

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462962

研究課題名(和文)オートインデューサーの分解を機作とした口腔バイオフィルム形成制御に関する研究

研究課題名(英文) Study of the effects of serine proteases on the cariogenicity of *Streptococcus mutans*

研究代表者

尾崎 和美 (OZAKI, Kazumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：90214121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、オートインデューサーを分解する酵素の *Streptococcus mutans* のう蝕原性に対する効果を解析した。トリプシンおよび rHtrA は *S. mutans* の増殖およびガラス管壁への付着を抑制し、さらに菌体内外多糖の合成を抑制する傾向を示した。これらの結果は、オートインデューサー分解酵素の *S. mutans* に対する抗菌活性およびバイオフィルム形成抑制効果を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the effect of the enzymes, which digest autoinducers, on the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Trypsin and rHtrA were tended to inhibit bacterial growth and the adherence of *S. mutans* to a glass test tube, furthermore, suppress biosynthesis of intra/extra-cellular polysaccharide in comparison with negative control. These results suggested that these enzymes will be able to exhibit antibacterial activities and inhibit biofilm formation by *S. mutans*.

研究分野：歯科保存学

キーワード：バイオフィルム クオラムセンシング オートインデューサー

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、独自に開発した *in vitro* 齧蝕誘発モデルなどで作製したバイオフィルム試料を超微細形態学的に分析し、セメント質齧蝕および根面象牙質齧蝕における“菌体内多糖保有細菌”の存在の重要性あるいは象牙細管への細菌侵入という観点から、*S. mutans* の存在および *S. mutans* が合成する菌体内外多糖の重要性を明らかにした。さらに、グルカン合成酵素関連遺伝子 (*gtfB/C/D gene* など) あるいはクオラムセンシング関連遺伝子 (*comC/D/E/X gene* 等) の発現が、バイオフィルムの性質、例えば歯面への付着能や形成量あるいは象牙細管への侵入能に影響を与えることを示した。

クオラムセンシングは、ある一定以上の菌体密度に到達したことを細菌自らが産生し拡散させたオートインデューサーと呼ばれるシグナル物質の濃度増加として感知し、特定遺伝子の転写活性を制御する機構である^①。この機構が解明されつつある近年、オートインデューサーによる細菌間の情報伝達が、毒素産生や抗菌薬の抵抗性あるいはバイオフィルム形成といった病原性の発現に影響を与えることが明らかになってきた。ゆえに、形成途上のバイオフィルムなど細菌の集合体 (コミュニティ) におけるオートインデューサーの濃度を制御することが可能になればクオラムセンシングを制御でき、ひいては病原性発現の制御に繋がる可能性が高く、実際、グラム陰性菌のオートインデューサー (AHL) については、人工合成の構造類似体による競合阻害や AHL 分解酵素によるバイオフィルムの形成制御が試みられている。一方、グラム陽性菌のクオラムセンシングも明らかにされつつあり、オートインデューサーとして CSP (Competence Stimulating Peptide) が見出され、さらにグラム陽性菌の菌体表層に存在する HtrA protease (serine protease) が CSP を分解する能力を有することが、最近

報告されている^②。そこで、種々の serine protease を用いてオートインデューサー (CSP) を分解し、バイオフィルム内の CSP の濃度を減少させることができれば、構成細菌の機能制御を含む口腔バイオフィルムの形成抑制が可能になるのではないかと考え、これが本研究課題の着想につながった。

2. 研究の目的

本研究では、グラム陽性菌のオートインデューサーを分解する可能性のある種々の serine protease に着目し、これが *S. mutans* の齧蝕原性に与える影響を下記の観点から多面的に解析した。

- (1) 増殖速度および付着率
- (2) 菌体内外多糖合成能
- (3) バイオフィルム形成関連遺伝子の発現

3. 研究の方法

- (1) 増殖速度および付着率

①培養条件

前培養した *S. mutans* UA159 株を生理食塩水にて一定濃度 (約 1×10^6 CFU/ml) に調製後、種々の serine protease (trypsin あるいは rHtrA) とともに培養プレート (24 穴もしくは 96 穴) に添加し、Brain Heart Infusion Broth (Becton, Dickinson and Company, 以下 BHI) を用いて 37°C にて嫌気培養した。菌体内外多糖合成能の解析では、象牙質板を 0.25% Sucrose 添加 BHI 中に浸漬してバイオフィルムを形成させた。また解析目的に応じてセリンプロテアーゼ阻害剤 (PMSF) を培地中に添加した。

②増殖速度および付着率の測定

(1) ①の培養において、*S. mutans* UA159 株の添加直後からの濁度をマイクロプレートリーダー (iMark™, Bio-Rad) で測定することで増殖速度を測定し、ガラス管壁への *S. mutans* の付着率を Hamada^③らの方法に準じて測定した。

(2) 菌体内外多糖合成能の検証

①非水溶性／水溶性グルカン合成量の測定

0.25% Sucrose および trypsin などを添加し培養を終えた *S. mutans* の懸濁液より、培地と象牙質試料を別々に処理し、フェノール硫酸法^④によるグルカン量の測定に供した。

②菌体内外多糖に関する超微形態学的解析

(1) ①において象牙質板上に形成されたバイオフィルムをアルデヒドおよびオスミウムで二重固定した後、通法に従い Epoxy 樹脂に包埋し超薄切片を作製した。この切片に対し過ヨウ素酸-チオカルボヒドラジド-蛋白銀染色（菌体内外多糖特異的電子染色）を施行し透過型電子顕微鏡（TEM）にて観察することで口腔細菌の菌体内外多糖の産生状況を解析した。またバイオフィルムの立体構造を解析するべく、フェロシアン化カリウム添加四酸化オスミウムによる後固定を施した試料を走査電子顕微鏡（SEM）で観察した。

③バイオフィルム形成量の測定

培養終了後、0.1% クリスタルバイオレット水溶液を用いた Tissue culture method^⑤にてバイオフィルムの形成量を測定した。

(3) バイオフィルム形成関連遺伝子の発現

(1) ①の培養により形成されたバイオフィルムを処理し抽出した *S. mutans* の mRNA を出発材料として RT-PCR を行うことで解析した。

4. 研究成果

(1) 増殖速度および付着率

本研究で用いた種々の serine protease は *S. mutans* の増殖を抑制し（図1）、またガラス管壁への付着を種々の程度で抑制することが明らかになった。

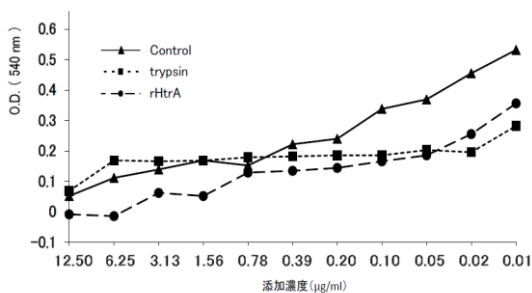


図1. *S. mutans* の増殖への serine protease の影響

(2) 菌体内外多糖合成能

菌体内外多糖特異的電子染色を施した超薄切片の TEM 観察ならびに SEM 観察により *S. mutans* の菌体内外多糖は、Control に比して多糖と思われる顆粒様構造物や線維状構造物が少ない傾向を呈し（図2～3）、菌体内外とも多糖の合成量が serine protease によって抑制されていることが推察された。

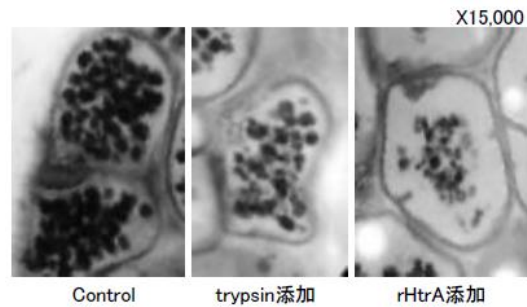


図2. *S. mutans* の菌体内多糖の合成状況 (TEM)

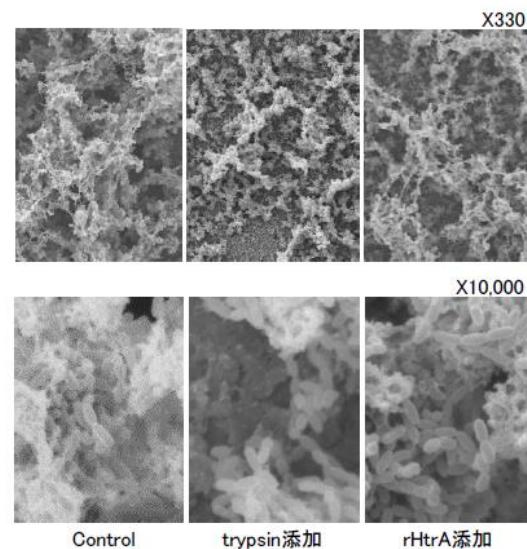


図3. *S. mutans* の菌体外多糖の合成状況 (SEM)

(3) バイオフィルム形成関連遺伝子の発現

バイオフィルムを処理し抽出した *S. mutans* の mRNA を出発材料として RT-PCR を行った結果、serine protease は種々の程度でこれらバイオフィルム形成関連遺伝子の発現に影響を及ぼしたが、有意に増減する遺伝子は存在しなかった。以上の結果から、本研究で用いたオートインデューサー分解酵素の *S. mutans* に対する抗菌活性およびバイオフィルム形成抑制効果が示唆された。

〈引用文献〉

- ① Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP :
Census and consensus in bacterial
ecosystems: the LuxR-LuxI family of
quorum-sensing transcriptional
regulators. *Annu Rev Microbiol.*
50:727-51, 1996.
- ② Cassone M, Gagne AL, Spruce LA,
Seeholzer SH, Sebert ME : The HtrA
protease from *Streptococcus*
pneumoniae digests both denatured
proteins and the competence-
stimulating peptide. *J Biol Chem.*
287:38449-59, 2012.
- ③ Hamada S, Torii M: Effect of sucrose in
culture media on the location of
glucosyltransferase of *Streptococcus*
mutans and cell adherence to glass
surfaces. *Infect Immun.* 20:592-599,
1978.
- ④ Nisizawa T, Imai S, Akada H, Hinode M
and Araya S: Extracellular glucans
produced by oral streptococci. *Arch*
Oral Biol. 21:207-213, 1976.
- ⑤ Yano A, Kikuchi S, Takahashi T, Kohama
K, Yoshida Y. : Inhibitory effects of
the phenolic fraction from the pomace
of *Vitis coignetiae* on biofilm
formation by *Streptococcus mutans*.
Arch Oral Biol. 57:711-9, 2012.

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 Y. Hosokawa, I. Hosokawa, S. Shindo, K.
Ozaki, T. Matsuo. : IL-4 Modulates CCL11
and CCL20 Productions from IL-1 β -
Stimulated Human Periodontal Ligament
Cells. *Cell Physiol Biochem.* 査読有,

38: 153-159, 2016,
DOI : 10.1159/000438617.

- ② Y. Hosokawa, I. Hosokawa, S. Shindo, K.
Ozaki, T. Matsuo. : Calcitriol suppressed
inflammatory reactions in
IL-1 β -stimulated human periodontal
ligament cells. *Inflammation.* 査読有,
38: 2252-2258, 2015,
DOI : 10.1007/s10753-015-0209-y

- ③ S. Shindo, Y. Hosokawa, I. Hosokawa, K.
Ozaki, T. Matsuo. : Genipin inhibits
MMP-1 and MMP-3 release from
TNF- α -stimulated human periodontal
ligament cells. *Biochimie.* 査読有, 107
Part B: 391-395, 2014,
DOI : 10.1016/j.biochi.2014.10.008

- ④ Y. Hosokawa, I. Hosokawa, S. Shindo, K.
Ozaki, T. Matsuo. : IL-22 enhances CCL20
production in IL-1 β -stimulated human
gingival fibroblasts. *Inflammation.*
査読有, 37: 2062-2066, 2014,
DOI : 10.1007/s10753-014-9939-5

- ⑤ Y. Hosokawa, S. Shindo, I. Hosokawa, K.
Ozaki, T. Matsuo. : IL-6 trans-signaling
enhances CCL20 production from
IL-1 β -stimulated human periodontal
ligament cells. *Inflammation.* 査読有,
37: 381-386, 2014, DOI :
10.1007/s10753-013-9750-8.

- ⑥ S. Shindo, Y. Hosokawa, I. Hosokawa, K.
Ozaki, T. Matsuo. : Genipin inhibits
IL-1 β -induced CCL20 and IL-6
production from human periodontal
ligament cells. *Cell Physiol. Biochem.*
査読有, 33: 357-364, 2014,
DOI : 10.1159/000356675.

- ⑦ M. Ishikawa, K. Yoshida, H. Okamura, K.
Ochiai, H. Takamura, N. Fujiwara, K.
Ozaki. : Oral *Porphyromonas gingivalis*
translocates to the liver and regulates

hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* 査読有, 1832: 2035-2043, 2013, DOI : 10.1016/j.bbadis.2013.07.012.

⑧ Y. Hosokawa, I. Hosokawa, S. Shindo, K. Ozaki, T. Matsuo. : (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits CC chemokine ligand 11 production in human gingival fibroblasts. *Cell Physiol. Biochem.* 査読有, 31: 960-967, 2013, DOI : 10.1159/000350114.

⑨ Y. Hosokawa, I. Hosokawa, S. Shindo, K. Ozaki, T. Matsuo. : TLR3 agonist enhances CC chemokine ligand 20 production in IL-1 β -stimulated human gingival fibroblasts. *Cellular Immunology.* 査読有, 283: 8-11, 2013, DOI : 10.1016/j.cellimm.2013.05.005.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 細川義隆, 尾崎和美 : IL-4 がヒト歯根膜由来細胞の CCL11 および CCL20 産生に及ぼす影響, 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2015. 9. 12, アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)
- ② 吉田賀弥, 尾崎和美 : PKR やインフラマソームが *P. gingivalis* を感染させた骨芽細胞において骨吸収に関連する因子の発現に与える影響, 第 57 回歯科基礎医学学会学術大会, 2015. 9. 11, 新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)
- ③ Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki : Melatonin Inhibits Inflammatory Mediators Productions in Human Periodontal Ligament Cells, The 2015 IADR/AADR/CADR General Session, 2015. 3. 12, Boston (USA)
- ④ Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki : IL-4 Modulates Chemokine Productions From

IL-1 β -stimulated Human Periodontal Ligament Cells, The 2015 IADR/AADR/CADR General Session, 2015. 3. 12, Boston (USA)

- ⑤ 新藤智, 細川義隆, 尾崎和美 : Shikonin がヒト歯根膜由来細胞の IL-6 および IL-8 産生に与える影響, 第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2014. 10. 31, 山形テルサ (山形県・山形市)
- ⑥ 細川義隆, 尾崎和美 : 活性型ビタミン D は IL-1 β 刺激ヒト歯根膜細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制する, 第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2014. 6. 20, ピアザ淡海 (滋賀県・大津市)
- ⑦ 新藤智, 細川義隆, 尾崎和美 : Genipin は *E. coli* LPS が誘導するヒト歯根膜細胞の IL-6 および IL-8 産生を抑制する, 第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2014. 6. 20, ピアザ淡海 (滋賀県・大津市)
- ⑧ 北中祐太郎, 細川義隆, 尾崎和美 : genipin は TNF- α が誘導するヒト歯根膜由来細胞の IL-6 産生を抑制する, 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 2014. 5. 23, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)
- ⑨ 木村智子, 尾崎和美 : *Streptococcus mutans* の病原性における scrA 遺伝子の役割, 第 6 回日本総合歯科協議会総会・学術大会, 2013. 11. 17, 昭和大学 (東京都・品川区)
- ⑩ 新藤智, 細川義隆, 尾崎和美 : Genipin は IL-1beta が誘導するヒト歯根膜細胞の CCL20 および IL-6 産生を抑制する, 第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2013. 10. 18, 秋田県総合生活文化会館 (秋田県・秋田市)
- ⑪ Kaya Yoshida, Kazumi Ozaki : Oral *Porphyromonas gingivalis* translocates to liver and regulates hepatic glycogen metabolisms by attenuating

insulin signaling, 10 th Asian Pacific
Society of Periodontology Meeting,
2013.9.1, Nara Prefectural New Public
Hall (Nara, 奈良県・奈良市)

- ⑫ 細川義隆, 尾崎和美: IL-6 は IL-1 β が誘
導するヒト歯根膜由来細胞の CCL20 産生
を増強する, 第 56 回春季日本歯周病学会
学術大会, 2013.6.1, タワーホール船堀
(東京都・江戸川区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 和美 (OZAKI, Kazumi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 9 0 2 1 4 1 2 1

(2) 研究分担者

湯本 浩通 (YUMOTO, Hiromichi)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 6 0 2 8 4 3 0 3

細川 義隆 (HOSOKAWA, Yoshitaka)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 9 0 3 4 6 6 0 1