

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861782

研究課題名(和文)自然免疫シグナルが唾液腺による抗菌性因子産生に寄与する機序の解明

研究課題名(英文)The elucidation of the effect of innate immune signaling on production of antimicrobial factors by salivary glands

研究代表者

猪俣 恵 (Inomata, Megumi)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：40553798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺から産生される抗菌性因子は、口腔の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。しかしながら一方で、唾液腺による抗菌性因子の産生制御メカニズムは現在も理解されていない。唾液腺は口腔細菌の直接的暴露を受けないにも関わらず、どのようなメカニズムで抗菌性因子を産生しているのだろうか。本研究では、口腔細菌の存在、すなわち口腔細菌の付着や侵入が、唾液腺による抗菌性因子の産生に何らかの役割を果たすのかどうかを調べた。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial factors produced from the salivary glands play an important role in maintaining homeostasis of the oral cavity. However, on the other hand, the mechanism of production of antimicrobial factors by salivary glands is not currently understood. Although salivary glands despite not subject to direct exposure of oral bacteria, what mechanisms is involved in production of antibacterial factors. In this study, the effects of oral bacteria on production of antibacterial factors by the salivary glands are investigated.

研究分野：口腔免疫学、口腔細菌学

キーワード：口腔細菌 宿主応答

1. 研究開始当初の背景

唾液中にはディフェンシン、ラクトフェリン、ペルオキシダーゼやヒスタチンなど多種多様な抗菌性因子が恒常的に存在する。これらの抗菌性因子は、細菌に対して炎症応答を誘導することなく、直接的に殺菌・静菌作用や細菌凝集阻害作用を発揮する。そのため唾液中の抗菌性因子は、口腔内に恒常的に発現する感染防御因子として非常に優れているとともに、莫大な数の細菌が生息する口腔の恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。このような唾液中の抗菌性因子のほとんどは、唾液腺から産生・分泌されることが知られているが、唾液腺による抗菌性因子の産生制御メカニズムは未だ理解されていない。唾液腺は口腔細菌の直接的暴露を受けないにも関わらず、どのようなメカニズムで抗菌性因子を産生しているのだろうか。

2. 研究の目的

まず、口腔細菌の存在が唾液腺による抗菌性因子の産生に影響を及ぼすのかを解析するため、口腔細菌が宿主細胞に及ぼす影響を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌株ならびに菌液

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 株を嫌気培養し、OD₆₀₀ を 1.0 に調製した菌液を使用した。

(2) *P. gingivalis* の細胞付着能および細胞侵入能の評価

細胞付着能においては、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に *P. gingivalis* を 2 時間で作用させた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を 3 回洗った後、滅菌水で溶解した。細胞溶解液を血液寒天培地に播種し、1 週間嫌気培養した。

細胞侵入能においては、菌体を 2 時間作用させた HUVEC を PBS で洗った後、250 µg/ml メトロニダゾールを 1 時間作用させた。滅菌水で溶解した後、細胞溶解液を血液寒天培地に播種し、1 週間嫌気培養した。細胞付着能ならびに細胞侵入能は、血液寒天培地に生育したコロニー数を作用させたコロニー数で割ることで評価した。

(3) *P. gingivalis* の細胞応答に与える影響の解析

HUVEC に *P. gingivalis* を 24 時間作用させ

た後、HUVEC の *CXCL8* (*IL8*)、*CCL2* (*MCP-1*)、*CCL5* (*RANTES*)、*CXCL10* (*IP-10*)、*IL6* および *IFNB1* の発現量を定量的 PCR によって調べることで解析した。

(4) *P. gingivalis* の細胞増殖または細胞毒性に与える影響の解析

細胞増殖または細胞毒性に与える影響は、HUVEC に *P. gingivalis* を 24 時間作用させた後、細胞由来のプロテアーゼ活性を測定することで解析した。

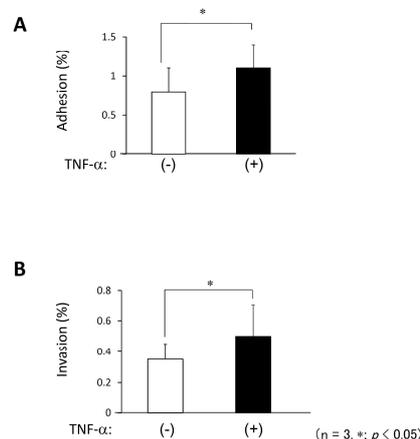
4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* は細胞に付着し、侵入する

まず、口腔細菌が唾液腺による抗菌性因子の産生に影響を及ぼすのかを解析するため、口腔細菌が宿主細胞に付着し侵入するのかどうか、また、口腔細菌の宿主細胞に及ぼす影響を調べた。口腔細菌にはポリフィロモナス属に属する *Porphyromonas gingivalis*、宿主細胞には HUVEC を実験に供試した。血管内皮細胞に着目した理由として、血管内皮細胞を介して細菌の口腔から唾液腺への移行が起こりうると考えたためである。

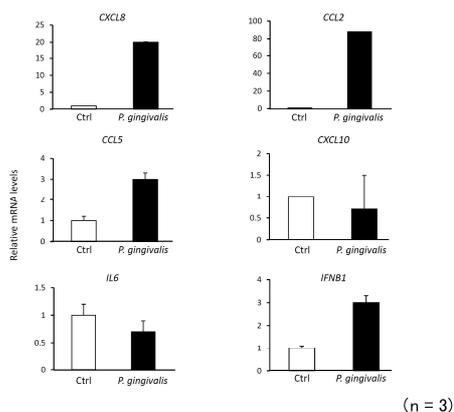
その結果、*P. gingivalis* は HUVEC に付着した (Figure 1A)。炎症巣や動脈硬化症巣では、TNF- α の発現量が上昇していることが報告されている。TNF- α の存在下では、*P. gingivalis* の HUVEC に対する付着能が増加した (Figure 1A)。さらに、*P. gingivalis* は細胞に侵入し、TNF- α の存在下では、*P. gingivalis* の HUVEC に対する侵入能が増加した (Figure 1B)。

Figure 1



(2) *P. gingivalis* は細胞応答を調節する
*P. gingivalis*はケモカインである *CXCL8*, *CCL2* および *CCL5*の発現を誘導した (Figure 2)。また *IFNB1* の発現を誘導した。一方で、*P. gingivalis* は、*CXCL10* および *IL6* の発現を誘導しなかった。

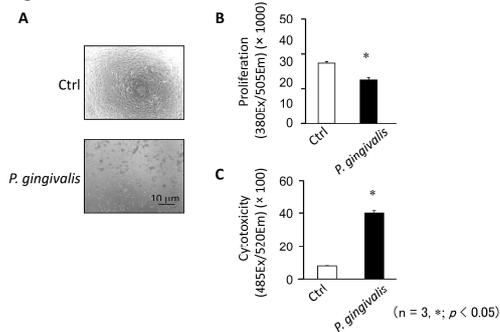
Figure 2



(3) *P. gingivalis* は細胞増殖を抑制し、細胞死を誘導する

P. gingivalis を作用させた HUVEC の形態を顕微鏡下で観察すると、丸く変形し、ディッシュから剥がれていた (Figure 3A)。*P. gingivalis* は細胞増殖を抑制した (Figure 3B)。一方で、*P. gingivalis* は、細胞死を誘導した (Figure 3C)。

Figure 3



以上の (1) ~ (3) の結果より、口腔細菌である *P. gingivalis* は宿主細胞に付着・侵入することが明らかになった。さらに、*P. gingivalis* は特定のケモカインや $IFN\beta$ の発現を誘導することが分かった。さらに、*P. gingivalis* は細胞増殖を抑制し、細胞死を誘導することが分かった。

今後の研究では、このような口腔細菌の宿

主への影響が唾液腺における抗菌因子の産生に寄与するのかどうかを調べる予定である。

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2件)

1. 猪俣恵, 引頭毅, 長谷川義明, 村上幸孝. リアルタイム定量 PCR による唾液からの口腔レンサ球菌種の検出. 岐阜歯科学会雑誌.41(2): 73-78 (2014): 査読有

2. Inomata M., Into T., Niida S., and Murakami Y.

Atg5 regulates formation of MyD88 condensed structures and MyD88-dependent signal transduction.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 437(4): 509-514 (2013) : 査読有

[doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.094](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.094)

[学会発表](計3件)

1. 猪俣恵, 引頭毅, 稲葉裕明, 堀江俊, 長谷川義明, 北井則行, 村上幸孝. *Porphyromonas gingivalis* の有する OmpA 様蛋白質の血管内皮細胞に及ぼす影響. 第 88 回日本細菌学会総会. 2015. 3. 26. 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)

2. 猪俣恵, 引頭毅, 稲葉裕明, 堀江俊, 北井則行, 村上幸孝. *Porphyromonas gingivalis* は OmpA 様蛋白質を介して血管内皮細胞に付着し細胞応答や細胞死を誘導する. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2014. 9. 27. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

3. 高橋らら, 高本将司, 落合宏樹, 猪俣恵, 稲葉裕明, 長谷川義明, 引頭毅, 村上幸孝. 原理の異なる唾液検査キットのミュータンスレンサ球菌検出能の比較. 2014. 6. 21. 第 179 回 岐阜歯科学会. 朝日大学 (岐阜県瑞穂市)

[図書](計 件)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

朝日大学歯学部口腔感染医療学講座口腔微生物学分野ホームページ

<http://scw.asahi-u.ac.jp/~bac/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪俣 恵 (INOMATA MEGUMI)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：40553798

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：