

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592778

研究課題名(和文) Polymicrobial infectionによる病原性変化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of virulence of microorganisms in polymicrobial infection

## 研究代表者

石原 和幸 (Ishihara, Kazuyuki)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00212910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎は、polymicrobial infectionである。本疾患の病因解明のため、特定の歯周病原性菌の組み合わせによるその病原性の変化を解析した。F. nucleatumは、P. micraのバイオフィルム形成を促進していた。また、P. gingivalisとF. nucleatumの組み合わせでは、P. gingivalisによるF. nucleatumのバイオフィルム形成促進、F. nucleatumによるP. gingivalisの上皮・血管内皮細胞への侵入性の増加が認められた。これらの結果は、複数の特定歯周病原性菌増加が相互作用を介し歯周炎の病態に関わっていることを示唆している。

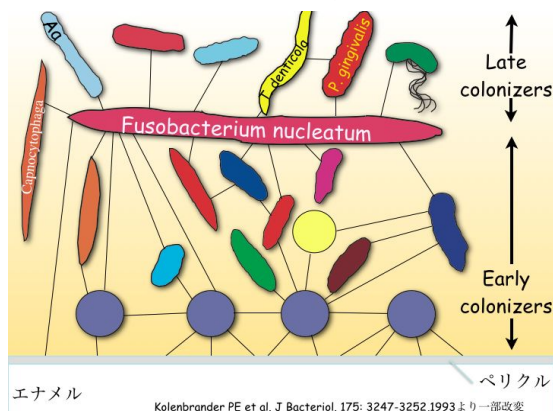
研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a typical polymicrobial infection. To clarify contribution of the bacterial interaction for development of periodontitis, we investigated the effect of co-culture of periodontopathic bacteria on virulence of each microorganisms. In the tested microorganisms, F. nucleatum enhanced biofilm formation by P. micra, which is predominant microorganism in apical periodontitis. In the combination of P. gingivalis and F. nucleatum, which are highly prevalent in chronic periodontitis, P. gingivalis enhanced biofilm formation by F. nucleatum, and F. nucleatum enhanced invasion of epithelial cells by P. gingivalis. These results suggest that enhancement of virulence by combination of the specific periodontopathic bacteria involves development of periodontitis.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：Polymicrobial infection バイオフィルム 歯周炎 共凝集 オートインデューサー クオラムセンシング デンタルプラーク Porphyromonas gingivalis

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、細菌因子、宿主因子、環境因子の組み合わせによって起こる感染症である。歯周炎は壮年期以降の30%が罹患する国民病とも言える疾患であり最終的には歯の喪失による咀嚼機能の障害、それによる食生活の変化と審美的な変化によりQOLの低下をも引き起こす。歯科疾患実態調査による結果は齲蝕の減少に比してその増加傾向を示している。さらに近年の解析によって、歯周炎は、心血管系疾患、糖尿病等の生活習慣病の一部や高齢者の誤嚥性肺炎に関連している事も示されてきている(Adachi, et al., 2002, Kinane D & Bouchard P, 2008)。そのため本疾患の阻止は国民の壮年期以降の健康の維持のために急務である。本研究では慢性歯周炎の主要な病因である歯周病菌間の相互作用からその病因を解明することを目的としている。歯周炎は、単独ではなく複数の歯周病菌によって引き起こされる感染症(polymicrobial infection)である。その病因となるデンタルプラークバイオフィームは、下図に示すように、レンサ球菌を中心としたearly colonizerの定着に引き続き、*Fusobacterium nucleatum*以降の嫌気性菌を主とするlate colonizerが細菌同士の付着である共凝集により付着し、定着が起こる(Kolenbrander PE & London J, 1993)。その結果、時間と共にその成熟が進み、ブラッシングが



行われなければ通性嫌気性菌主体であったバイオフィーム中の偏性嫌気性菌が増加していく。慢性歯周炎の原因となる細菌は、late colonizerに含まれるグラム陰性偏性嫌気性菌群である。特にそのうち *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* の3菌種は、共に慢性歯周炎病巣から高頻度で分離されることからred complexと呼ばれ慢性歯周炎の発症に緊密な関わりを持つことが知られている(Socransky SS, et al., 1998)。このように特定の菌群が共に検出されることは、特定の細菌間での共生作用が存在することを示唆している。さらにこれらの菌の定着には、*F. nucleatum*との共凝集が重要な役割を果たす。近年、バイオフィームの解析の進歩と共に、バイオフィーム中の細菌が、その細菌密度の上昇と共に autoinducer によるコミュニケーション(クオラムセンシ

ング)を行い、それによって病原性が変化していることが明らかにされている(Costerton JW, et al., 1999)、口腔細菌においても主にグラム陽性菌で報告がなされている(Kuramitsu HK, et al., 2007)。異なった病態の歯周炎ではその菌叢が異なることから、それぞれの病態では、特有の歯周病菌の共同体(コンソーシア)が病巣に存在すると考えられる。従来の慢性歯周炎の発症メカニズムの解明は、単独の菌について解析が行われてきた。しかしこれに加え、デンタルプラークバイオフィームの細菌叢の変動と変動による複数菌種相互作用によって引き起こされる病原性の変化についての解析を行い、より in vivo に近い状態での病原性解析を行うことが必要とされている。我々の研究グループは、歯周病菌を中心とした細菌の病原因子の解析およびその相互作用の解析を行ってきた。それによって、健常者のデンタルプラークに認められる *C. ochracea* に *F. nucleatum* が、共凝集によって付着し、*F. nucleatum* のバイオフィーム形成を *C. ochracea* の可溶性因子が促進することを認めている(Okuda T, et al., 投稿中)。 *P. intermedia* は、*F. nucleatum* と共凝集を引き起こすと共に *F. nucleatum* のバイオフィーム形成を促進する(Okuda T, et al., 2011)。このバイオフィーム形成促進は、*P. intermedia* 培養上清を用いても再現されなかったことから菌体の直接接触が必要であると考えられた。共凝集を引き起こす *F. nucleatum* と *P. gingivalis* でも *P. gingivalis* が *F. nucleatum* のバイオフィーム形成を促進していた(Saito A, et al., 2008)。この作用は可溶性画分によって引き起こされていた。さらにこの2菌種の組み合わせによる混合感染は、*P. gingivalis* の上皮細胞への侵入を促進した。Red complex の *T. denticola* と *P. gingivalis* の間では、その共凝集には *P. gingivalis* の Arg-gingipain の Hgp44 が関わっていた(Ito R, et al., 2010)。これらの解析結果は、early colonizer と *Fusobacterium* さらにそれに引き続き定着する歯周病細菌間での付着とそれに伴う細菌間コミュニケーションがバイオフィーム内への定着と病原性発揮に重要な役割を果たしていることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで得られた結果に基づき、*F. nucleatum* を中心に細菌間コミュニケーションに関わる物質とそれによって引き起こされる病原性の変化を明らかにすることを目的とする。具体的には1. *F. nucleatum* 表層の共凝集因子の同定、2. *F. nucleatum* 遺伝子発現の解析により、細菌間コミュニケーションによって引き起こされるバイオフィーム形成促進に関わる分子を解明する、3. この変化を引き起こす細菌間の伝達物質の解明を行う。バイオフィーム形成の促進が認められている *P. gingivalis* と *C. ochracea* の2種の培養上清を用い、*F. nucleatum* へ作用を比較

しつつ、その作用の違いを解析することにより、バイオフィーム形成を促進している遺伝子群を解明する。さらに、同調して増加する遺伝子群の解析によりこれらを調節している転写調節因子を明らかにし、*F. nucleatum* のバイオフィーム調節機構を明らかにする。これらの解析により、歯周病菌によるコンソシア形成のメカニズムとそれに伴う病原性の変化への流れを明らかにし、歯周病発症に関わる細菌の病原性を解明する。さらにそれを応用し、歯周病菌バイオフィーム形成阻害による予防へと展開を試みる。

### 3. 研究の方法

共凝集活性測定および菌種間相互作用の解析

供試菌株として、*T. forsythia* ATCC 43031, *T. denticola* ATCC 35405, 33520, 33521, K1, *P. gingivalis* ATCC 33277, *F. nucleatum* ATCC 25586, *C. ochracea* ATCC 33596, ATCC 27872, *P. micra* JCM 12970 を用いた。共凝集活性は Cisar らの視覚による方法と、混合後の菌液の OD<sub>660</sub> の吸光度により測定した。混合培養時のプランクトニックセルの増殖は OD<sub>660</sub> により測定し、バイオフィーム形性はクリスタルバイオレットによる染色後、遊離させた色素量を OD<sub>595</sub> 測定することにより評価した。さらに Two compartment system を用い、0.2 μm の膜を介して共培養し、細菌から遊離する可溶性画分がプランクトニックセルの増殖と、バイオフィームの形成に与える影響について検討した。

表層プロテアーゼ(dentilisin)および major outer sheath protein の共凝集への関与の解析のため、*T. denticola* ATCC 33520 から dentilisin 欠損株 KpSano 7、*T. denticola* ATCC 35405 から major outer sheath protein 欠損株 DMSP3 を作成した。

AI-2 がバイオフィーム形成に果たす役割  
*C. ochracea* の AI-2 産生に関わる *luxS* 欠損株を相同組換えにより作成し、そのバイオフィーム形成をクリスタルバイオレットによる染色、電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡によって比較した。AI-2 欠損株については、Two compartment system を用い、0.2 μm のフィルターを介して野生株と欠損株を共培養し、外因性の AI-2 による欠損株のバイオフィーム形成の回復が認められるかどうかを解析した。

### 4. 研究成果

共凝集

歯周炎局所では Red complex と呼ばれる *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. gingivalis* の 3 菌種が共に高頻度で検出され歯周炎の発症と進行に重要な役割を果たしている。これら菌群のバイオフィーム形成に共凝集が関わるため *T. denticola* と *T. forsythia* の間の共凝集のメカニズムの解析を行った。

*T. denticola* ATCC 35405 と *T. forsythia* 間の

共凝集は *T. denticola* の熱処理によって失われることから *T. denticola* のリガンドがタンパク質であることが示唆された。*T. denticola* の野生株 3 株の共凝集レベルを比較すると、その程度は dentilisin 活性に比例し、dentilisin 欠損株 K1, KpSan7 は、*T. forsythia* と共凝集を起こさなかった。しかしプロテアーゼインヒビターによって共凝集活性に変化は認められなかった。これらの結果から、dentilisin は共凝集に関与するものの、共凝集のリガンドではなく、表層タンパクの成熟を通して共凝集に関与していると考えられた。

細菌間相互作用

歯周病原性菌種間における相乗効果・拮抗等の相互作用は、菌種組成に影響を与え、歯周病原性バイオフィーム形成に重要な役割を果たしている。本研究では、バイオフィーム形成における特定細菌間の相互作用とそれに関わる分子の解析を目的とし、複数の菌種間での相互作用について検討を加えた。

*P. micra* は、根尖性歯周炎病巣から高頻度で分離される。本菌が根尖部で増加するプロセスで他菌種とのあいだでどのような相互作用があるかを明らかにするため本菌と *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *C. ochracea* との共凝集およびこれら菌種との混合培養の影響について解析した。

*P. micra* は、*F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *C. ochracea*, と共凝集した。*P. micra* とこれらの菌種との混合培養を行うと、*P. gingivalis* との混合培養ではプランクトニックセルの増殖の促進が認められた。これとは対照的に *F. nucleatum* との混合培養ではバイオフィーム形成が著明に上昇していた。Two compartment system では、3 菌種とも *P. micra* のプランクトニックセル増殖を促進していたが、バイオフィーム形成を促進していたのは、*F. nucleatum*, *C. ochracea* のみであった。これらから、*F. nucleatum* と *C. ochracea* より遊離される可溶性物質が *P. micra* のバイオフィーム形成を促進することが明らかになった。これらにより *P. micra* が根尖部に定着し、バイオフィームを形成するプロセスにおける他菌種の関与が示唆された。

バイオフィームを形成した細菌間では autoinducer (AI) によるコミュニケーションが認められるようになる。AI-2 は、AI のうち菌種を超えて作用を及ぼすことからデンタルプラークのような複数菌種により形成されるバイオフィーム内での細菌間コミュニケーションに重要な役割を果たすと考えられている。これを明らかにする目的で *C. ochracea* のバイオフィーム形成に AI-2 が果たす役割について解析を加えた。

*C. ochracea* の *luxS* 欠損株のバイオフィーム形成は有意に低下していた。共焦点レーザー顕微鏡による解析では、欠損株のバイオフィームは、高さが不整であり野生株よりも厚みのある部分と薄い分が存在していた。このバイオフィーム形成の変化は、野生株由来の

AI-2 によっては補完されなかった。そのため本菌のバイオフィルム形成に *luxS* は関与するものの、その作用は、菌体外に遊離される AI-2 によるものではなく *luxS* 欠損による activated methyl cycle の障害によるものと考えられた。これらの結果から、本菌の産生する AI-2 は、本菌には影響を与えず他の菌種に影響を与える可能性が考えられた。

共培養による遺伝子発現、病原性の変化

共培養によりバイオフィルム形成性の認められた *F. nucleatum* と *P. gingivalis* の組み合わせでは、共培養による菌のタンパクプロファイルの変化、病原性の変化について検討した。*P. gingivalis* と共培養した *F. nucleatum* では、およそ 35 kDa のサイズのタンパクの増加が認められた。このタンパクを質量分析により解析を行うと、*F. nucleatum* のポーリンタンパクである FomA であった。Immunoblot による解析で、共培養により FomA の増加が認められた。

さらに、*P. gingivalis* の病原性に関わる因子として、この 2 菌種の共培養による *P. gingivalis* の血管内皮、歯肉上皮への侵入性について解析を行うと、その上昇が認められた。これらの結果から、歯周病原性菌の特定の菌種の組み合わせが、バイオフィルム形成の促進や、病原性の増加によって慢性歯周炎、根尖性歯周炎の病態に関わることを示唆することができた。

## 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 13 件)

1. Onozawa S., Kikuchi Y., Shibayama K., Kokubu E., Nakayama M., Inoue T., Nakano K., Shibata Y., Ohara N., Nakayama K., Ishihara K., Kawakami T. and Hasegawa H. Role of extracytoplasmic function sigma factors in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis*. BMC Oral Health. 2015; 15: 4. DOI: 10.1186/1472-6831-15-4.
2. Izumi S., Ryu M., Ueda T., Ishihara K. and Sakurai K. Evaluation of application possibility of water containing organic acids for chemical denture cleaning for older adults. Geriatr Gerontol Int. 2015; DOI: 10.1111/ggi.12467.
3. Imamura K., Kokubu E., Kita D., Ota K., Ishihara K. and Saito A. Cigarette smoke condensate modulates migration of human gingival epithelial cells and their interactions with *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res. 2015; 50: 411-21. DOI: 10.1111/jre.12222.
4. Sano Y., Okamoto-Shibayama K., Tanaka K., Ito R., Shintani S., Yakushiji M. and Ishihara K. Dentilisin involvement in coaggregation between *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*. Anaerobe. 2014; 30: 45-50. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.08.008.
5. Okamoto-Shibayama K., Kikuchi Y., Kokubu E., Sato Y. and Ishihara K. Csa2, a member of the Rbt5 protein family, is involved in the utilization of iron from human hemoglobin during *Candida albicans* hyphal growth. FEMS Yeast Res. 2014; 14: 674-7. DOI: 10.1111/1567-1364.12160.
6. Hirota K., Inagaki S., Hamada R., Ishihara K. and Miyake Y. Evaluation of a rapid oral bacteria quantification system using dielectrophoresis and the impedance measurement. Biocontrol Sci. 2014; 19: 45-9.
7. Hagiwara M., Kokubu E., Sugiura S., Komatsu T., Tada H., Isoda R., Tanigawa N., Kato Y., Ishida N., Kobayashi K., Nakashima M., Ishihara K. and Matsushita K. Vinculin and Rab5 Complex Is Required for Uptake of *Staphylococcus aureus* and Interleukin-6 Expression. PLoS One. 2014; 9: e87373. DOI: 10.1371/journal.pone.0087373.
10. Ao M., Miyauchi M., Inubushi T., Kitagawa M., Furusho H., Ando T., Ayuningtyas N. F., Nagasaki A., Ishihara K., Tahara H., Kozai K. and Takata T. Infection with *Porphyromonas gingivalis* exacerbates endothelial injury in obese mice. PLoS One. 2014; 9: e110519. DOI: 10.1371/journal.pone.0110519.
11. Yamamoto I., Ishihara K., Muramatsu K., Wada Y., Kiwaki M., Kushiro A. and Okuda K. Expression of *Porphyromonas gingivalis* gingipain antigen Hgp44 domain on surface of *Lactococcus lactis*. Bull Tokyo Dent Coll. 2013;

54: 233-41.

12. Koga T., Matsukubo T., Okuda K. and Ishihara K. Effect of clinical factors on bacterial contamination of bone chips collected during implant surgery. *Implant Dent.* 2013; 22: 525-529. DOI: 10.1097/ID.0b013e3182a2b8e3.
13. Saito A., Kokubu E., Inagaki S., Imamura K., Kita D., Lamont R. J. and Ishihara K. *Porphyromonas gingivalis* entry into gingival epithelial cells modulated by *Fusobacterium nucleatum* is dependent on lipid rafts. *Microb Pathog.* 2012; 53: 234-42. DOI: 10.1016/j.micpath.2012.08.005.

[学会発表](計 件)

1. Ishihara K., Inagaki S., Kokubu E.: Invasion of human gingival epithelial cells by *Treponema denticola*, First International Conference of *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species, August 27-28, Nagasaki, 2012. First International Conference of *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species abstract.
2. 柴山和子, 菊池有一郎, 国分栄仁, 石原和幸: *Candida albicans* gene encoding cell surface protein involved in its virulence, 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18日-20日 2013a. *日本細菌学雑誌*, 68:225.
3. 今村健太郎, 国分栄仁, 喜田大智, 太田功貴, 白石友子, 石原和幸, 齋藤淳: タバコ煙が *Porphyromonas gingivalis* と歯肉上皮細胞との相互作用に及ぼす影響, 第56回日本歯周病学会春季大会, 5月30日-6月1日, 東京 2013a. *日本歯周病学会会誌*, 55:94.
4. 菊池有一郎, 柴山和子, 国分栄仁, 大原直也, 中山浩次, 石原和幸: Involvement of ECF sigma factor PG1318 in regulation of mutation frequency in *P. gingivalis*, 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18日-20日 2013b. *日本細菌学雑誌*, 68:179.
5. 喜田大智, 菊池有一郎, 国分栄仁, 柴山和子, 齋藤淳, 石原和幸: *Capnocytophaga ochracea* のバイオフィルム形成への Por 分泌機構の関与, 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会 岡山 9月20-22日 2013. *J Oral Biosci*, 55:229.
6. Tanaka K, Kikuchi Y., Shintani S, Kuramitsu HK, Ishihara K.: Characterization of an ABC-type bacteriocin exporterlike protein in *Treponema denticola*, 50th Anniversary Symposium of the University at Buffalo Oral Biology Graduate Program, June 12-14 in Buffalo, New York 2013. *Adv Dent Res*, 26:58.
8. Saito K, Okamoto-Sibayama K, Katakura A, Ishihara K.: Auto-inducer-2 regulates *Capnocytophaga ochracea* biofilm formation 91st General Session & Exhibition of the IADR, March 20-23, Seattle, USA 2013. *J Dent Res*, 92:3822.
7. Miyai Y, Sato T, Ishihara K.: Characterization of dentipain, a *Treponema denticola* protease 91st General Session & Exhibition of the IADR, March 20-23, Seattle, USA 2013. *J Dent Res*, 92:1418.
8. Horiuchi A, Nukaga T, Asai T, Ishihara K.: Synergistic effect between *Parvimonas micra* and other periodontopathic bacteria, 91st General Session & Exhibition of the IADR, March 20-23, Seattle, USA 2013. *J Dent Res*, 92:1365.
9. 太田功貴, 菊池有一郎, 今村健太郎, 吉川幸輝, 喜田大智, 白石友子, 藤瀬和隆, 国分栄仁, 齋藤淳, 石原和幸: *Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子が歯肉上皮細胞への侵入に及ぼす影響, 平成26年10月19日, 神戸市 2014. *日本歯周病学会会誌*, 56:110.
10. 国分栄仁, 菊池有一郎, 柴山和子, 石原和幸: *Treponema denticola* の細胞侵入に対する Malassez 上皮遺残細胞の動態, 2014年9月25日(木) - 9月27日(土), 岡山 2014.

Journal of Oral Biosciences Supplement,  
2014:216.

11. 菊池有一郎, 柴山和子, 国分栄仁, 大原直也, 中山浩次, 石原和幸: バイオフィルム形成における *Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子の役割, 2014年9月25日 - 9月27日, 岡山 2014. Journal of Oral Biosciences Supplement, 2014:213.

12. 喜田大智, 菊池有一郎, 国分栄仁, 柴山和子, 齋藤淳, 中山浩次, 石原和幸: *Capnocytophaga ochracea* の滑走運動とバイオフィルム形成への IX 型分泌機構の関与, 2014年9月25日(木) - 9月27日(土), 岡山 2014. Journal of Oral Biosciences Supplement, 2014:164.

13. Tanaka K, Kikuchi Y, Shintani S, Kuramitsu HK, Ishihara K: Characterization of bacteriocin associated protein in *Treponema denticola*, Gordon Conference, Spirochetes, Biology of January 19-24, Ventura, USA, . 2014.

14. Kita D, Imamura K, Ohta K, Fujise K, Hayashi T, Takahashi J, Saito A, Ishihara K: Involvement of the Por secretion system in biofilm formation of *Capnocytophaga ochracea*, 平成 26 年 5 月 22-24, 岐阜 2014. 日歯周誌, 56:23.

〔図書〕(計 件)

石原和幸著 分担 ザ・ペリオドントロジー 第2版, 和泉雄一, 沼部幸博, 山本松男, 木下淳博 監修, 永末書店, 東京, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原 和幸 (Ishihara, Kazuyuki)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 00212910

(2)研究分担者

稲垣 覚 (Inagaki, Satoru)

研究者番号: 2038165

国分 栄仁 (Kokubu, Eitoyo)

研究者番号: 70453785

菊池 有一郎 (Kikuchi, Yuichiro)

研究者番号 30410418

(3)連携研究者

なし