

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463257

研究課題名(和文) 硫化水素産生能に着目したアンギノースグループレンサ球菌による膿瘍形成機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the role of hydrogen sulfide of anginosus group Streptococci on abscess formation

研究代表者

吉田 明弘 (YOSHIDA, Akihiro)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20364151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素による膿瘍形成機構を解明するため、*S. anginosus*の硫化水素欠損株を作製し、マウスに接種したところ、遺伝子欠損の有無にかかわらず、膿瘍を形成した。一方、*P. gingivalis*で同様の実験を行ったところ、欠損株の膿瘍形成能は著しく低下した。これらの結果から、これらの細菌間の硫化水素産生遺伝子は全く別の病原性を示すことが明らかになった。以上から硫化水素自身が膿瘍形成に関与するのではなく、硫化水素遺伝子により発現が誘導された別の遺伝子産物が関与している可能性を示唆している。また、これらの細菌間では硫化水素産生遺伝子により制御される遺伝子が全く別の遺伝子である可能性を示唆していた。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the role of hydrogen sulfide on abscess formation, we constructed the hydrogen-sulfide-deficient mutant of *Streptococcus anginosus*. There were no differences in abscess formation between wild type and mutant. In addition, we constructed the hydrogen-sulfide-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis*, too. There were significant differences in abscess formation between wild type and mutant. From these results, we concluded the hydrogen-sulfide producing genes of these organisms have quite different roles for abscess formation. These results suggest that the hydrogen sulfide producing genes regulate the other genes and these genes cause the abscess formation in these bacteria. Of these bacteria, the genes regulated by hydrogen sulfide producing gene seem to be quite different.

In conclusion, we found the hydrogen sulfide-producing gene of *P. gingivalis* plays crucial role for abscess formation, while that of *S. anginosus* does not effect on abscess formation.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：Streptococcus anginosus 膿瘍 硫化水素

1. 研究開始当初の背景

アンギノースグループレンサ球菌群 (anginosus group streptococci, AGS) はヒト口腔常在菌叢から分離されるレンサ球菌群であり、*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius* の3菌種に分類されている。AGS は口腔をはじめとした全身の膿瘍から頻りに単離されることから、化膿性炎症との関連が示唆されている。これらの細菌群は口腔以外に、菌種毎に発生部位が異なることが報告されており、比較的多くの組織で感染症を引き起こすことが報告されている (Whiley et al., J. Clin. Microbiol. 1990)。

AGS の病原因子として、*S. intermedius* はヒト血液に特異的な溶血毒素であるインターメディリシンを分泌し、ヒト血液に特異的に□溶血を示すという特徴を有する (Nagamune et al., Infect. Immun. 1996)。この酵素は細菌の栄養源となるだけでなく、宿主細胞の破壊、組織への浸潤や感染にも働く因子と考えられることから、その基質特異性が菌種の感染能力や感染部位と関連する可能性がある。

このように、AGS の病原因子について報告されてきたが、これらの知見だけでは AGS の膿瘍誘発機構として不十分である。これまで、我々は *S. anginosus* が高い L-システイン分解活性を持ち、L-システインを基質として硫化水素 (H₂S) を産生することを報告してきた (Yoshida et al., J. Periodontol. 2009)。また、*S. anginosus* に L-システインを添加・非添加した場合で BALB/c マウスの膿瘍形成能を比較したところ、添加した場合の膿瘍形成能が高いことを報告してきた。さらに、膿汁中の L-システイン分解酵素 C-S lyase の遺伝子発現を解析したところ、添加群では非添加群の 15 倍以上発現が増強することを明らかにしてきた (Takahashi et al., Mol. Oral Microbiol. 2011)。しかし、*S. anginosus* の産生する硫化水素と化膿性炎症、特に膿瘍形成との関連についてこれまで詳細に解析されていない。

2. 研究の目的

今回我々は *S. anginosus* の産生する硫化水素に着目し、その膿瘍形成機構について解析する。

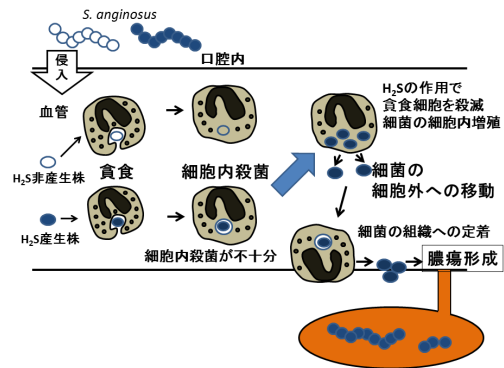


図1 *S. anginosus* 膿瘍形成機構の仮説
特に次の4項目について膿瘍形成機構を説明する。

ヒト歯肉上皮細胞への影響：本細菌および変異株の歯肉上皮細胞におけるアポトーシス誘導等について解析する。

マウス膿瘍形成能への影響：膿瘍形成能の差異について変異株を用いて解析する。

マクロファージ、単球への影響：マクロファージ系細胞の貪食能およびクリアランス能について解析する。

3. 研究の方法

(1) *S. anginosus* 硫化水素によるヒト培養細胞への影響

S. anginosus 親株、 Δlcd 、 $\Delta lcd + lcd$ を用いて、ヒト培養細胞への影響を解析した。

(2) *S. anginosus* 感染によるマウス膿瘍形成能の解析

今回は *S. anginosus* C-S lyase をコードする *lcd* 遺伝子のノックアウト株 (Δlcd) および相補株 ($\Delta lcd + lcd$) を作製し、BALB/c マウスに感染後、その膿瘍径の経日変化を解析した。

(3) 硫化水素産生グラム陰性菌による膿瘍形成能の解析

膿瘍形成で注目されている口腔グラム陰性嫌気性菌である *Porphyromonas gingivalis* による膿瘍形成能との差異を比較解析するため、同菌の硫化水素産生遺伝子を単離同定し、その欠損株を作製し、マウス膿瘍形成能を解析した。

4. 研究成果

(1) *S. anginosus* によるヒト培養細胞への影響

S. anginosus は菌数依存的に、ヒト線維芽細胞に対して細胞傷害作用をもつことが明らかになった。

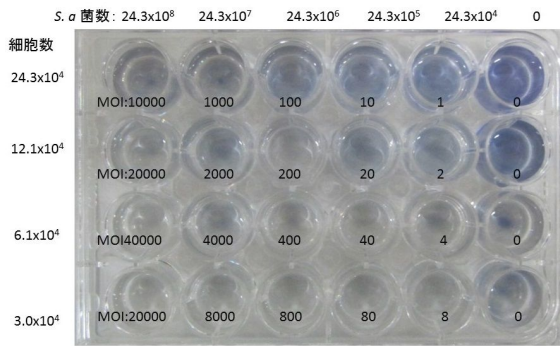


図2 *S. anginosus* のヒト線維芽細胞への細胞傷害作用

(2) *S. anginosus* 感染によるマウス膿瘍形成能の解析

S. anginosus が産生する硫化水素の炎症誘発作用を解析する目的で、*S. anginosus* 菌液にL-システインを添加したもの、コントロールとして *S. anginosus* 菌液+D-システイン、*S. anginosus* 菌液のみの3群を用いてマウス膿瘍形成能を解析したところ、L-システイン、D-システインを添加した場合には炎症が起こり、非添加群では炎症が起こらなかった。

、間の炎症誘発能はL-システインを添加したほうがやや早く炎症が誘発される傾向にあったが、間ではほとんど差異がみられなかった。また、同様の実験をマクロファージの貪食能で解析したところ、マウス膿瘍と同様にL-システイン、D-システインを添加した場合には非添加の場合と比べマクロファージ内での生存率が上昇しており、間においてシステインの構造の違いによる生存率の差異は認められなかった。これらのことから、*S. anginosus* の炎症誘発機構に硫化水素が直接関与しているのではなく、L-システインあるいはD-システインにより誘発される別の起炎物質があることが示唆された。

(3) 硫化水素産生グラム陰性菌による膿瘍形成能の解析

P. gingivalis でL-システインを基質として硫化水素を産生する酵素を単離した。本酵素の存在はこれまで報告されておらず、全く新規の硫化水素産生酵素であることが明らかになった。本酵素を欠失した株を作製、マウス皮下に接種し、親株を接種した群と比較したところ、マウスの膿瘍形成面積は親株で有意に高いことが明らかになった。

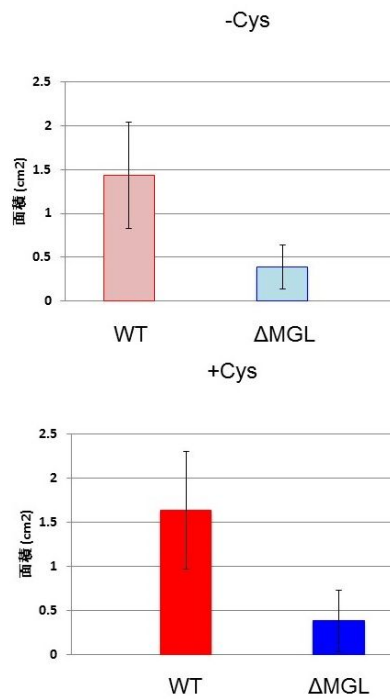


図3 L-システインの有無と *P. gingivalis* 親株と硫化水素産生遺伝子欠損株を皮下接種した場合のマウス膿瘍形成面積
さらに、マウスの生存率は欠損株接種群で有意に高いことが明らかになった。

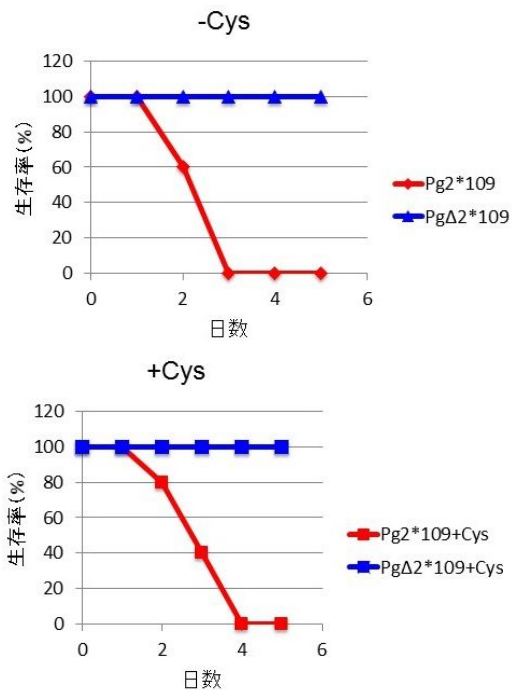


図4 *P. gingivalis* 親株と硫化水素産生遺伝子欠損株を皮下接種した場合のマウス生存率

以上の結果は、マウスへの病原性には硫化水素産生に関わる遺伝子が関与していることを示すものである。

また、*S. anginosus* で同様に硫化水素欠損株を作製し、同様に解析したところ、遺伝子欠損の有無にかかわらず、膿瘍を形成したと

から、*P. gingivalis*と*S. anginosus*の硫化水素産生遺伝子は全く別の病原性を示すことが明らかになった。このことは、硫化水素自身が膿瘍形成に関与しているのではなく、硫化水素遺伝子により誘導された別の遺伝子産物が関与している可能性を示唆している。また、これらの細菌間では硫化水素産生遺伝子により制御される遺伝子が、全く別の遺伝子である可能性を示唆している。さらに、*P. gingivalis*に対するマクロファージによる貪食実験を行ったところ、*P. gingivalis*硫化水素産生遺伝子欠損株は親株と比較して貪食されやすいことが明らかになった。このことから、細菌の産生する硫化水素は自然免疫細胞への貪食に抵抗する因子であることが明らかになった。

以上の結果から、*P. gingivalis*硫化水素産生遺伝子はその制御する遺伝子を介して膿瘍形成に関与している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9件)

1. Yoshida A, Niki M, Yamamoto Y, Yasunaga A and Ansai T (2015) Proteome analysis identifies the Dpr protein of *Streptococcus mutans* as an important factor in the presence of early streptococcal colonizers of tooth surfaces. PLoS one 10: e0121176. 査読有

2. Kiso A, Matsuo K, Shibata Y, Hasegawa H, Yoshida A, Fujimura S (2015) Supplementary studies on an extracellular proteinase of *Prevotella intermedia*: formation and some enzymatic properties. Matsumoto Shigaku 41: 1-6 査読有

3. Matsuo K, Kiso A, Shibata Y, Hasegawa H, Yoshida A, Fujimura S (2015) Characterization of dipeptidyl peptidase-IV of *Porphyromonas gingivalis*. Matsumoto Shigaku 41: 26-32 査読有

4. Takata T, Ansai T, Soh I, Awano S, Nakamichi I, Akifusa S, Goto K, Yoshida A, Fujii H, Fujisawa R and Sonoki K (2014) Serum total cholesterol concentration and 10-year mortality in an 85-year-old population. Clin Intervention Aging 9: 293-300 査読有

5. Takata Y, Ansai T, Soh I, Awano S, Nakamichi I, Akifusa S, Goto K, Yoshida A,

Fujii H, Fujisawa R and Sonoki K (2014) Cognitive function and 10-year mortality in an 85-year-old community-dwelling population. Clin Intervention Aging 9: 1691-9 査読有

6. Yasunaga A, Yoshida A, Morikawa K, Maki K, Nakamura S, Soh I, Awano S, Ansai T: Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and in vitro biofilms by qPCR combined with propidium monoazide. BMC Microbiol. 13: 157, 2013. 査読有

7. Nakata M, Awano S, Kinoshita N, Yoshida A, Ansai T: Neutral endopeptidase regulates neurogenic inflammatory responses induced by stimulation of human oral keratinocytes with bacterial lipopolysaccharide and nicotine. Eur J Oral Sci. 121: 434-442, 2013. 査読有

8. Tearatani G, Awano S, Soh I, Yoshida A, Kinoshita N, Hamasaki T, Takata Y, Sonoki K, Nakamura H, Ansai T: Oral health in patients on haemodialysis for diabetic nephropathy and chronic glomerulonephritis. Clin Oral Investig. 17: 483-489, 2013. 査読有

9. Kinoshita N, Awano S, Yoshida A, Soh I, Ansai T: Periodontal disease and gene expression of metalloendopeptidases in human buccal mucosal epithelium. J Periodontal Res. 48: 606-614, 2013. 査読有

[学会発表](計9件)

1. Proteome Analysis identifies the Dpr Protein of *Streptococcus mutans* as an Important Factor in the Colonization of Tooth Surfaces in the Presence of Early Streptococcal Colonizers: Yoshida A The 3rd Meeting for Osteoclast Biology (長野県軽井沢市) 2015年2月

2. う蝕細菌*Streptococcus mutans*の歯面における競合機構の解析: 吉田明弘 第1回日本骨免疫学会(沖縄県宮古市) 2015年6月

3. 口腔初期定着レンサ球菌と競合時に*Streptococcus mutans*に発現するタンパク質の解析: 吉田明弘 第98回日本細菌学会関東支部総会(東京都千代田区) 2015年10月

4. 歯周組織におけるa disintegrin and

metalloprotease 17について：村野 綾，粟野秀慈，吉田明弘，邵 仁浩，安細敏弘 第63回日本口腔衛生学会・総会（熊本市）2014年5月

5．カリエスフリー小児からの新規抗う蝕細菌の単離同定：中村 卓，吉田明弘，森川和政，牧 憲司，安細敏弘 第63回日本口腔衛生学会・総会（熊本市）2014年5月

6．村野 綾、粟野秀慈、瀬田祐司、吉田明弘、邵 仁浩、豊島邦昭、安細敏弘：歯周組織における a disintegrin and metalloproteinase 17 の局在性について。第73回九州歯科学会総会（北九州市）2013年5月

7．吉田明弘、安永 愛、安細敏弘：歯面初期定着菌と共培養時に発現する *Streptococcus mutans* タンパク質の解析。第62回日本口腔衛生学会・総会（松本市）2013年5月

8．吉田明弘、安永 愛、仁木満美子、山本裕司、安細敏弘。口腔初期定着レンサ球菌と競合時に *Streptococcus mutans* に発現するタンパク質の解析。第22回 Lancefield レンサ球菌研究会 & 第45回レンサ球菌感染症研究会（東京都文京区）2013年6月

9．中村 卓、吉田明弘、星野倫範、藤原 卓、安細敏弘：*Streptococcus anginosus* C-S lyase による組織障害性の解析。第66回日本細菌学会九州支部総会（長崎市）2013年9月

〔図書〕（計2件）

1．吉田 明弘 他、医歯薬出版株式会社 口腔微生物学・免疫学 第4版、2016、304

2．Yoshida A, Niki M, Ansai T, Nakayama K: Oral disease and hydrogen sulfide production by oral bacteria (eds. Derin Adebayo and Aramide Okafor), Nova Science Publishers, New York, USA, 131-145, 2013.

〔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

<http://www.mdu.ac.jp/faculty/course/saikin.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

吉田 明弘 (YOSHIDA, Akihiro)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20364151

(2)研究分担者

福島 秀文 (FUKUSHIMA, Hidefumi)
東北大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：70412624

自見 英治郎 (JIMI, Eijiro)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：40276598

藤原 卓 (FUJIWARA, Taku)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00228975

邵 仁浩 (SOH, Inho)
九州歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：10285463

粟野 秀慈 (AWANO, Shuji)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20301442

安細 敏弘 (ANSAI, Toshihiro)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：80244789

(3)連携研究者

()

研究者番号：