

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 12 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463228

研究課題名(和文)喫煙が歯周病原菌の宿主細胞侵入に及ぼす影響の分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanisms involved in host cell invasion by periodontal pathogens under the exposure by cigarette smoke.

研究代表者

齋藤 淳 (Saito, Atsushi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60266559

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)：ヒトの上皮細胞は細菌感染や喫煙によるタバコ煙などの有害性のある環境因子に対する防御的役割を担っている。現在、タバコ煙が宿主細胞の機能に及ぼす影響の詳細については明らかにされていない。そこで今回、タバコ煙抽出物(CSC)がヒト歯肉上皮細胞の創傷治癒、および代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* との相互作用に及ぼす影響について検討した。その結果、低濃度のCSCは、歯肉上皮細胞の細胞骨格やインテグリンの発現を変化させることにより、*P. gingivalis* の細胞内進入を促していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells are recognized as the first line of defense against bacterial infection and environmental harmful stimuli such as cigarette smoke (CS). Currently, mechanisms by which CS affects cellular functions remain uncertain. We therefore investigated the effects of CS condensate (CSC) on in vitro wound closure of human gingival epithelial cells and their potential interactions with a major periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Low concentrations of CSC increased invasion of human gingival epithelial cells by *P. gingivalis* and induced changes in cytoskeleton and integrin expression, thereby modulating the cell migration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯肉上皮細胞 喫煙 タバコ煙 *Porphyromonas gingivalis* 歯周病原細菌 細胞侵入 細胞骨格 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患のリスクファクターには環境因子、細菌因子、宿主因子があるが、なかでも喫煙は環境面における重大なリスクファクターである。一方、歯周炎は歯周病原細菌による感染およびその生体反応であり、とくに *Porphyromonas gingivalis* は、様々な形で病因に関与している。喫煙は宿主因子と細菌因子の双方に作用することは明らかであることから、喫煙が歯周病の発症と進展、そして歯周病治療に及ぼす影響を明らかにするうえで、宿主細胞と歯周病原細菌との相互作用の視点からも検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は歯周炎の発症・進展における喫煙の影響の一端を、歯周病原細菌と宿主細胞との相互作用に焦点をあてて解明すべく、具体的には、タバコ煙が歯肉上皮細胞の機能、そして *P. gingivalis* の細胞内侵入に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

宿主細胞として、ヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22) を、タバコ煙としてタバコ煙抽出物 (Cigarette Smoke Condensate) を使用した。供試細菌として *P. gingivalis* ATCC 33722 を用いた。ヒト歯肉上皮細胞 Ca9-22 を 10% FBS 添加 MEM にてコンフルエントに達するまで培養した。予備実験で決定した濃度のニコチンまたはタバコ煙抽出液 (CSC) を 24 h 作用させた後、細胞の生死はトリパンブルー排除試験、細胞増殖能は WST-1、遊走能は wound healing assay にて評価を行った。CSC 添加後の細胞形態は位相差顕微鏡で、細胞骨格は共焦点レーザー顕微鏡 (CSLM) にて観察した。

遊走に関与しているとの報告がある integrin $\alpha 3$ の発現局在を共焦点レーザー顕微鏡 (CSLM) にて観察した。さらに integrin $\alpha 3$ の mRNA 発現を real-time RT-PCR を用いて定量した。以上の実験は、*P. gingivalis* の感染下 (MOI= 100, 2 h) でも行った。

細胞内侵入は、各種濃度の CSC を 24 h 作用させ、*P. gingivalis* を MOI=100 の条件で 2 時間感染させた。Saito et al. (FEMS Immunol Med Microbiol 2008) の方法に従って antibiotic protection assay を使用して侵入率を評価するとともに、侵入状況は CSLM で確認した。

4. 研究成果

(1) 喫煙者の唾液中濃度に相当するニコチン濃度の範囲において、Ca9-22 の細胞生死と増殖能に変化は認められなかった。CSC 濃度 0.1-50 $\mu\text{g/ml}$ では Ca9-22 の遊走能に濃度依存性の促進が認められ、細胞形態および細胞骨格に変化が観察された。250 $\mu\text{g/ml}$ (ニコチン濃度約 6.0 $\mu\text{g/ml}$) 以上の CSC 濃度では遊走能の抑制が認められたことから、CSC は濃度により歯肉上皮細胞の遊走能に二相性の影

響を及ぼし、これには細胞骨格の変化が関与していることが示唆された。

(2) Ca9-22 の創傷閉鎖について、wound healing assay を使用し検討した結果、scratch 側に近接した細胞において integrin $\alpha 3$ の発現の亢進が観察され (図 1)、さらに mRNA 量も約 2 倍の増加を示した。一方、*P. gingivalis* を感染させると Ca9-22 の遊走能、integrin $\alpha 3$ の発現は全体的に抑制され、CSC による促進傾向は認められなかった。以上の結果から、CSC が及ぼすヒト歯肉上皮細胞の遊走能への二相性の影響には、細胞骨格と integrin 発現の変化が関与していることが示唆された。

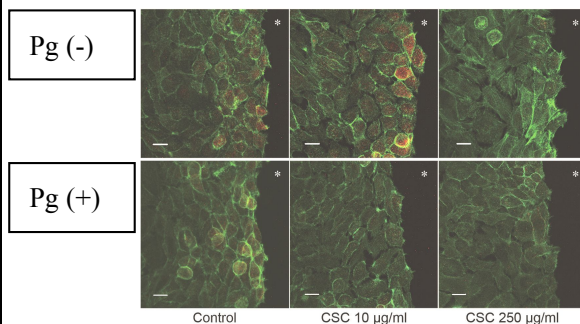


図 1 CSC 曝露下のヒト歯肉上皮細胞の Wound healing における integrin $\alpha 3$ の発現 (Imamura et al., J Periodontal Res 50:411-421, 2015)。

(2) 歯肉上皮細胞への *P. gingivalis* 侵入率は CSC 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で有意に高い値を示した。細胞内外の細菌を染め分ける二重染色法を使用した共焦点レーザー顕微鏡での観察においても、この濃度において最も多くの *P. gingivalis* の Ca9-22 への侵入が確認された (図 2)。

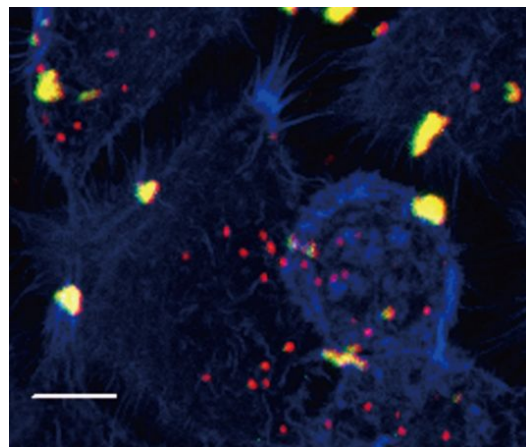


図 2 CSC 曝露下のヒト歯肉上皮細胞への *P. gingivalis* の侵入 (Imamura et al., J Periodontal Res 50:411-421, 2015)。赤は細胞内に侵入した *P. gingivalis*、黄色は細胞外の菌。

以上のことから、低濃度の CSC は、歯肉上皮細胞の細胞骨格やインテグリン発現を制御することにより、*P. gingivalis* の歯肉上皮細

胞への侵入を促す可能性が示唆された。

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4件)

Tomita S, Komiya-Ito A, Imamura K, Kita D, Ota K, Takayama S, Makino-Oi A, Kinumatsu T, Ota M, Saito A.

Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. *Microb Pathog* 61-62:11-15, 2013. (査読あり) doi:10.1016/j.micpath.2013.04.006.

Tomita S, Kasai S, Ihara Y, Imamura K, Kita D, Ota K, Kinumatsu T, Nakagawa T, Saito A.

Effects of systemic administration of sitafloxacin on subgingival microflora and antimicrobial susceptibility profile in acute periodontal lesions. *Microb Pathog* 71-72:1-7, 2014. (査読あり) doi: 10.1016/j.micpath.2014.04.003.

Tomita S, Kasai S, Imamura K, Ihara Y, Kita D, Ota K, Sekino J, Nakagawa T, Saito A.

Changes in antimicrobial susceptibility profile and prevalence of quinolone low-sensitive strains in subgingival plaque from acute periodontal lesions after systemic administration of sitafloxacin. *Microb Pathog* 79:41-46, 2015. (査読あり) doi: 10.1016/j.micpath.2015.01.005.

Imamura K, Kokubu E, Kita D, Ota K, Ishihara K, Saito A.

Cigarette smoke condensate modulates migration of human gingival epithelial cells and their interactions with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* 50:411-421, 2015. (査読あり) doi:10.1111/jre.12222.

[学会発表](計8件)

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回春季日本歯周病学会学術大会, 東京都江戸川区, 平成25年5月31日 日歯周誌 55(春季特別号):94, 2013.

Imamura K, Kita D, Kokubu E, Ishihara K, Saito A.

Effect of cigarette smoke condensate on in vitro wound healing of human gingival epithelial cells 50th Anniversary Symposium, University at Buffalo Oral Biology Graduate Program, Buffalo, NY, USA, 平成25年6月12-14日

50th Anniversary Symposium, University at Buffalo Oral Biology Graduate Program, Buffalo, NY, USA Program and Abstracts, p.19, 2013
Adv Dent Res 26:66, 2014.

高山沙織, 大久保信貴, 加藤哲男, 齋藤 淳.
米ペプチド CL の歯周病原細菌内毒素活性の抑制効果

日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会(第138回), 福岡市, 平成25年6月28日
日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会(第138回) プログラムおよび講演抄録集, p.68.

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, 岡山市, 平成25年9月22日
J. Oral Biosci. Suppl.: 229, 2013.

富田幸代, 笠井俊輔, 藤田貴久, 大久保信貴, 井原雄一郎, 藤本芳弘, 齋藤 淳, 中川種昭.

シタフロキサシン経口投与による歯周炎急発部位の細菌叢の変化と薬剤感受性の検討
第56回秋季日本歯周病学会学術大会, 前橋市, 平成25年9月22日
日歯周誌 55(秋季特別号):120, 2013.

高山沙織, 今村健太郎, 喜田大智, 加藤哲男, 齋藤 淳.

米ペプチド CL は *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS によるヒト大動脈内皮細胞からの IL-6 産生を抑制する
第296回東京歯科大学学会総会, 東京都千代田区, 平成25年10月19日
歯科学報 113: 432, 2013.

石井善仁, 今村健太郎, 菊池有一郎, 関野仁, 田中公文, 清田 築, 石原和幸, 齋藤 淳.

抗体 DEPIM 法を使用した新規機器による唾液サンプルからの *Tannerella forsythia* の検出
第57回秋季日本歯周病学会学術大会, 神戸市, 平成26年10月19日
日歯周誌 56(秋季特別号): 110, 2014.

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
第57回秋季日本歯周病学会学術大会, 神戸市, 平成26年10月19日
日歯周誌 56(秋季特別号): 110, 2014.

富田幸代, 笠井俊輔, 長野恭輔, 清田 築, 中川種昭, 齋藤 淳.

慢性歯周炎の急性症状に対するシタフロキサシン経口投与後の細菌叢の変化とキノロ

ン低感受性菌の消長
第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会，神戸
市，平成 26 年 10 月 19 日
日歯周誌 56（秋季特別号）：127, 2014.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 淳 (SAITO ATSUSHI)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：60266559

(2)研究分担者

石原和幸 (ISHIHARA KAZUYUKI)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：00212910
国分栄仁 (KOKUBU EITOYO)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：70453785
高山沙織 (TAKAYAMA SAORI)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00550013

(3)連携研究者

()

研究者番号：