲 (Takeshita, Akira)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：70236454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト口腔上皮細胞様細胞に、*P. gingivalis* の細胞付着・細胞内侵入による生物活性に関する *S. oralis* の影響を検討することを考えた。まず、*P. gingivalis* の生物活性を検討した結果、IL-6 の発現を誘導した。この IL-6 発現は、本菌付着因子 41kDa 線毛の抗血清で抑制された。しかし、本菌線毛は、IL-6 を誘導しなかった。また、この IL-6 発現は、Nocodazole 等の細胞内侵入阻害剤で抑制された。従って、この IL-6 発現は、*P. gingivalis* の細胞内侵入が密接に関与すると考えられた。今後、この IL-6 の発現への *S. oralis* の影響を検討する。

研究成果の概要(英文)：It has been demonstrated that *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) is a predominant periodontopathic bacterium, and the host cell invasion by *P. gingivalis* has been suggested as a possible mechanism of pathogenesis in periodontal. In this study, we have proposed the effect of oral streptococci on the bacterial invasion into the oral epithelial cell like cells. Then, *P. gingivalis* is able to induce the expression of IL-6 gene in the cell. Although anti-41k fimbrial antiserum inhibited the IL-6 gene expression, the bacterial fimbriae is not able to stimulate the cytokine expression. We observed that the induction of IL-6 is blocked by the invasion inhibitor such as Nocodazole, etc. Therefore, *P. gingivalis* invasion is able to induce IL-6 gene expression in the cells. Hereafter we examine the effect of oral streptococci on IL-6 expression induced via the periodontopathic bacterium.

研究分野：口腔衛生学・口腔保健学

キーワード：歯周病原性細菌 口腔上皮細胞 IL-6

1. 研究開始当初の背景

わが国では、高齢者の増加とともに歯周炎患者が増加している。ゆえに、本疾患の予防のために様々な方法論が確立されつつある。しかしながら、本疾患の発症機構においては、まだ、不明な点も多く、その点が解明されれば、さらに、効果的な予防法や治療法が開発できるものと考えられる。

従来より、幾つかの病原性細菌[赤痢菌や腸管出血性大腸菌(O157H7)など]は、上皮細胞内侵入能を有し、細胞内侵入によって、感染初期段階の宿主の防御(免疫)反応を逃れた後、強力な外毒素により、急激な症状を誘導すると考えられている。一方、最近、細胞内への侵入能力を有しているが、非強毒素産生菌であるブドウ球菌、インフルエンザ菌、緑膿菌、並びにライム病ボレリアなどによる感染症の病態は、慢性かつ難治性であることから、細菌の細胞内侵入は感染の成立のみならず、慢性化病態の成立・進行にも密接に関連する可能性が示されている。成人性歯周疾患は、様々な細菌がお互いに凝集した「塊」であるプラーク中に存在する *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が、上皮細胞内に付着・侵入し、感染を成立することによって、発症することが示されている。特に、細胞内侵入は、本疾患の慢性化に密接に関連する可能性が示されている。本菌の細胞への付着には、本菌の有する線毛が、非常に重要であり、付着因子として、本菌の感染の初期ステップに密接に関係することが報告されている。また、本菌線毛は、サイトカイン誘導能等の生物活性を有することも報告されている。このように、*P. gingivalis* 単独の病原性因子・病原性機構についての知見は、解明されつつあるが、本菌が他の菌と結合した状態で、よりプラークに近い状態での病原性については不明な点が多い。特に、プラーク中に多量に存在する口腔内のグラム陽性連鎖球菌との凝集した状態での *P. gingivalis* の病原性については、ほとんど検討されていない。

従来より、口腔内のグラム陽性の連鎖球菌である *Streptococcus gordonii*、*Streptococcus oralis*、並びに *Streptococcus sanguis* は、粘膜上皮細胞に付着能を有することが報告されており、その付着にリポタイコ酸が関与する可能性が示されている。最近の研究は、このリポタイコ酸の細胞レセプターが同定されている。さらに、興味あることに、*P. gingivalis* が、これらの連鎖球菌と結合することが報告されている。元々、これらの連鎖球菌は、口腔内に多く存在し、プラークの形成の初期段階に機能的な役割を担っていることから、*P. gingivalis* の口腔内定着に密接に関係すると考えられている。さらに、*P. gingivalis* は、*Streptococcus oralis* (*S. oralis*) と、線毛を介して結合することが明らかにされている。従って、*Streptococcus oralis* を

初めとする口腔内のグラム陽性の連鎖球菌は、*P. gingivalis* の歯面への初期付着をサポートするだけでなく、口腔粘膜上皮細胞への付着とその細胞内侵入に密接に関係する可能性が考えられる。しかしながら、実際に、*S. oralis* を初めとする口腔内のグラム陽性の連鎖球菌が、*P. gingivalis* の口腔粘膜上皮細胞への付着とその細胞内侵入に影響を与える可能性についての研究はほとんどない。そこで、この「秘境」に科学のメスを入れ、歯周炎の発症機構について検討することは意義あることと考え、実験を行うことを企画した。

2. 研究の目的

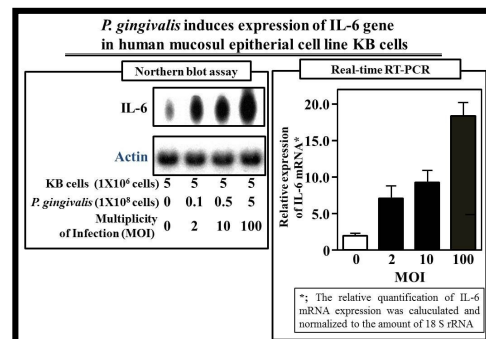
口腔内のグラム陽性の連鎖球菌が、*P. gingivalis* の口腔粘膜上皮細胞への付着とその細胞内侵入に影響を与える可能性についての研究が目的である。口腔連鎖球菌の影響を検討するアッセイ系として、*P. gingivalis* による IL-6 の遺伝子発現に関する研究を行うことも目的である。

3. 研究の方法

- (1) *P. gingivalis* : 33277 株を使用した。
- (2) 細胞 : 口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞を使用した。
- (3) Northern blot assay ; IL-6 cDNA のハイブリダイゼーションを行い検討した。
- (4) Real time PCR ; TaqMan プロブを用い、IL-6 遺伝子発現を定量した。
- (5) 抗 41kDa 線毛抗体 : 41kDa 線毛を認識するポリクロナール抗体を作製し使用した。
- (6) *P. gingivalis* LPS : フェノール法により抽出した。
- (7) 細胞内侵入阻害剤 : Monodansylcadaverine、Ouabain、Colchicines、Cytochalasin D と Nocodazole を使用した。
- (8) IL-6 の定量 ; ELISA 法で検討した。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* は、ヒト口腔上皮細胞様細胞の IL-6 遺伝子発現を強く誘導し、その誘導作用は、作用させた菌量に依存的であった。



(2) *P. gingivalis* の細胞への付着と侵入を、抗 41kDa 線毛抗体処理で抑制すると、本菌誘導性 IL-6 遺伝子発現は、著明に抑制された。

安井利一：ニコチンが修飾する歯肉上皮細胞からの炎症性サイトカインの誘導，第 61 回日本口腔衛生学会・総会，横須賀市，2012.5
遠藤浩正，深井穂博，三木昭代，島田 篤，申 基詰，深井智子，竹下 玲，安井利一：埼玉県医科歯科連携推進会議を立ち上げて～2年間の取り組み～，第 53 回日本歯科医療管理学会総会・学術大会，那覇市，2012 年 7 月
竹下 玲，廣瀬公治，高野安紀子，岡本和彦，松本 勝，深井智子，柴田えり子，上田知恵，仲筋宣子，下島孝裕，大川周治，安井利一：Porphyromonas gingivalis 線毛による単球様 M1 細胞のアポトーシスの阻害作用に関する tyrosine kinase の役割，第 62 回日本口腔衛生学会・総会，松本市，2013 年 5 月
廣瀬公治，沼田 匠，大橋明石，竹下 玲，安井利一：ニコチンによるマクロファージの TLR-2 の発現誘導について，第 62 回日本口腔衛生学会・総会，松本市，2013 年 5 月
宮澤 慶，松本 勝，竹下 玲，深井 智子，高橋明子，北 邦宏，仲筋宣子，杉山義祥，安井 利一：部分的咬合干渉と身体動揺について，第 24 回日本スポーツ歯科医学会，渋谷区，2013 年 6 月
竹下 玲，廣瀬公治，岡本和彦，高野安紀子，末續真弓，松本 勝，清水良昭，柴田えり子，下島孝裕，大川周治，安井利一：骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞における TNF- α による単球走化性因子 MCP-1 の発現誘導作用について，第 63 回日本口腔衛生学会・総会，熊本市，2014 年 5 月
廣瀬公治，大橋明石，竹下 玲，安井利一；Porphyromonas gingivalis による肺上皮細胞からの LL-37 の発現について，第 63 回日本口腔衛生学会・総会，熊本市，2014 年 5 月
岡本和彦，竹下 玲，曾根峰世，栗原美詠，下川原 忍，藤澤政紀，安井利一，大川周治；骨芽細胞における TNF- α による単球走化性因子 MCP-1 の発現誘導作用について，平成 26 年度（社）日本補綴歯科学会第 123 回学術大会，仙台市，2014 年 5 月
〔図書〕（計 1 件）
竹下 玲，学健書院，スタンダード衛生・公衆衛生（第 14 版），2014，43-75，
〔産業財産権〕
出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 玲 (TAKESHITA, Akira)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：70236454

(2) 研究分担者

岡本和彦 (OKAMOTO, Kazuhiko)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：50 271234

高野安紀子 (TAKANO, Akiko)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号：20337504

安井利一 (YASUI, Toshikazu)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号：20146252

(3) 連携研究者

()

研究者番号：