

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791970

研究課題名(和文) *Treponema denticola* の細胞侵入に関する病原性の解明研究課題名(英文) The behavior of epithelial cells for the invasion by *Treponema denticola*

研究代表者

国分 栄仁 (Kokubu, Eitoyo)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70453785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原性菌のひとつである *Treponema denticola* の上皮細胞に対する病原性を明らかにするため、培養細胞の破綻機構、細胞への侵入、免疫機能に関する変化の検討を行った。

感染30分後から侵入を示唆する像を認め、IL-1発現は野性株での減少が認められた。IL-6発現量は野性株の感染後1時間でピークを示し、HSP70は感染後3時間から増加した。prtPおよびMsp欠損株共にHSP70 mRNA発現は減少した。*T. denticola* は感染により上皮細胞のストレスタンパクおよびサイトカイン産生を引き起こし、そのプロセスにMspおよびprtPが関与する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)： *Treponema denticola* is major pathogen of chronic periodontitis. The aim of this study was to investigate the behavior of epithelial cells infected by *T. denticola*.

The invasion of *T. denticola* into REs was observed at 30min by SEM, and some *T. denticola* break into between cells and culture substrate. The expression of IL-6, IL-1, and HSP70 mRNAs were increased in *T. denticola* wild type infected cells. The peak of expression of IL-1 and IL-6 mRNAs were 1hr after infection, and that of HSP70 mRNA was 24hrs after infection, the increase was also observed in Msp deficient mutant *T. denticola*. In dentilisin deficient mutant, the expression of IL-1 and IL-6 mRNAs were lower than that of *T. denticola* ATCC35405 and DMSP-3, and increase of HSP70 was not detected. These result suggested that dentilisin play a major role in protection of inflammatory cytokine and stress protein from epithelial cells.

研究分野：微生物学

キーワード：微生物 口腔細菌 *Treponema denticola*

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯の喪失による咀嚼運動、QOL の低下に加え、全身の健康状態にも強い影響を与えることが明らかになっている (Offenbacher 1996)。現在までに歯周病と全身疾患の関連は、心血管疾患や呼吸器系疾患、骨粗鬆症、糖尿病、さらには妊娠における早産や低体重児などの関連が数多く報告されている。

慢性歯周炎を悪化させる主要な病原菌群として Red complex と呼ばれる *Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythensis* および *Treponema denticola* の 3 菌種が挙げられている (Socransky 1998)。*T. denticola* の病原性は Major sheath protein: Msp (Fenno 1998, Ellen 2006) による付着と細胞障害性、タンパク分解酵素: dentilisin (Ishihara 2008) による細胞間マトリクスの分解、補体活性化による組織障害および宿主免疫機構に対する抵抗性が報告される。*T. forsythensis* の表層タンパクである leucine-rich repeat protein: LRR は、バイオフィーム形成および上皮組織侵入に関与するとともに、*P. gingivalis* を活性化させて歯槽骨の吸収にも関与し、LRR は *T. denticola* にも存在することが認められている (Ikegami 2004)。これらの病原因子に加え、*T. denticola* は歯肉上皮細胞への侵入が認められている。しかしながら *P. gingivalis* および *T. forsythensis* による上皮細胞への侵入メカニズムについて多数報告されているのに対し、*T. denticola* による上皮細胞侵入メカニズムに関する報告は少なく、さらに侵入した後の宿主細胞の免疫応答についても不明な点が多い。

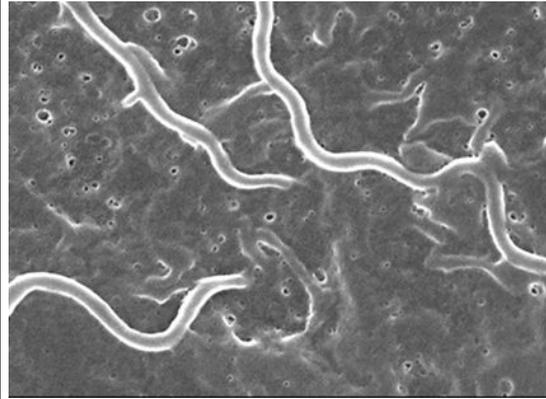
*T. denticola* に対する免疫応答は、MSP および菌体の膜成分 lipo oligo saccharide (LOS) が標的細胞の膜表面に存在する Toll-like receptor: TLR2、TLR4 と結合し、NF- $\kappa$ B を介して炎症性サイトカイン産生の活性化を引き起こす。放出されたサイトカインにより炎症性反応や免疫反応が誘導される。しかしながら、*T. denticola* の感染により TLR2 による制御が起こることは報告されているが、細胞内に侵入した場合、細胞がどのように本菌を認識し、どのような挙動を示すか不明である。これを明らかにする事は、*T. denticola* の病原性の解析を通して慢性歯周病発症メカニズムの解明へつながる。

## 2. 研究の目的

上皮細胞に対する *T. denticola* の侵入機序および細胞応答を解明する。*T. denticola* の主要な病原性には dentilisin および Msp が挙げられる。当研究では *Treponema denticola* ATCC 株 35405 の他に、dentilisin 欠損株および Msp 欠損株を用い、口腔粘膜上皮細胞に対する侵入性を解析し、現在までに dentilisin および Msp 欠損株により侵入性が低下するデータを得ている。これらの欠損株

を用いることで、dentilisin による細胞表面タンパクの分解、MSP によるタンパク付着能、および TLR2 刺激作用等が宿主細胞への侵入に与える影響を明らかにする。

マラッセ上皮残遺細胞に *T. denticola* ATCC35405 を感染させた場合、30 分後から細胞内に侵入を認めた。さらに生細胞のライブ観察では細胞内に侵入した *T. denticola* の一部は、細胞と菌体の端が結合したまま細胞外に抜け出る像が認められた(下写真)。



しかしながら口腔粘膜上皮に対する(1)細胞内への侵入機序、(2)細胞内での *T. denticola* の動態および宿主細胞による本菌の認識、(3)宿主細胞のストレス応答に関するシグナル、および経時的な変化は未だ不明な点が多いため、当研究の 3 つのテーマに設定し、*T. denticola* の病原性および宿主細胞の免疫応答を解析する。

検索法として(1)細胞内への侵入機序の検索は走査型/透過型電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞侵入を形態学的に観察する。(2)細胞内での *T. denticola* の動態検索は autophagy の関与、lysosome により分解される上でのプロセス、あるいはどの程度生存、もしくは脱出するか免疫組織学的検索を用いて細胞内 traffic 関連タンパクを指標として解析する。(3)細胞内のストレス応答を検索として細胞内シグナルである Erk や HSP、およびサイトカインに関連する Interleukin -1, -2, -6, TNF 等タンパクの発現までおシグナルを組織学的、および分子生物学的に解析を行う。

得られた結果から、*T. denticola* の病原性因子による侵入メカニズムが明らかになる。さらに感染による宿主細胞の動態変化を経時的に検索することにより、細胞内に侵入した *T. denticola* に対する防御応答とそれに関わる細胞内シグナル発現が明らかとなる。

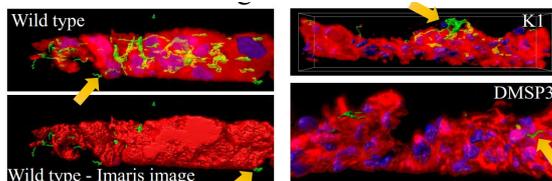
## 3. 研究の方法

*Treponema denticola* の 3 菌株を培養口腔粘膜上皮細胞に感染させ、細胞/組織に対する侵入作用および免疫応答を解明する。検索方法は 1. in vitro での実験では、*T. denticola* の感染による培養細胞の経時的な変化を検索する。評価法は 組織形態学的観察による細胞侵入に関する解析。 蛍光抗体

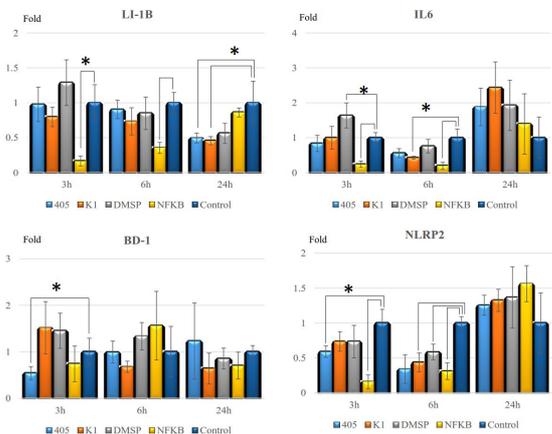
法による侵入メカニズムの免疫組織学化学的検索。分子生物学的に RT-PCR 法および ELISA 法を用いて Interleukin および TNF 等の免疫関連タンパク発現の解析、および signal inhibit を行いシグナル経路を解明する。これら in vitro のデータをもとに *T. denticola* の侵入に関する病原性を解明する。

#### 4. 研究成果

SEM による組織学的観察では、感染 30 分後から *T. denticola* が細胞内に侵入する像や、細胞と培養皿との間に潜り込む像を観察した。リアルタイムによる共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では、細胞から *T. denticola* が脱出するように出てきている像を認めたが、細胞と菌体の一部が繋がったままであった。

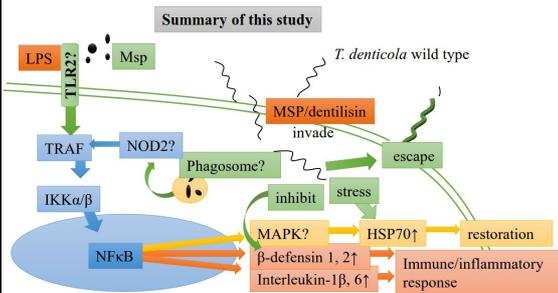


蛍光抗体法による観察では、IL-6 タンパク発現量は非感染細胞と比較すると野性株を感染させた場合に強く発現が認められ、DMSP 株では若干発現を認めた。BD-2 タンパク発現は、野性株で発現を認めた。また、HSP70 の発現はすべての群においてタンパク発現を認めた。RT-PCR 法を用いた検索では、IL-1 mRNA 発現量は全ての群、期間においても変化は認められなかったが、IL-6 mRNA は感染群において 6 時間例で非感染群と比較すると有意鎖を持って高い値を示した。また、BD-2 mRNA 発現量は野性株を感染させた 24 時間例で有意鎖を持って高い値を示し、それに基づき DMSP 群の 24 時間例で増加が認められた。HSP70 mRNA 発現量は、感染後 3 時間例で増加し、6 時間をピークに有意鎖を持って増加したが、ピークの値は感染群で差は認められなかった。NOD-1 mRNA 発現量は感染により増加し、欠損株では発現量が増加した。



*T. denticola* の表面に存在する MSP および

prtP は外膜を形成する主要タンパクであり、上皮細胞に対して付着因子および細胞障害性因子としての機能がある (5,6)。今回の実験では *T. denticola* 野性株の ATCC 35405、dentilisin 欠損株の K1、Msp 欠損株の DMSP を用いてマラッセ上皮遺残細胞に対する病原性を検索した結果、IL-6 発現量が野性株の感染後 1 時間でピークを示し、HSP70 は感染後 3 時間から増加した。prtP および msp 欠損株共に HSP70 mRNA 発現は減少し、IL-2 発現は msp 欠損株で減少した。



これらの結果より、*T. denticola* は感染によりマラッセ上皮残遺細胞のストレスタンパクおよびサイトカイン産生を引き起こし、そのプロセスに Msp および PrtP が関与する事が示唆された。

#### 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)

Matsuzaka K, Kokubu E, Inoue T. The effects of epithelial rest of Malassez' cells on Interleukin-1 and Interleukin-6 mRNA expression by periodontal ligament fibroblasts stimulated with sonicated *Porphyromonas gingivalis* in vitro. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology. (査読有) [accepted]

Kokubu E, Kokubun K, Matsuzaka K, Kashiwagi K, Shiba K, Inoue T, Ishihara K, Yoshinari M. The Effect of Artificial Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 with Titanium-binding Peptide on a Ti Graft in Vivo. Journal of Oral Tissue Engineering. 2014;12(1):1-7. (査読有)

Matsuzaka K, Kokubu E, Inoue T. The effects of epithelial rests of Malassez cells on periodontal ligament fibroblasts against centrifugal forces in vitro. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 2013;25(2):174-178. (査読有)

[学会発表](計 4件)

国分栄仁（他4名） The immunoresponse of oral epithelial cells infected Treponema denticola、第88回日本細菌学会総会、2015年3月26日・27日、長良川国際会議場、岐阜

国分栄仁（他4名） Treponema denticola の細胞侵入に対する Malassez 上皮遺残細胞の動態、第56回 歯科基礎医学会学術大会・総会、2014年9月25日～27日、福岡国際会議場、福岡

国分栄仁（他4名） Treponema denticola の細胞侵入に対する Malassez 上皮遺残細胞の細胞動態、第60回国際雌花研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会、2012年12月14日・15日、新潟コンベンションセンター、新潟

国分栄仁（他4名）口腔上皮細胞に対する歯周病原性菌の侵入、第22回日本歯科医学会総会、2012年11月9日～11日、大阪国際会議場、大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

国分 栄仁 (KOKUUBU EITOYO)  
東京歯科大学微生物学講座・助教  
研究者番号：70453785