

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592833

研究課題名(和文) 自己免疫疾患発症に関わる口腔レンサ球菌の病原因子の解明

研究課題名(英文) Molecular characterization of the pathogenic factors of oral streptococci involved in autoimmune disease

研究代表者

弘田 克彦 (HIROTA, Katsuhiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60199130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回得られた実験データは、臨床報告されている多くの症例で見られているデータと合致するものである。IP-10は、形質細胞様樹状細胞の遊走因子であり、pDC, 単球/マクロファージ, リンパ球の集積異常が自己免疫反応の始まりとも考えられている。我々の結果とあわせて考察すると、原発性胆汁性肝硬変(PBC)にもIP-10, pDCが関与する可能性が非常に高く、ケモカインセット動態変化が、PBCおよび関連自己免疫疾患の免疫寛容破綻機構に関連する可能性を十分検討すべきと考える。

研究成果の概要(英文)：Using genome microarray to define the gene expression profile of rSi-HLP-stimulated THP-1 cells, 83 genes were up-regulated (two fold higher) among 28,869 genes profiled. Especially, genes coding for chemokines and pro-inflammatory cytokines, such as CCL2, 3, 4, CXCL8, 10 were the most highly up-regulated groups. Recombinant Streptococcus intermedius histone-like DNA binding protein is one of the set Inducer excessive CXCL10, CXCL 8, CCL2, CCL3, CCL4 from human THP-1 cells.

研究分野：細菌学

キーワード：PAMPs 自己免疫疾患 バイオフィルム IP-10 CCL2 CCL4 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

我々は、基盤研究C (平成10,11年度)研究課題名(肝疾患を惹起する口腔レンサ球菌の病原因子の解明)の研究結果より、BALB/cマウス等の歯周組織からの*S. intermedius* の菌液接種により、肝臓の小葉間胆管にPBC患者で見られる慢性非化膿性破壊性胆管炎様の像が惹起されることが明らかにした。基盤研究C (平成14,15年度)研究課題名(難治性疾患を惹起する口腔レンサ球菌のDNA結合タンパク質の解析)で、*S. intermedius*の*hlp* geneをクローニング後、r*Si*-HLPを大腸菌で発現誘導させることを確立し、大量に当教室で凍結分注保存した。基盤研究C (平成21,22,23年度)研究課題名(自己免疫性肝疾患に関わる口腔レンサ球菌の病原因子の解明)において、Bio-plex測定法を用いて、r*Si*-HLPがTHP-1細胞のサイトカイン発現バランスに及ぼす影響について実験した。その結果、まったく思いもよらないことであるが、インターフェロン誘導タンパク質 - 10 (IP-10、CXCL10) のmRNA発現およびタンパク質産生量が共に異常なほど上昇することを見出した。IP-10は、形質細胞様樹状細胞(Plasmactoid dendritic cell;pDC) の遊走因子であり、最新の知見では、pDC,単球/マクロファージ,リンパ球の集積異常が種類の自己免疫反応の始まりと考えはじめられている。現在までの我々の多くの免疫組織化学染色結果とあわせて考察すると、PBCにもIP-10,pDCが関与する可能性が非常に高く、これらを含めたケモカイン動態変化が、PBCおよび関連自己免疫疾患の免疫寛容破綻機構に関連する可能性が推測される。是非とも詳細に解析することでこれらの関連性を解明したい。

2. 研究の目的

各種条件の*Si*-HLP刺激による培養ヒト単球/マクロファージや胆管上皮細胞での遺伝子発現変化や、CXCL10, CXCL8, CCL2, CCL3, CCL4等のケモカイン産生変化を microarray

と multi-plex 測定法を用いて網羅的に解析するとともに、各種阻害剤を使用することで、誘導メカニズムの解明をはかりたい。これにより *Si*-HLP が、場合によっては、ヒトの免疫応答を過度に増強し、予期しない炎症を惹起しうる可能性を示したい。

3. 研究の方法

r*Si*-HLP (0,50 100,500 ng/ml, 1,5,10, 50 µg/ml)で THP-1 細胞および胆管細胞癌株HuCCT1をそれぞれ8,24時間刺激し、各濃度での細胞生存率を、WST-8と生細胞染色用蛍光色素Calcein-AMで検討する。次に、r*Si*-HLP (0,50 100,500 ng/ml, 1,5,10, 50 µg/ml)でTHP-1細胞および胆管細胞癌株HuCCT1をそれぞれ8,24時間刺激し、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現変化を解析する。マイクロアレイの mRNA レベルでの変動結果をもとに測定ケモカインを選択し、各微量サンプル中に含まれるケモカインを包括的かつ同時に定量できる multi-plex 測定法を用いて同時定量する。

4. 研究成果

50 µg/ml の r*Si*-HLP は、THP-1 細胞に対して、CXCL8、CXCL10、CCL2 や CCL4 を各 1000 pg/ml 以上産生させるケモカイン誘導因子であった。免疫電顕観察により、*Si*-HLP の RK クラスターを有する Arm region は、eV 外表面に突出していること、さらに *Si*-HLP が eV により菌体外へ分泌される可能性が示唆された。vesicle により菌体外や biofilm matrix 中に分泌された r*Si*-HLP は、単球を活性化して CXCL8、CXCL10、CCL2 や CCL4 等のケモカインを同時に多量産生させて感染局所に形質細胞様樹状細胞、CXCR3⁺T リンパ球、好中球や単球・マクロファージを浸潤させ炎症を激化させると推測される。

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 5件)

B Sapaar, A Nur, K Hirota, H Yumoto, K Murakami, T Amoh, T Matsuo, T Ichikawa, Y Miyake, Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. Journal of Applied Microbiology, 査読有, 116(6), 2014, 1531-1542
doi: 10.1111/jam.12483

村上圭史, Nur Asikin, 弘田克彦, 三宅洋一郎, 緑膿菌臨床分離株における抗菌薬抵抗性と病原因子との関連について, BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM, 査読有, 27, 2014, 43-44

Asikin Nur, Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Kanako Takahashi, Keiji Murakami, Takashi Matsuo, Yoichiro Miyake, Effect of extracellular DNA on pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa*, BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM, 査読有, 27, 2014, 45-47

Asikin Nur, Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Kanako Takahashi, Keiji Murakami, Takashi Matsuo, Yoichiro Miyake, Role of extracellular DNA and DNA-binding protein in biofilm formation of *Streptococcus intermedius*, BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM, 査読有, 26, 2013, 25-29

Asikin Nur, Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, D. Liu,

Kanako Takahashi, Keiji Murakami, Takashi Matsuo, R. Shu, Yoichiro Miyake, Effects of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of a *Streptococcus intermedius* biofilm, Journal of Applied Microbiology, 査読有, 115(1), 2013, 260-270
doi: 10.1111/jam.12202

〔学会発表〕(計 16件)

村上圭史, Nur Asikin, 弘田克彦, 三宅洋一郎, 緑膿菌臨床分離株における抗菌薬抵抗性と病原性との関連, 第 87 回日本細菌学会, 2014.3.27, タワーホール船堀, (東京都・江戸川区)

弘田克彦, 湯本浩通, 村上圭史, 平尾功治, 三宅洋一郎, 抗 Si-HLP 抗体のミトコンドリア ATP synthase subunit に対する交差反応性, 第 87 回日本細菌学会, 2014.3.27, タワーホール船堀, (東京都・江戸川区)

Nur Asikin, Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Keiji Murakami, Yoichiro Miyake, Extracellular DNA influences pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa*, 第 87 回日本細菌学会, 2014.3.27, タワーホール船堀, (東京都・江戸川区)

Nur Asikin, Hiromichi Yumoto, Keiji Murakami, Katsuhiko Hirota, Takashi Amoh, Yoichiro Miyake, Extracellular DNA affects *Streptococcus mutans* biofilm through quorum sensing system and histone-like DNA binding protein expression, The 12th Japan-Korea International Symposium on

Microbiology , 2014.3.25, tower hall
Hunabori, (Tokyo · Japan)

Nur Asikin, Katsuhiko Hirota,
Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Kanako
Takahashi, Keiji Murakami, Yoichiro
Miyake, Homologous and heterologous
extracellular DNAs affect *Pseudomonas
aeruginosa* to produce more pyocyanin
without inducing bacterial growth, 第
66 回日本細菌学会中国・四国支部総
会, 2013.10.12 , 広島国際大学, (広島
県・呉市)

Asikin Nur Katsuhiko Hirota ,Hiromichi
Yumoto ,Kouji Hirao ,Kanakano Takahashi ,
Keiji Murakami , Takashi Matsuo ,
Yoichiro Miyake, Effect of
extracellular DNA on pyocyanin
production from *Pseudomonas
aeruginosa* , 第 27 回 Bacterial
Adherence & Biofilm 学術集
会, 2013.7.12 , 東京ガーデンパレス, (東
京都・文京区)

村上圭史 , Asikin Nur , 弘田克彦 , 三宅
洋一郎 , 緑膿菌臨床分離株における抗菌
薬抵抗性と病原因子との関連について ,
第 27 回 Bacterial Adherence & Biofilm
学術集会 , 2013.7.12 , 東京ガーデンパ
レス, (東京都・文京区)

Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto,
Asikin Nur, Kouji Hirao, Yoichiro
Miyake, Pathogenic roles of
Streptococcus intermedius
histone-like protein in microbial
inflammation , 第 86 回日本細菌学会総
会 , 2013.3.18-20 , 幕張メッセ, (千葉
県・千葉市)

Asikin Nur, Katsuhiko Hirota,
Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao , Kanako
Takahashi , Keiji Murakami, Yoichiro
Miyake , The role of extracellular DNA
in *Pseudomonas aeruginosa* and
Streptococcus intermedius infection ,
第 86 回日本細菌学会総会 ,
2013.3.18-20 , 幕張メッセ, (千葉県・
千葉市)

Asikin Nur, Katsuhiko Hirota,
Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Kanako
Takahashi, Keiji Murakami, Takashi
Matsuo, Yoichiro Miyake , Biological
roles of extracellular DNA in
bacterial infection , ASEAN PLUS and
TOKUSHIMA JOINT INTERNATIONAL
CONFERENCE, 2012. 12.7-8, Royal
Ambarukmo Hotel, (Yogyakarta ·
Indonesia)

Asikin Nur, Katsuhiko Hirota,
Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Kanako
Takahashi, Keiji Murakami, Yoichiro
Miyake , Biological roles of
extracellular DNA of *Streptococcus
intermedius* , 第 65 回日本細菌学会中
国・四国支部総会 , 2012.10.20-21 , 徳
島大学長井記念ホール, (徳島県・徳島
市)

Asikin Nur , 弘田克彦 , 湯本浩通 , 平尾
功治 , 高橋加奈子 , 村上圭史 , 松尾敬志 ,
三宅洋一郎 , Role of extracellular
DNA and DNA-binding protein in biofilm
formation of *Streptococcus
intermedius*. 第 26 回 Bacterial
Adherence & Biofilm 学術集会 ,
2012.7.13 , 大阪ガーデンパレス, (大阪

府・大阪市)

K.Hirao, H. Yumoto, K. Hirota, D.Liu, N. Asikin, K.Takahashi, T. Matsuo, Y.Miyake, Global gene analysis in Monocytes stimulated with streptococcal histone-like protein. , IADR General Se, 2012.6.20-23 , Iguazu Falls, (Iguazu・Brazil)

Asikin Nur, Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Kanako Takahashi, Keiji Murakami, Takashi Matsuo, Yoichiro Miyake , Role of extracellular DNA and DNA-binding protein in cell aggregation, biofilm formation and antibiotic tolerance of *Streptococcus intermedius*, 第 21 回 Lancefield レンサ球菌研究会 & 第 4 4 回 レンサ球菌感染症研究会合同開催, 2012.6.8-9, 大阪大学吹田キャンパス弓倉記念ホール、(大阪府・吹田市)

Asikin Nur, Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Kanako Takahashi, Keiji Murakami, Yoichiro Miyake, The effect of extracellular DNA on the development of *Streptococcus intermedius* biofilm , 第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会 , 2011.10.22-23 , 岡山大学津島キャンパス、(岡山県・岡山市)

Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, Asikin Nur, Kouji Hirao, Kanako Takahashi, Dali Liu, Keiji Murakami, Takashi Matsuo, Yoichiro Miyake, Gene expression profiling of human monocytic THP-1 cells stimulated with extracellular *Streptococcus*

intermedius histone-like DNA binding protein , IUSM 2011(International Union of Microbiological Societies 2011 Congress) , 2011.9.6-16, Sapporo Convention Center, (Hokkaido・Japan)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.tokushima-u.ac.jp/saikin/staff_j.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弘田 克彦 (HIROTA, Katsuhiko)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：60199130

(2) 研究分担者

三宅 洋一郎 (MIYAKE, Yoichiro)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：80136093

村上 圭史 (MURAKAMI, Keiji)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：10335804

岡村 裕彦 (OKAMURA, Hirohiko)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：20380024