

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462795

研究課題名(和文) 歯周病原性細菌の宿主細胞への侵入におけるC型レクチン受容体の役割

研究課題名(英文) The role of C-type lectin receptors in invasion of periodontal pathogenic bacteria into host cells

研究代表者

玉井 利代子 (Tamai, Riyoko)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号：90367566

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)：本研究では、Porphyromonas gingivalis によるヒト歯肉上皮細胞の接着および侵入におけるガレクチン-1およびガレクチン-3の効果を調べた。両ガレクチンは P.gingivalis と同程度で結合した。さらに、組換えガレクチン-1は、同菌の接着および侵入を増加したが、ガレクチン-3による増加はなかった。Ca9-22細胞のガレクチン-3をノックダウンしたが、P.gingivalis 侵入の増減はなかった。以上の結果は、ガレクチン-1は細菌による宿主細胞への侵入を増強して感染症を悪化させる一方、ガレクチン-3は宿主細胞を感染から保護することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Galectin-1 and galectin-3, which are C-type lectin receptors, bind to lipopolysaccharide (LPS) and prevent LPS-induced cytokine production by mouse splenocytes. In this study, we investigated the effects of galectin-1 and galectin-3 on adhesion to and invasion of the human gingival epithelial cell line Ca9-22 by Porphyromonas gingivalis. Recombinant galectin-1, but not galectin-3, up-regulated P. gingivalis adhesion and invasion, although both galectins bound similarly to P. gingivalis. Flow cytometry also revealed that Ca9-22 cells express low levels of galectin-1 and moderate levels of galectin-3. Ca9-22 cells in which galectin-3 was knocked-down did not exhibit enhanced P. gingivalis invasion. These results suggest that galectin-1 may exacerbate infectious disease by enhancing the invasion of host cells by anaerobic bacteria, while galectin-3 protects host cells from infection.

研究分野：口腔微生物学・免疫学

キーワード：歯周病原性細菌 Porphyromonas gingivalis 侵入 C型レクチン受容体 galectin-1 galectin-3 galectin-4 galectin-7

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、口腔内に常在する特定の嫌気性細菌群によって引き起こされる感染症と考えられている。なかでも、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は慢性歯周炎患者の歯周ポケットから高頻度に検出されるが、同じ歯周ポケット内から検出される複数種の微生物によって歯周病を増悪することが推測できる。宿主の病態形成において、微生物の宿主細胞への侵入は重要である。歯周病においては、別の歯周病原性細菌 *Fusobacterium nucleatum* が *P. gingivalis* の歯肉上皮細胞への侵入を増加させる報告がある。しかしながら、混合感染を想定した歯周病原性細菌による宿主細胞への侵入機構の分子生物学的基盤の研究は緒についたばかりで、他菌種による歯周病原性細菌の侵入増加のメカニズムはまだ十分に解明されていない。

このメカニズムに関わる分子として、宿主細胞の膜上にある菌体認識レセプターの Toll-like receptor (TLR) や C 型レクチン受容体などが挙げられる。C 型レクチン受容体については近年急速に研究が進み、生体において様々な役割を果たしていることが分かっている。C 型レクチン受容体は、 α -ガラクトシドと結合する galectin-3 等を含む。同分子は、TLR2 単独では不可能な口腔常在真菌 *Candida albicans* と *Saccharomyces cerevisiae* の区別を行い、貪食細胞のファゴサイトーシスにおいても重要なレセプターである。また、galectin-3 と galectin-1 には、細胞外に分泌される可溶型と膜貫通型がある。微生物の宿主細胞への侵入と C 型レクチン受容体に関しては、可溶型 galectin-3 が髄膜炎菌の単球への付着を増加する結果が報告されている。そして、galectin-1 は原虫と HIV の侵入を促進する。一方、*P. gingivalis* の歯肉上皮細胞への侵入では接着分子 integrin 1 が重要な役割を担っているが、galectin-3 は integrin 1 に結合してエンドサイトーシスを促進する。以上の所見から、galectin-3 が歯周病原性細菌の宿主細胞への侵入に関与することが考えられるが、歯周病原性細菌と C 型レクチン受容体の関係を検討した研究はほとんどなかった。

C. albicans 菌体が *P. gingivalis* のヒト細胞への侵入増加を引き起こす結果から、その原因として、*C. albicans* 菌体認識によるシグナル伝達、すなわち、TLR2 または C 型レクチン受容体を介したシグナル伝達を考えた。そこで、菌体認識レセプターの発現と動態を検討した結果、ヒト歯肉上皮癌細胞における TLR2 の発現は弱いものの、galectin-3 を膜上に明確に発現しており、さらに同細胞による上清への galectin-3 の放出が *C. albicans* (生菌 MOI 1, 加熱死菌 MOI 100) によって増加していた。これらの

ことから、歯周病原性細菌の侵入における C 型レクチン受容体の役割を調べる本研究を着想した。

2. 研究の目的

C 型レクチン受容体ファミリーは、生体内で単球の走化を促進する、菌体成分を認識するなど、様々な役割を担っているが、細菌の宿主細胞侵入との関係については未だに不明な点が多い。

本研究では、歯周病原性細菌 *P. gingivalis* による歯周組織構成細胞をはじめとした宿主細胞への侵入機構と同菌侵入における C 型レクチン受容体の果たす役割を明らかにすることを目的として galectin による *P. gingivalis* 侵入増加作用と *P. gingivalis* 侵入にかかわる宿主細胞のタンパク質分子の動態ならびに関連する菌体成分について探索した。

3. 研究の方法

Galectin-3 と galectin-1 を中心に RNA 干渉法によるこれら C 型レクチン受容体欠損歯周組織構成細胞株またはリコンビナント galectin を用いて、galectin による *P. gingivalis* 侵入増加作用と *P. gingivalis* 侵入にかかわる宿主細胞のタンパク質分子の動態について検討した。

- (1) 歯周病原性細菌の培養：*P. gingivalis* は、ヘミンおよびメナジオンを添加した BHI 培地を用いて 37 嫌気的条件下で培養した。
- (2) ヒト細胞の培養：ヒト口腔上皮癌細胞である Ca9-22 は 10%ウシ血清を含む MEM 培地で継代培養したものをを用いた。
- (3) *P. gingivalis* の宿主細胞への侵入：無血清 MEM 中でリコンビナント galectin + *P. gingivalis* をインキュベーションで結合
1 時間, 37 , wash
リコンビナント galectin と結合した *P. gingivalis* と Ca9-22 細胞を共培養
90 分間, 37 , 5%CO₂, wash
メトロニダゾールとゲンタマイシンを含む培地で侵入しなかった *P. gingivalis* を除去
2 時間, 37 , 5%CO₂, wash
蒸留水を加えて、*P. gingivalis* を含む Ca9-22 細胞を溶解
20 分間, 室温
細胞溶解液を希釈後、ヘミン・メナジオン含有血液寒天培地に播種
6 日間, 37 , 嫌気培養
黒色コロニーを数え、希釈倍数をかけて算定した。そして、ポジティブコントロールである BSA と前培養した *P. gingivalis* の侵入数と比較した。
- (4) 細胞表面分子等の発現変化の検討：リコンビナント galectin をヒト細胞と無血清 MEM 培地下で培養して、菌体認識レセ

プターや転写因子の細胞表面または核内移行タンパク分子の発現変化の有無をフローサイトメトリー、ウエスタンブロット、またはELISA法で検討した。

- (5) *P. gingivalis* の細胞侵入抑制: (4) で発現変化がみられた宿主タンパク質に対する抗体または抑制剤を用い、これにより歯周組織構成細胞を前処理後、(3)と同様の実験を行い、リコンビナント galectin による *P. gingivalis* の宿主細胞への侵入増加に対する抑制の有無を検討した。
- (6) C型レクチン受容体欠損細胞の作製: 購入した siRNA を Ca9-22 細胞にトランスフェクションして、galectin-3 欠損歯周組織構成細胞を作製した。
- (7) C型レクチン受容体遺伝子ノックダウン宿主細胞株への細菌侵入の検討: 上記の(6)で作製した遺伝子ノックダウン宿主細胞株への *P. gingivalis* 侵入を(3)と同様に検討し、野生型宿主細胞における同菌の侵入数と比較した。

4. 研究成果

- (1) フローサイトメトリーで検討した結果、Ca9-22 細胞は galectin-3 を細胞表面に中等度発現していたが、galectin-1 は細胞膜上では低発現だった。また、galectin-1, galectin-3, galectin-7 は細胞質に存在した。しかしながら、galectin-4 は同細胞の膜上および細胞質中に存在しなかった。
- (2) リコンビナント galectin-1 または galectin-3 (10 µg/ml) 含有培地での 90 分間インキュベーションによる Ca9-22 細胞の Smad3 活性化は起こらなかった。
- (3) リコンビナント galectin-1 または galectin-3 (10 µg/ml) による Ca9-22 細胞の細胞傷害はみられなかった。
- (4) 抗 *P. gingivalis* 抗体を用いた ELISA で検討した結果、*P. gingivalis* はリコンビナント galectin-1, galectin-3, galectin-4 と結合した。そして、その吸光度(結合)はほぼ同程度だった。
- (5) 付着実験において、リコンビナント galectin-1 と結合させた *P. gingivalis* の Ca9-22 細胞への付着は、無血清と比較して有意に増加した。また、コントロールとして BSA を結合させた同菌でも同等の結果を得た。しかしながら、galectin-3 結合 *P. gingivalis* の同細胞への付着は増加しなかった。
- (6) リコンビナント galectin-3 結合 *P. gingivalis* の侵入は、BSA を結合させた同菌と比較して抑制され、未処理 *P. gingivalis* の侵入とはほぼ同等だった。
- (7) *P. gingivalis* の侵入は、核内タンパク質を増加させた。さらに、Ca9-22 細胞の転写因子 NF- B を活性化した。しかしながら、リコンビナント galectin-3 単独

では、同細胞の NF- B を活性化しなかった。

- (8) *P. gingivalis* の侵入は、Ca9-22 細胞の caspase-1 および caspase-8 を活性化したが、リコンビナント galectin-3 単独では、上記両カスパーゼの活性化を惹起しなかった。
- (9) *P. gingivalis* の侵入によって、Ca9-22 細胞の細胞質における galectin-1 は減少した。

以上の結果から、*P. gingivalis* の侵入における galectin-1 と galectin-3 の異なる役割が示唆された。すなわち、ヒト血清中に存在する galectin-1 は、*P. gingivalis* の宿主細胞への侵入を増加させるが、galectin-3 は同菌の侵入を阻害する可能性がある。

ヒトの口腔内では、700 種以上の細菌や真菌が検出されている。*Candida albicans* は *P. gingivalis* の侵入と Ca9-22 細胞からのガレクチン-3 分泌を増加することを前回示した。ガレクチン-1 は、上皮細胞、内皮細胞、活性化マクロファージ、活性化 B 細胞、活性化 T 細胞および CD4⁺CD25⁺調節性 T 細胞によって発現および分泌される。また、ガレクチン-3 は様々な細胞で発現される。感染症、動脈硬化、炎症および癌は、ガレクチン-1 およびガレクチン-3 の血清への放出を促進する。しかし、ガレクチン-1 とガレクチン-3 は、同様の親和性で T 細胞リガンドを認識するが、白血球生存率と IL-10 分泌の調節において異なる役割を果たす。

P. gingivalis の Ca9-22 細胞への侵入は、コレステロールが豊富な膜マイクロドメインであり、様々な微生物の侵入に必要な脂質ラフトに依存していることが報告されている。脂質ラフト成分の一つである GM1 ガングリオシドは、ガレクチン-1 と相互作用し、1 インテグリンと脂質ラフト依存性エンドサイトーシスの活性化を誘導する。したがって、脂質ラフトは、ガレクチン-1 による *P. gingivalis* の宿主細胞侵入増加において重要な役割を果たす可能性がある。また我々は、ガレクチン-3 の前処理が *P. gingivalis* の Ca9-22 細胞への接着および侵入を促進しないことも示した。ガレクチン-3 は、単球およびヒト単球 THP-1 細胞への髄膜炎菌の接着を増加させるが、髄膜炎菌によるこれらの細胞の侵入を増加しないことが報告されている。したがって、ガレクチン-3 は様々な微生物と結合し、宿主を生物から保護し、宿主細胞への感染を促進しない可能性がある。実際、ガレクチン-3 は、炎症応答を増強し、カンジダを死滅させることによって、播種性カンジダ症に対する保護において重要な役割を果たす。

我々は、ガレクチン-1 は、宿主細胞の細菌侵入を促進することによってグラム陰性細菌の感染性疾患を悪化させるが、ガレクチン-3 は、病原体を結合することによって宿主を感染から防御すると結論する。

得られた結果は、第59回歯科基礎医学会
総会・学術大会(2017年9月16-18日、松本
歯科大学キャンパス)で発表予定、まとめた
論文は投稿中である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

玉井 利代子(TAMAI, Riyoko)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号：90367566

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

清浦 有祐(KIYOURA, Yusuke)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：90194951

(4)研究協力者

小林 美智代(KOBAYASHI, Michiyo)

(平成27年4月から)