

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24593165

研究課題名(和文)細胞内に侵入した歯周病原性細菌の病原性機構とその侵入細菌の除去薬剤の検索

研究課題名(英文) Pathogenicity mechanisms of periodontopathogenic bacteria invaded into cells and retrieval of drugs for removal of invasive bacteria

研究代表者

安井 利一 (Yasui, Toshikazu)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：20146252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が、直接、細胞内に侵入する能力を有することが広く知られている。近年、幾つかの研究は、実際の歯周炎患者において、本菌が細胞内侵入していることを示している。しかし、*P. gingivalis* の細胞内侵入が、どのような病原性を有するのか完全に明らかにされていない。そこで、*P. gingivalis* の細胞内侵入が、如何なる生物活性を導き出すのかを検討する。また、細胞内侵入した *P. gingivalis* は、一般の抗生剤で除去することは困難であるので、細胞内侵入した本菌を除去できる薬剤についても検討を行う。

研究成果の概要(英文)：It is widely known that the periodontal pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) has the ability to directly invade to the mucosal epithelial cells. In recent years, several studies indicate that this bacterium invades in the lesion tissue of gingiva in periodontitis patients, indeed. However, it is not completely clarified the pathogenic mechanism of *P. gingivalis* intracellular invasion. We will investigate any kind of biological activity the invasion of *P. gingivalis* is able to induce. Moreover, since it is difficult to remove *P. gingivalis* invaded in the cells in detail by using the general antibiotics, we will also consider any drugs that can remove the intracellularly invaded bacterium or that prevent the intracellular invasion of the pathogen.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：歯周病原性細菌 炎症性サイトカイン 歯周疾患 細胞内侵入 サイトカイン発現 抗生物質 歯周疾患予防

1. 研究開始当初の背景

わが国の高齢化が進行するとともに、歯周炎患者が増加している。ゆえに、その対策として、本疾患の予防のために様々な方法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ている。

幾つかの病原性細菌が、上皮細胞内侵入能を有する。これらの菌は、細胞内侵入によって、感染初期段階の宿主の防御（免疫）反応を逃れると考えられている。一方、最近、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が、細胞内への侵入能力を有していることが示された。これらの感染症の病態は、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、病態の成立・進行にも密接に関連する可能性が示唆されている。又、これらの細胞内侵入した病原性細菌に対しての抗生物質（抗生剤）の効果は、著しく減弱し、本薬剤の通常濃度において抗菌効果を殆ど期待できなくなることが示されている。

成人性歯周疾患は、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)の感染により発症する難治性の慢性感染症である。最近の研究は、本菌が上皮細胞内に侵入することを報告している。従来より、リポ多糖などの本菌の構成成分の病原性は明らかにされているが、細胞内侵入による歯周組織の破壊機構は、完全には明らかになっておらず、この「秘境」に科学のメスを入れることは、歯周炎の効果的な予防法や治療法の確立のため、意義あることと思われる。

2. 研究の目的

粘膜面における病原性微生物の感染防御のために、粘膜上皮細胞のバリア（障壁）としての機構を有していることが示されている。又、最近、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は、細胞内への侵入によって、慢性かつ難治性の病態を形成するものと考えられている。従って、粘膜上皮細胞のバリア機能は、この細胞内侵入機能によって、破綻が始まる可能性が考えられている。さらに、細菌の細胞内侵入は感染の成立のみならず、慢性病態の成立・進行に密接に関連する可能性も示されている。一方、成人性歯周疾患は、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)の感染により発症する難治性の慢性感染症であり、骨吸収活性を有した炎症性生理活性物質（IL-1、TNF- α 、IL-6、並びに、プロスタグランジン）が、密接に関与している。最近の研究は、本菌が上皮細胞内に侵入することを報告しているが、細胞内侵入による歯周組織の破壊は、完全には明ら

かになっていない。そこで、*P. gingivalis* 33277株を用いて、本菌の口腔上皮細胞様細胞であるKB細胞への様々な生物活性を検討した。また、一部の実験は、KB細胞だけでなく、骨芽細胞などの細胞を用いて検討を行った。

これらの結果から、*P. gingivalis* 33277株を用いた実験から、様々な生物活性が明らかになれば、この菌による細胞内侵入が病態の形成に関与することが示されることになる。従って、臨床的な二次予防の観点から鑑みると、この*P. gingivalis*を細胞内に入ることの阻止すること、又は、細胞内に侵入した*P. gingivalis*を除去することが出来る薬品を検索することは意義あることと思われる。そこで、その転移についても、検討を加えた。即ち、*P. gingivalis* 33277株とKB細胞を用いた実験系に、様々な薬品を添加し、細胞内に侵入した細菌への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1)細胞；口腔上皮細胞として、KB細胞を用いた。又、同じく口腔上皮細胞として、HSC-2細胞、Ca細胞、並びにEpi-4細胞を用いた。又、一部の実験において、マウスの骨芽細胞MC3T3-E1細胞を用いた。

(2)*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) : *P. gingivalis* の33277株を使用した。

(3) Northern blot assay ; prostaglandin (PG) 合成酵素 cyclooxygenase (Cox) -2、IL-6、並びに Actin の cDNA でハイブリダイゼーションを行った。

(4) Real time PCR ; TaqMan プローブを用いて、CAP18 と beta2-defensin 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 : Monodansylcadaverin (MDC)、Ouabain、Colchicine、Nocodazole、並びに Cytochalasin D を使用した。

(8) IL-6 の定量 ; ELISA 法で検討した。

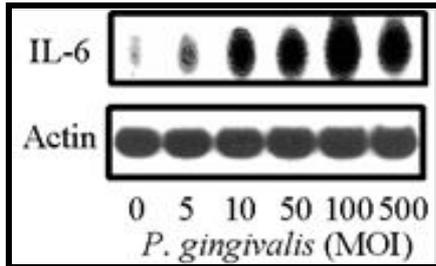
(9) MAP キナーゼ阻害剤 : ERK の阻害剤である PD98059、p38 の阻害剤である SB202190、並びに JNK の阻害剤である SP600125 をそれぞれ使用した。

(10) Western blot 法 : Phospho-p38、p38、Phospho-ERK、並びに、ERK を検討した。

(11) 転写因子 NF- κ B 阻害剤 ; PDTC、NAC、Gliotoxin、並びに TPCK を使用し検討を行った。

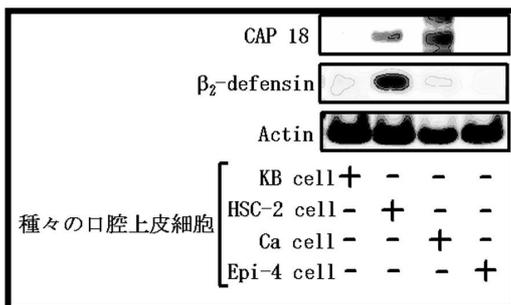
4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* は、ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 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。



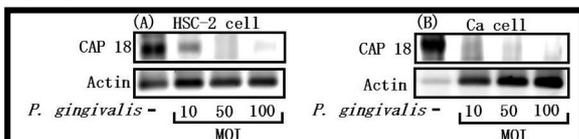
Northern blot assay の結果から、*P. gingivalis* は、ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞の IL-6 遺伝子発現を強く誘導し、また、その誘導作用は、作用させた菌量に依存的であった。また、この誘導作用は、IL-6 のタンパク質レベルでも、ELISA 法で確認した。また、この作用は、KB 細胞を用いたところ、本菌の線毛や LPS によって誘導されることなかった。

(2) ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞、HSC-2 細胞、Ca 細胞、並びに Epi-4 細胞の抗菌物質 CAP18 と beta2-defensin を発現している。



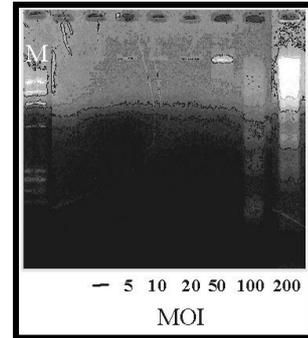
幾つかのヒト口腔上皮細胞様細胞を用いて、抗菌物質 CAP18 と beta2-defensin の発現を検討したところ、HSC-2 細胞と Ca 細胞に強い発現が認められた。

(3) ヒト口腔上皮細胞様細胞 HSC-2 細胞と Ca 細胞の抗菌物質 CAP18 に関する *P. gingivalis* の抑制作用



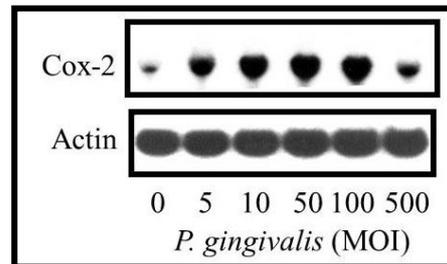
ヒト口腔上皮細胞様細胞 HSC-2 と Ca 細胞におけるを用いて、抗菌物質 CAP18 に関する *P. gingivalis* の作用を検討したところ、強い抑制作用が認められた。

(4) *P. gingivalis* はマウス骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞の細胞死を強く誘導する。



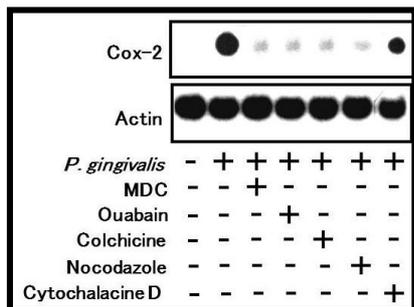
様々な細胞を用いて *P. gingivalis* の新たな生物活性を検討したところ、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 に関して、強く細胞死を誘導することが明らかとなった。この細胞死の誘導は、*P. gingivalis* を作用させた後、抗生物質を作用させ、細胞外の菌を死滅させた後でも、認められた。又、この細胞死を詳しく検討したところ、DMNA の断片化が誘導されていたことから、アポトーシスによるものであることが示された。

(5) *P. gingivalis* は、ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞の PG 合成酵素 cyclooxygenase (COX) -2 の発現を誘導する。



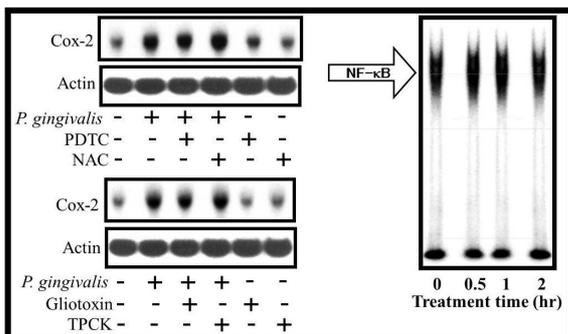
P. gingivalis は、ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞の Cox-2 遺伝子発現を強く誘導し、また、その誘導作用は、作用させた菌量に依存的であった。また、この作用は、KB 細胞を用いたところ、本菌の線毛や LPS によって誘導されることなかった。また、*P. gingivalis* を 41kDa 線毛を認識するポリクロナール抗体で、処理を行い、細胞への付着と侵入を阻害すると Cox-2 遺伝子発現に関する誘導作用は、強く阻害された。

(6) ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞において *P. gingivalis* が誘導する PG 合成酵素・COX-2 の発現を細胞内侵入阻害剤が阻害する。



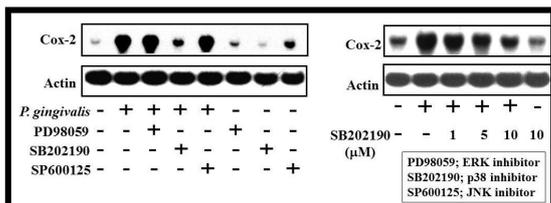
ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞において、*P. gingivalis* が誘導する Cox-2 遺伝子発現は、本菌の細胞内侵入を阻害する薬剤である Monodansylcadaverin (MDC)、Ouabain、Colchicine、Nocodazole、並びに Cytochalasin D によって、強く抑制されることが示された。

(7) ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞において *P. gingivalis* が誘導する PG 合成酵素・COX-2 の発現に転写因子 NFκ-B は関与しない。



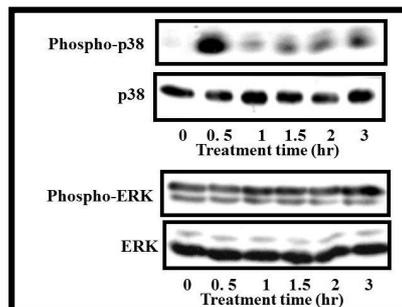
Cox-2 遺伝子発現に転写因子 NFκ-B の関与が示されている。そこで、ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞における *P. gingivalis* 誘導性 Cox-2 遺伝子発現に関する転写因子 NF-κB 阻害剤 (PDTC、NAC、Gliotoxin、並びに TPCK) の作用を検討した。その結果、PDTC、NAC、Gliotoxin、並びに TPCK に、本菌が誘導する Cox-2 遺伝子発現に関する強い抑制作用は認められなかった。

(8) ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞において *P. gingivalis* が誘導する PG 合成酵素・COX-2 の発現における MAP キナーゼの機能的な役割。



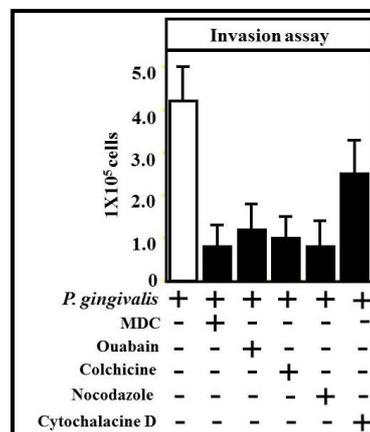
様細胞 KB 細胞における *P. gingivalis* 誘導性 PG 合成酵素・COX-2 の発現においても、この MAP キナーゼの関与を推察し、MAP キナーゼ阻害剤である PD98059 (ERK の阻害剤)、SB202190 (p38 の阻害剤) 並びに SP600125 (JNK の阻害剤) を用いて検討を加えた。その結果、SB202190 処理群において、*P. gingivalis* 誘導性 COX-2 の発現に強い抑制作用が認められた。

(9) ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞において *P. gingivalis* は p38 のリン酸化を誘導する



Phospho-p38、p38、Phospho-ERK、並びに、ERK を認識する抗体を用いた Western blot を行って、p38 のリン酸化について検討を加えた。MAP キナーゼの情報伝達機構の活性化に関して、p38 のリン酸化によって、p38 情報伝達経路の活性化が行われる。Western blot の結果は、細胞内の p38 リン酸化が、*P. gingivalis* によって強く誘導されることが示された。また、この p38 のリン酸化は、p38 のタンパク質の量が増加によるものではないことも、明らかとなった。

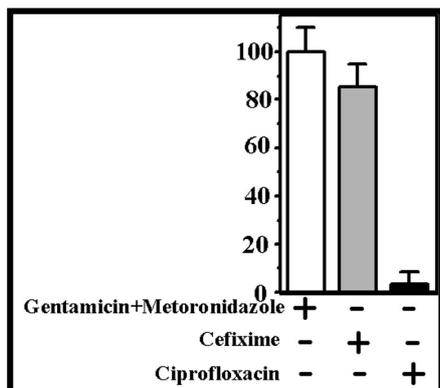
(10) ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞において *P. gingivalis* の細胞内侵入を阻害する薬剤の検索



P. gingivalis が、細胞内に入ることを阻止すること、又は、細胞内に侵入した *P. gingivalis* を除去することが出来る薬品を検索する目的で、他の病原性細菌の細胞内侵入を阻害する MDC、Ouabain、Colchicine、

Nocodazole、並びに Cytochalasin D を用いて検討を加えた。その結果、これらの薬品には、*P. gingivalis* の細胞内侵入を強く抑制することが示された。

(11) ヒト口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞において細胞内侵入した *P. gingivalis* に関する Ciprofloxacin の除菌作用



細胞内に侵入した *P. gingivalis* を除去することが出来る薬品を検索する目的で、細胞内侵入能を有する他の病原性細菌を除去できる抗生剤である Cefixime と Ciprofloxacin を検討した。その結果、Ciprofloxacin に、細胞内に侵入した *P. gingivalis* を除去できる可能性が示された。

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 3 件)

宮澤 慶, 松本 勝, 竹下 玲, 深井智子, 高橋明子, 北 邦宏, 安井利一: 歯科衛生士学校におけるスポーツ歯学の取り組みについて, スポーツ歯学 17(1), 2013 年, 14-19,

流石知佳, 松本 勝, 竹下 玲, 北 邦宏, 仲筋宣子, 小野大地, 滝田裕美, 安井利一: 療養型病床群入院患者への口腔保健評価手法に関する研究, 明海歯科医学 42(2), 2013 年, 130-139

篠田宏幸, 竹下 玲, 中林靖雄, 末續真弓, 高野安紀子, 宮澤 慶, 北 邦宏, 西條光雅, 高野梨沙, 中川和弘, 小山主之, 田中園治, 熊倉 学, 遠藤浩正, 柏崎秀一, 田中 入, 元地茂樹, 大高義文, 杉山卓司, 河野 哲, 川俣富貴子, 小野大地, 滝田裕美, 鈴木玲爾, 下島孝裕, 安井利一, マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞の一酸化窒素誘導性アポトーシスに対する porphyromonas gingivalis 由来 CpG DNA の抑性作用, 明海歯科医学誌 44 (2), 250-267, 2015 年 8 月

[学会発表](計 8 件)

竹下 玲, 広瀬公治, 高野安紀子, 岡本和彦, 松本 勝, 柴田えり子, 流石知佳, 上田知恵, 仲筋宣子, 下島孝裕, 大川周治, 安井利一: *Porphyromonas gingivalis* 線毛による単球前駆細胞様 M1 細胞のアポトーシスの阻害作用に関する情報伝達機構の解析, 第 61 回日本口腔衛生学会・総会, 神奈川県医科大学・神奈川県・横須賀市, 2012 年 5 月

広瀬公治, 大橋明石, 竹下 玲, 車田文雄, 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, 神奈川県医科大学・神奈川県・横須賀市, 2012.5

遠藤浩正, 深井穂博, 三木昭代, 島田 篤, 申 基喆, 深井智子, 竹下 玲, 安井利一: 埼玉県歯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, 広瀬公治, 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, 熊本市市民会館・熊本県・熊本市, 2014 年 5 月

広瀬公治, 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, 仙台国際センター・宮城県・仙台市, 2014 年 5 月

竹下 玲, 広瀬公治, 岡本和彦, 高野安紀子, 末續真弓, 柴田えり子, 小野大地, 滝田裕美, 鈴木玲爾, 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 誘導性 MCP-1 の発現機構について, 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, つくば国際会議場・茨城県・つくば市, 2015 年 5 月

竹下 玲, 広瀬公治, 岡本和彦, 高野安紀子, 西條光雅, 小野大地, 鈴木玲爾, 下島孝裕, 大川周治, 安井利一; 骨芽細胞における TNF- α による転写因子 AP-1 の誘導とサイトカイン発現における機能的役割, 第 65 回日本口腔衛生学会・総会, 東京医科大学・東京都・文京区, 2016 年 5 月

[図書](計 9 件)

竹下 玲: 安井利一, 神原正樹, 荒川浩久 編集, 学健書院, スタンダード衛生・公衆衛生(第 14 版), 「A. 疾病予防の概念」, 4 章 疾病予防と健康管理, 2015 年 p43-48

竹下 玲: 安井利一, 神原正樹, 荒川浩久 編集, 学健書院, スタンダード衛生・公衆衛生(第 14 版), 「B. 感染症の予防」, 4 章 疾病予

防と健康管理，2015年 p49-61

竹下 玲：安井利一，神原正樹，荒川浩久
編集，学健書院，スタンダード衛生・公衆衛
生(第14版)「C.生活習慣病の予防」4章 疾
病予防と健康管理，2015年 p62-70

竹下 玲：安井利一，神原正樹，荒川浩久
編集，学健書院，スタンダード衛生・公衆衛
生(第14版)「D.健康管理」4章 疾病予
防と健康管理，2015年 p71-75

竹下 玲：安井利一監訳，クインテッセ
ンス出版株式会社，バランス：患者と歯科医師
のためのう蝕管理ガイドバランス，「Step1；
う蝕の進行とう窩の形成機序の理解」，2016
年 p 1-2

竹下 玲：安井利一監訳，クインテッセ
ンス出版株式会社，バランス：患者と歯科医師
のためのう蝕管理ガイドバランス，「Step2；
患者のリスクの特定(同定)」，2016年 p 3-5

竹下 玲：安井利一監訳，クインテッセ
ンス出版株式会社，バランス：患者と歯科医師
のためのう蝕管理ガイドバランス，「Step4；
う蝕の防御因子の理解」，2016年 p 22-32

竹下 玲：安井利一監訳，クインテッセ
ンス出版株式会社，バランス：患者と歯科医師
のためのう蝕管理ガイドバランス：「Step6；
実際の患者におけるう蝕リスク評価」，2016
年 p40-55

〔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：
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

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

(2) 研究分担者

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

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

(4) 研究協力者

()