

機関番号：32650
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592150
 研究課題名（和文） 歯周病原性バイオフィルム形成因子の分子生物学的解析と機能性タンパク質による抑制
 研究課題名（英文） Molecular biological analysis of periodontopathic biofilm formation and its restraints by functional proteins
 研究代表者
 加藤 哲男（KATO TETSUO）
 東京歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号：00159253

研究成果の概要（和文）：歯周病は口腔の主要な感染症であり、その原因となっているのは口腔内バイオフィルムであるデンタル・プラーク中に存在する細菌である。本研究は、歯周病原性バイオフィルムの形成に関わる因子について解析するとともに、その形成を抑制あるいはバイオフィルム細菌に対して抗菌性を発揮するような機能性タンパク質について検索した。培養細胞やマウスを用いて、シスタチンやガレクチンなどの機能性タンパク質のバイオフィルム形成抑制作用や内毒素活性抑制作用などを解明した。

研究成果の概要（英文）：Dental plaque, a microbial biofilm formed by multiple organisms tightly adhered to the tooth surface, plays a key role in the development of periodontal disease. The effect of functional proteins on the periodontopathic biofilm formation was determined using the flat bottom of 96-well cell culture plates. Cystatin significantly inhibited biofilm formation by some periodontopathic bacterial strains. Galectins markedly suppressed IL-6 induction in human umbilical vascular endothelial cells by periodontopathic bacterial endotoxin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：細菌、歯学、歯周病、バイオフィルム、機能性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

（1）歯周病は口腔の主要な感染症であり、その原因となっているのは口腔内バイオフィルムであるデンタル・プラーク中に存在する細菌である。中でも *Porphyromonas gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* などのグラム陰性菌は病巣から高頻度に分離されており、歯周病の発症に深く関連している。これらの病原菌は、バイオフィルムという細菌集団を形成し、歯周病という感染症を引き起こす。そのため、

歯周病予防の方策を確立するためにも、バイオフィルムを標的として検討していく必要がある。

（2）近年、歯周病原細菌が心血管系の疾患など多くの全身疾患にも関連していることが示唆されてきており、全身の健康のためにも口腔ケアの必要性が強調されるようになってきた。唾液中の抗菌性を示す機能性タンパク質は歯周病原細菌感染に防御的にはたらき、宿主の自然免疫に関与するなど、重要なはたらきを担っていることが示されてい

る。

2. 研究の目的

歯周病は、口腔内バイオフィームであるデンタル・プラーク中に存在する細菌が原因となる感染症である。歯周病予防の方策を確立するためには、バイオフィームを標的として検討していく必要がある。歯周病原細菌が多くの全身疾患にも関連していることが示され、全身の健康のためにも口腔ケアの必要性が強調されるようになってきた。

口腔感染症の原因となる細菌が実際に生息するのは、口腔内に形成されるバイオフィームであることを考慮し、歯周病原細菌バイオフィームをその研究対象とした。バイオフィーム形成に関わる因子について解析し、さらには歯周病原因子との関わりについて解析を行った。またバイオフィームモデルあるいは、培養細胞やマウスを用いて、機能性タンパク質のバイオフィーム形成抑制作用や抗菌性および宿主免疫応答における役割を解明した。機能性タンパク質としては、今までのデータが蓄積しているシスタチンおよびヒスタチンに加えて、生体で重要なはたらきをしているガレクチンについてもその多彩な機能を解析した。ガレクチンは、発生や分化に関わるだけでなく、感染防御でも重要な役割を担っているβガラクトシドに特異性のあるレクチンであり、大きく3つのファミリーに分けることができる。そのうちガレクチン-3は、サルモネラなどの内毒素に作用することが報告されている。これらのガレクチンを含めた機能性タンパク質の歯周病原細菌内毒素などの病原因子に対する抑制作用だけではなく、バイオフィーム形成抑制作用についても明らかにした。

3. 研究の方法

歯周病は、口腔内バイオフィームであるデンタル・プラーク中に存在する細菌が原因となる感染症である。本研究では、バイオフィーム形成に関わる因子について解析し、さらには歯周病原因子との関わりについて解析を行った。バイオフィームモデル、培養細胞やマウスを用いて、機能性タンパク質のバイオフィーム形成抑制作用や抗菌性および宿主免疫応答における役割を検討した。

(1) 日本産ウナギ上皮から精製したガレクチンを用いて、歯周病原細菌バイオフィーム形成に対する阻害効果を検討した。日本産ウナギ (*Anguilla japonica*) 体表上皮から分離・精製したレクチン AJL-1 を用いた。96-well plate 上で、単一菌からなるバイオフィーム形成への AJL-1 の影響を検討した。AJL-1 を含む培地に、前培養菌を接種し、嫌気培養後、クリスタル紫染色法によってバイオフィーム形成量を測定した。また浮遊細菌

を用いて、ATP 量測定法によって抗菌活性を検討した。またバイオフィーム形成抑制効果のみられた *A. actinomycetemcomitans* の LPS に対する阻害効果を調べた

(2) ガレクチンは、多彩な機能をもつレクチンであり、生体防御にもかかわっている。ガレクチン-3 が *A. actinomycetemcomitans* LPS (lipopolysaccharide) の炎症性サイトカイン誘導活性を阻害するか否かマウス脾細胞を用いて検討した。月齢の異なる (1ヶ月齢、7ヶ月齢) C57BL/6 および C57BL/6 (ApoE(-/-)) から調整した脾細胞を用いた。培養液に *A. actinomycetemcomitans* Y4 から精製した LPS 単独あるいは LPS とマウスガレクチン-3 を同時に加え脾細胞を培養し、17時間後の培養上清中の IL-6 および IFN γ 量を ELISA キットで測定した。

(3) LPS のヒト培養細胞からの炎症性サイトカイン誘導能に対するガレクチン-3 の抑制効果について検討した。また生活習慣病の病因としてのアルコールおよびニコチンのガレクチン-3 産生への影響も検討した。ヒト正常臍帯静脈血管内皮細胞あるいはヒト正常大動脈内皮細胞の培養液に *A. actinomycetemcomitans* Y4 株から精製した LPS (10 ng/ml) 単独あるいは LPS とヒトガレクチン-3 (10 μ g/ml) を同時に加え細胞を培養し、17時間後の培養上清中の IL-6 および IL-8 量を ELISA キットで測定した。また培養液にエタノール (0.01-0.1%) あるいはニコチン (1.25-125 μ g/well) を加え、産生されるガレクチン-3 量を ELISA キットで測定した。さらにエタノール添加細胞における LPS 刺激による IL-6 産生について検討した。

(4) シスタチンは、動物の体液などに存在するシステインプロテアーゼインヒビターであり、骨吸収や組織の炎症などを調節したり、癌細胞の浸潤と転移を抑制したりすることが知られている。動物由来のシスタチンは、大きく3つのファミリーに分けられており、ヒトの唾液中に存在するファミリー-2 シスタチンは、歯周病原細菌 *P. gingivalis* の増殖を抑制することが報告されている。本研究では、唾液に含まれるシスタチン SA の *P. gingivalis* および *A.*

actinomycetemcomitans 増殖に対する抑制効果について検討した。*P. gingivalis* 5株および *A. actinomycetemcomitans* 5株を、それぞれヘミンおよびメナジオンあるいは yeast extract を含む Trypticase soy broth を用いて 24時間嫌気条件下で前培養した。発育菌体を5等分し、それぞれに新しい培地を加えた。そのうちの4本にシスタチン SA1 あるいはシスタチン SA2 を 1.0 μ g/ml、10 μ g/ml ずつ加え、1本はコントロールとした。その後嫌気培養を続け、増殖の状態を ATP 活性によって確認し、24時間後の増殖菌量を

660 nm の吸光度測定により調べた。同様の実験を 5 回くり返し、その平均で評価した。

4. 研究成果

(1) ウナギガレクチン AJL-1 は、*A. actinomycetemcomitans* 全供試菌株に対して濃度依存的に有意にバイオフィーム形成を抑制した ($p < 0.05$) (図 1)。しかし、その他の供試菌に対しては有意な抑制はみられなかった。バイオフィーム形成抑制効果のみられた *A. actinomycetemcomitans* の LPS に対する阻害効果を調べた結果、AJL-1 は LPS 刺激によるヒト正常臍帯静脈血管内皮細胞からの IL-6 ($p < 0.01$) および IL-8 ($p < 0.05$) 産生誘導を有意に抑制することがわかった。

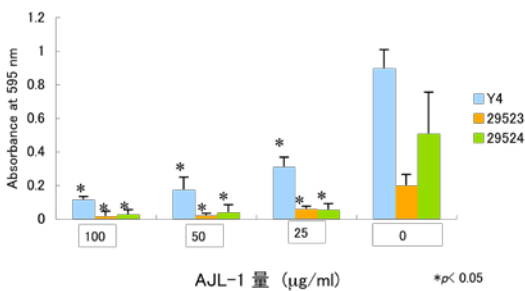


図 1 : ウナギガレクチン AJL-1 の *A. actinomycetemcomitans* バイオフィーム形成抑制効果

(2) ガレクチン-3 は、1 ヶ月齢のマウス脾細胞では、LPS のサイトカイン誘導活性を抑制したが、7 ヶ月齢マウスの場合には、抑制効果がみられず、加齢に伴いその応答が変化した (図 2)。また刺激前のサイトカインレベルは、1 ヶ月齢よりも 7 ヶ月齢の方が有意 ($p < 0.05$) に高かった。ApoE (-/-) マウスでも、同様の結果だった。

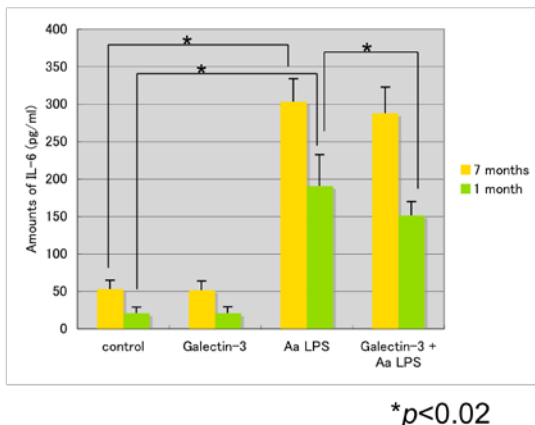
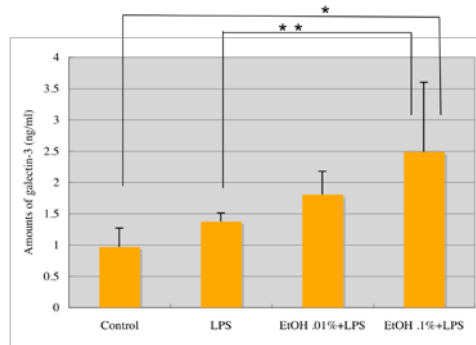


図 2 : LPS 刺激によって C57BL/6 マウス脾細胞から誘導される IL-6 産生におよぼすガレクチン-3 の影響

(3) ヒト正常臍帯静脈血管内皮細胞あるいはヒト正常大動脈内皮細胞を使った実験でも、*A. actinomycetemcomitans* LPS 刺激によるサイトカイン IL-6 産生誘導はガレクチン-3 によって抑制された。しかし、ガレクチン-4 は、その誘導活性を助長し、炎症の増悪因子となることが示唆された。

エタノールは濃度依存的にガレクチン-3 産生量を増加させる (図 3) とともに、LPS によるサイトカイン産生誘導を抑制した (図 4)。エタノールによるサイトカイン産生の抑制は、抗-ヒトガレクチン-3 抗体を加えることによってみられなくなった。ニコチンは、用いた細胞からのガレクチン-3 産生には影響しなかった。ガレクチン-3 は、*A. actinomycetemcomitans* LPS に結合し、その炎症性サイトカイン誘導活性を抑制するものと思われる。またエタノールは、内皮細胞からのガレクチン-3 産生を促進し、そのため LPS の炎症性サイトカイン誘導が抑制されることが示唆された。



*: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$ Tukey's multiple comparison test

図 3 : エタノールのガレクチン-3 産生におよぼす影響

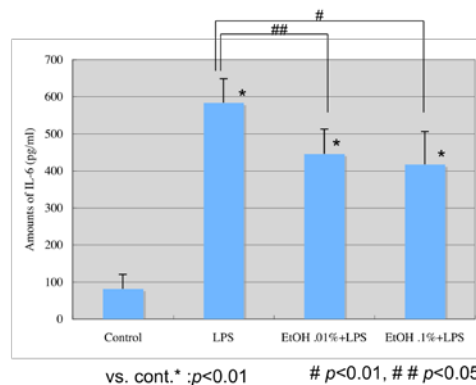


図 4 : LPS の IL-6 産生誘導能に対するエタノールの影響

(4) シスタチン SA1 および SA2 とも、1.0 µg/ml では供試菌の増殖に対して顕著な影響

を与えなかった。しかし 10 µg/ml では、供試した *A. actinomycetemcomitans* 全菌株に対して (図 5)、また *P. gingivalis* 3 株に対して増殖抑制効果を示した。本抑制効果は、シスタチン SA1 の方が SA2 よりも強かった。供試した両シスタチンとも *P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* 増殖に対して抑制効果を示した。しかし、供試した *P. gingivalis* の菌株の中には増殖を抑制されないものもあり、その違いが本菌の有しているタンパク質分解酵素活性の違いによるのかなど検討していく必要がある。またシスタチン SA2 は、SA1 と構成アミノ酸が 2 カ所異なる variant であるが、本増殖抑制効果は SA1 よりも弱かった。

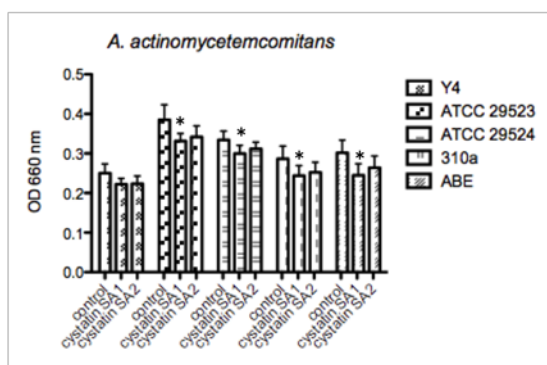


図 5 : シスタチン SA の増殖抑制効果

以上の成果から、歯周病原性バイオフィーム形成におよぼすシスタチンなどの唾液タンパク質およびガレクチンなどの機能性タンパク質の抑制効果について明らかにすることができた。またそれらのタンパク質は、歯周病原細菌に直接作用する効果だけではなく、それらの細菌が有する代表的な病原因子である内毒素 LPS に対しても抑制効果を示すことが明らかになった。これらの成果をもとにして、機能性タンパク質の歯周病予防への応用へと研究を展開して行けるであろう。

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 11 件)

- ① Ito, T., Komiya-Ito, A., Arataki, T., Furuya, Y., Yajima, Y., Yamada, S., Okuda, K. and Kato, T. Relationship between antimicrobial protein levels in whole saliva and periodontitis, J. Periodontol. 査読有, 79: 316-322, 2008.
- ② Makino, A., Yamada, S., Okuda, K. and Kato, T. Nicotine involved in periodontal disease through influence on cytokine levels, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 査読有, 52: 282-286, 2008.
- ③ Yamanaka-Okada, A., Sato, E., Kouchi,

T., Kimizuka, R., Kato, T. and Okuda, K. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on cariogenic bacteria, Bull. Tokyo Dent. Coll. 査読有, 49: 107-112, 2008.

④ Kimizuka, R., Kato, T., Hashimoto, S., Yamanaka-Okada, A., Okuda, K. and Ishihara, K. Congo red-binding protein in rough-phenotype *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is amyloid-like fiber, Bull. Tokyo Dent. Coll. 査読有, 50: 23-29, 2009.

⑤ Takayama, S., Saitoh, E., Kimizuka, R., Yamada, S. and Kato, T. Effect of eel galectin AJL-1 on periodontopathic bacterial biofilm formation and their lipopolysaccharide-mediated inflammatory cytokine induction, Int. J. Antimicrob. Agents, 査読有 34: 355-359, 2009.

⑥ Kato, T., Uzawa, A. and Ishihara, K. Inhibitory effect of galectin-3 on cytokine-inducing activity of periodontopathic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* endotoxin in splenocytes derived from mice, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 査読有, 57: 40-45, 2009.

⑦ Yoshinari, M., Kato, T., Matsuzaka, K., Hayakawa, T., and Shiba, K. Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides, Biofouling, 査読有 26: 103-110, 2010.

⑧ Yamada, K., Yama, M., Takaku, Y., Kakizawa, T., Kimizuka, R., Okuda, K. and Kato, T. Antimicrobial activity of super-oxidised water against oral microorganisms, Arch. Oral Biol. 査読有, 55: 397-400, 2010.

⑨ Komiya-Ito, A., Ishihara, K., Tomita, S., Kato, T. and Yamada, S. Investigation of subgingival profile of periodontopathic bacteria using polymerase chain reaction, Bull. Tokyo Dent. Coll. 査読有, 51: 139-144, 2010.

⑩ Kukidome, N., Amagai, T., Osuka, K., Kato, J., Hirai, Y., Kato, T. and Aida, S. Bactericidal effects of 2.94 µm and 1.67 µm laser, Bull. Tokyo Dent. Coll. 査読有, 51: 185-192, 2010.

⑪ Miura, T., Iohara, K., Kato, T., Ishihara, K. and Yoshinari, M. Basic peptide protamine exerts antimicrobial activity against periodontopathic bacteria, J. Biomed. Sci. Engi. 査読有, 3: 1069-1072, 2010.

〔学会発表〕(計14件)

(1) 国際学会

- ① Takayama, S., Kimizuka, R., Saitoh, E., Yamada, S., Okuda, K. and Kato, T. Antibacterial effects of eel galectin on periodontopathic bacteria, J. Dent. Res. 87 (Special Issue A), CD-ROM1396, 2008. (86th general session of the International Association for Dental Research, Toronto) 2008年7月4日
- ② Kimizuka, R., Kato, T. and Ishihara, K. Identification of amyloid-like fiber in rough-phenotype *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, J. Dent. Res. 89 (Special Issue B), abstract2626, 2010. (88th general session of the International Association for Dental Research, Barcelona) 2010年7月16日
- ③ Kato, T., Kimizuka, R. and Ishihara, K. Effect of ethanol on galectin-3 production by human endothelial cells, J. Dent. Res. 89 (Special Issue B), abstract4832, 2010. (88th general session of the International Association for Dental Research, Barcelona) 2010年7月17日

(2) 国内学会

- ① 高山沙織、加藤哲男、君塚隆太、小川貴也、奥田克爾、山田 了、ウナギガレクチンの歯周病予防における有効性、歯科学報、108: 182, 2008. (第285回東京歯科大学学会例会、千葉) 2008年6月7日
- ② 加藤哲男、高山沙織、君塚隆太、石原和幸、歯周病原細菌 LPS のサイトカイン誘導に対するガレクチンの影響、J. Oral Biosci. 50(Supple.): 205, 2008. (第50回歯科基礎医学会総会、東京) 2008年9月25日
- ③ 君塚隆太、加藤哲男、岡田あゆみ、橋本貞充、石原和幸、Rough 型 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* はアミロイド様物質を形成する、J. Oral Biosci. 50(Supple.): 213, 2008. (第50回歯科基礎医学会総会、東京) 2008年9月25日
- ④ 君塚隆太、加藤哲男、石原和幸、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* rough 型集落形成株のアミロイド形成、日細菌誌、64: 185, 2009. (第82回日本細菌学会総会、名古屋) 2009年3月13日
- ⑤ 加藤哲男、高山沙織、君塚隆太、石原和幸、歯周病原細菌 LPS の炎症性サイトカイン誘導能に対するガレクチン-3 の抑制効果、歯科学報、109: 243, 2009. (第287回東京歯科大学学会例会、千葉) 2009年6月6日
- ⑥ 加藤哲男、君塚隆太、石原和幸、ヒト内皮細胞のガレクチン-3 産生におよぼすエ

- タノールの影響、J. Oral Biosci. 51(Supple.): 134, 2009. (第51回歯科基礎医学会総会、新潟) 2009年9月11日
- ⑦ 平井 要、菊池有一郎、上田青海、柴田幸永、大久保裕一郎、平岡行博、加藤哲男、石原和幸、藤村節夫、黄色ブドウ球菌 V8 プロテアーゼによる A549 細胞からの IL-8 の誘導、日細菌誌、65: 194, 2010. (第83回日本細菌学会総会、横浜) 2010年3月27日
- ⑧ 加藤哲男、小澤 誠、石原和幸、斎藤英一、シスタチン SA の *Porphyromonas gingivalis* および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* における増殖抑制、歯科学報、110: 385, 2010. (東京歯科大学創立120周年記念学術講演会 第289回東京歯科大学学会、東京) 2010年5月8日
- ⑨ 君塚隆太、加藤哲男、石原和幸、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* rough 型集落形成株のアミロイド様物質産生、歯科学報、110: 429, 2010. (東京歯科大学創立120周年記念学術講演会 第289回東京歯科大学学会、東京) 2010年5月8日
- ⑩ 平井 要、菊池有一郎、上田青海、柴田幸永、平岡行博、加藤哲男、石原和幸、藤村節夫、黄色ブドウ球菌 V8 プロテアーゼ刺激による A549 細胞の IL-8 産生、J. Oral Biosci. 52(Supple.): 183, 2010. (第52回歯科基礎医学会総会、東京) 2010年9月22日
- ⑪ 小田貴士、西村孝太、伊藤太一、加藤哲男、吉成正雄、矢島安朝、チタンインプラント埋入時の免疫応答 - サイトカインプロファイル -、歯科学報、110: 493, 2010. (第290回東京歯科大学学会総会、千葉) 2010年10月16日

〔図書〕(計1件)

- ① 奥田克爾、石原和幸、加藤哲男 (共著)、最新口腔微生物学、一世出版、総ページ数 477、2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 哲男 (KATO TETSUO)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：00159253

(2) 研究分担者

君塚 隆太 (KIMIZUKA RYUTA)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：90287178