

機関番号：31602

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791795

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真菌の増悪効果に関する分子生物学的研究

研究課題名 (英文) Molecular biological studies on the effect of *Candida albicans* on invasion of host cells by periodontopathic bacteria.

研究代表者

玉井 利代子 (TAMAI RIYOKO)

奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号：90367566

研究成果の概要 (和文)：口腔常在の真菌である *Candida albicans* 加熱死菌 (HKCA) または *C. albicans* から抽出された水溶性マンナン・グルカン複合体 (CAWS) による、歯肉癌上皮細胞と歯肉線維芽細胞の接着分子 $\beta 1$ インテグリンと ICAM-1 発現の増強はみられなかった。さらに、HKCA または CAWS による前処理による歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* の、歯肉癌上皮細胞と歯肉線維芽細胞への接着の増加はなかった。しかしながら、HKCA または CAWS による前処理によって、*P. gingivalis* の宿主細胞への侵入が著しく増加した。

研究成果の概要 (英文)：Heat-killed *Candida albicans* (HKCA) and water-soluble mannoprotein- β -glucan complex from *C. albicans* (CAWS) did not up-regulate adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts and expression of $\beta 1$ integrin and ICAM-1, which are required for *P. gingivalis* invasion, on the cells. However, HKCA and CAWS promoted invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by *P. gingivalis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：歯周病原性細菌, *Porphyromonas gingivalis*, 侵入, *Candida albicans*, 歯周病, 混合感染

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。そして、*Porphyromonas 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。一方、*Candida albicans* は口腔においても常在する病原性の弱い真菌だが、口腔カンジダ症などの日和見感染症を引き起こす。また、同真

菌は歯肉縁下プラークからも検出される。さらに、共凝集やバイオフィルム形成・増殖における歯周病原性細菌と *C. albicans* 間の相互作用の報告が多数ある。そこで、同じ歯周ポケット内から検出される複数種の微生物が、他菌種の歯周組織構成細胞への侵入に影響を与えることにより歯周病を増悪することが考えられる。これまでに、*P. gingivalis* の外膜小胞体が別菌種の歯周病

原性細菌 *Tannerella forsythia* の歯肉上皮細胞への付着および侵入を増強する報告があった。しかしながら、ヒト細胞への侵入における細菌と真菌の相互作用についての報告はなかった。一方、宿主細胞の応答に関しては、*C. albicans* 生菌または死菌が LPS に対する宿主細胞の反応を高め、致死率を上げることがマウスの *in vivo* 実験で明らかになっていた。また、共凝集やバイオフィーム形成・増殖における歯周病原性細菌と *C. albicans* 間の相互作用の報告はあったが、宿主細胞への侵入における相互作用についての研究は行われていなかった。申請者は、以前、*P. gingivalis* および口腔トレボネマの口腔上皮細胞への侵入に、接着分子である ICAM-1 が関与することを示唆した。また、細胞膜上の ICAM-1 は菌体成分認識レセプター Toll-like receptors (TLRs) のシグナル伝達によって発現が増強する。さらに、真菌の細胞壁に含まれる β グルカンのレセプターである dectin-1 は TLRs シグナル伝達と共に相乗的なサイトカイン産生を誘導する。以上のことから、先に述べた菌体成分によるシグナル伝達が *P. gingivalis* の歯周組織構成細胞侵入を増強する可能性があるため検討した。また、歯周組織構成細胞、すなわち口腔上皮細胞、歯肉線維芽細胞および歯根膜線維芽細胞が TLRs を発現することは申請者を含め多数の研究者が報告していたが、歯周組織構成細胞上の dectin-1 など C-type レクチンレセプターファミリーの発現は検討されていなかったため合わせて調べた。

2. 研究の目的

本研究は、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 *C. albicans* またはその菌体成分による *P. gingivalis* の侵入増強メカニズムを明らかにすることを目的として、これら微生物の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するものである。

3. 研究の方法

(1) 病原性の強さと宿主細胞への侵入は比例する報告が多いので、高齢者の口腔から採取した *C. albicans* の病原性を始めに検討する。すなわち、*C. albicans* 加熱死菌で前培養した細胞の、Pam₃CSK₄ または lipid A (細菌菌体成分の合成品) によるサイトカイン産生を ELISA 法で定量して *C. albicans* 前処理の効果を調べる。

(2) (1) で病原性が強いとみとめられた *C. albicans* の加熱死菌または同菌から抽出した菌体成分である水溶性マンナン・グルカン複合体 (CAWS) でヒト歯周組織構成細胞 (歯肉

癌由来上皮細胞 Ca9-22 と歯周病患者由来歯肉線維芽細胞) を前処理した後 *P. gingivalis* を上記のヒト細胞と共培養する。90 分後、化学療法薬を含む培養液で宿主細胞外の細菌を除去し、蒸留水で培養細胞を溶解、同溶解液を希釈後、選択培地に播種し 7 日間嫌気培養する。生えてきた *P. gingivalis* の黒色コロニー数に希釈倍数をかけ *P. gingivalis* の宿主細胞への侵入数として、*C. albicans* による前処理なしのサンプルと比較して、*C. albicans* 前処理の、*P. gingivalis* による宿主細胞への侵入に対する効果を検討する。

(3) ヒト歯周組織構成細胞上の dectin-1 など真菌に関与する C-type レクチンレセプターファミリーの発現をフローサイトメトリーで検討する。

(4) *C. albicans* またはその菌体成分によるヒト歯周組織構成細胞をはじめとした宿主細胞の細胞表面分子の発現変化についてフローサイトメトリーまたは ELISA で検討する。さらに、発現変化がみられたタンパク質の遺伝子ノックダウン宿主細胞株を作製し、*P. gingivalis* の細胞侵入に及ぼす影響について調べる。

4. 研究成果

(1) 高齢者の口腔から採取した *C. albicans* の加熱死菌 (HKCA) で前培養したマウスマクロファージ様細胞 J774.1 の Pam₃CSK₄ または lipid A による MCP-1, IL-6 および TNF- α 産生は、前処理しなかった細胞と比較して、*C. albicans* の濃度依存的に増加した。この結果から、採取した *C. albicans* の病原性は強く、*P. gingivalis* の侵入に影響を与える可能性が考えられた。

(2) HKCA (MOI100) または CAWS (10 μ g/ml) の前培養によって、ヒト歯肉線維芽細胞への *P. gingivalis* の侵入が有意に増加した (図 1, 図 2)。

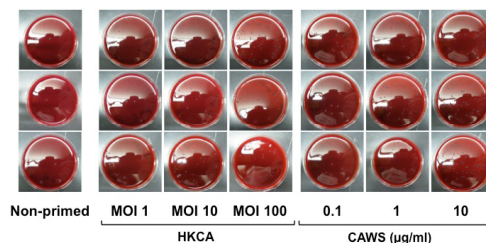


図 1 : *P. gingivalis* 侵入実験の結果。ヘミン・メナジオン含有血液寒天培地上の黒いコロニーが *P. gingivalis* である。

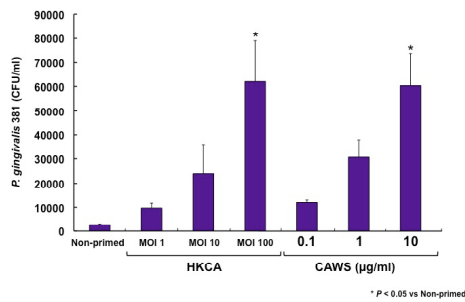


図2：図1の結果に希釈倍率をかけた後の数値をグラフにした。

(3) しかしながら、HKCA および CAWS によるヒト歯肉線維芽細胞の ICAM-1 発現増強はなかった(図3)。Ca9-22 細胞でも同様の結果だった。

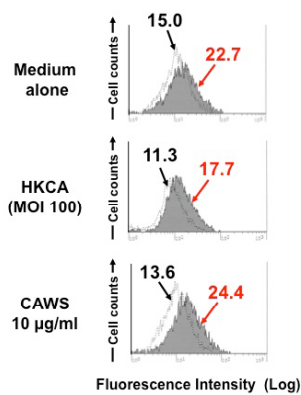


図3：HKCA または CAWS 含有培地で3時間、ヒト歯肉線維芽細胞を培養後フローサイトメトリーで ICAM-1 発現を検討した。ICAM-1 は *P. gingivalis* の宿主細胞への侵入に関与する接着分子である。黒いエリア(赤字)が ICAM-1, 点線(黒字)はネガティブコントロール。

(4) HKCA によるヒト歯肉線維芽細胞の Rac1 活性化増強がみられたが、Rac1 抑制剤による *P. gingivalis* の侵入増強への抑制はみられなかった。

(5) ヒト歯肉線維芽細胞は dectin-1 を発現していた(図4)。一方、dectin-2 発現はほとんどみられなかった。

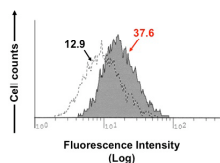


図4：ヒト歯肉線維芽細胞の dectin-1 発現。黒いエリア(赤字)が dectin-1, 点線(黒字)はネガティブコントロール。

(6) HKCA (MOI100) または CAWS (10 µg/ml) の前培養によって、歯肉癌上皮細胞 Ca9-22 への *P. gingivalis* の侵入が有意に増加した。

(7) しかしながら、HKCA および CAWS による Ca9-22 細胞の β1 インテグリン発現増強はなかった。β1 インテグリンは、ICAM-1 同様、*P. gingivalis* の宿主細胞への侵入に関与する接着分子である。ヒト歯肉線維芽細胞でも HKCA および CAWS による同分子の発現増強はみられなかった。

(8) (3) と (7) の結果から、HKCA または CAWS による前処理による *P. gingivalis* の Ca9-22 細胞または歯肉線維芽細胞への接着の増加があるか否か検討した。その結果、HKCA または CAWS による前処理は、*P. gingivalis* の Ca9-22 細胞または歯肉線維芽細胞への接着を増加することはなかった。

(9) Ca9-22 細胞は dectin-1 をわずかに発現していたが、dectin-2 発現はほとんどみられなかった。

以上の結果から、*C. albicans* は、*P. gingivalis* の宿主細胞への侵入を増加することによって、歯周病を増悪することが考えられる。

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)

[学会発表] (計3件)

- (1) 玉井利代子, 杉山明子, 清浦有祐. *Candida albicans* による、ヒト歯肉線維芽細胞への *Porphyromonas gingivalis* の侵入菌数の増加. 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2010年9月21日, タワーホール船堀(東京都)
- (2) 玉井利代子, 清浦有祐. The effect of heat-killed *Candida albicans* on the response of macrophages to bacterial components. 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月27日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- (3) 玉井利代子, 清浦有祐. 菌体成分に対する宿主細胞の反応における真菌の増悪効果に関する研究. 第52回秋期日本歯周病学会学術大会, 2009年10月11日, 宮崎観光ホテル(宮崎県)

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・助教

研究者番号：90367566

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：