

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07386

研究課題名(和文) 病原微生物のバイオフィルムに着目した新しいう蝕予防法の開発

研究課題名(英文) Novel method for caries prevention focusing on pathogenic bacterial biofilm formation

研究代表者

有田 健一 (Arita, Ken-ichi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：90780205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内の2大感染症の一つであるう蝕(虫歯)は、う蝕原性菌のバイオフィルム形成と深く関わっている。微生物学的なアプローチからう蝕原性菌のバイオフィルム形成を予防する方法として、低分子化合物を用いてう蝕原性菌のバイオフィルム形成を阻害できるか検証を行ったところ、う蝕原性菌のバイオフィルム形成を濃度依存的に阻害できる低分子化合物を見出した。さらに、免疫学的なアプローチからもバイオフィルム形成を阻害することを目的として、T細胞の活性化とB細胞のクラススイッチを引き起こすう蝕原性菌の抗原分画を見出した。

研究成果の概要(英文)：The most common infections of the oral cavity, known as dental caries, are closely related to biofilm formation of cariogenic bacteria. We tested the ability of small compounds to prevent *S. mutans* biofilm formation. We found the small compound inhibit biofilm formation in a dose dependent manner. In addition, we have obtained some interested result about the important antigens related to pathogenic bacteria for B cell class switch response and T cell activation.

研究分野：微生物学

キーワード：う蝕 バイオフィルム 病原微生物 低分子化合物 Tfh クラススイッチ IgA

1. 研究開始当初の背景

細菌が形成するバイオフィームは、抗生物質や免疫系の細胞にも抵抗性になるため慢性感染症の原因となりうる。口腔内の2大感染症の一つであるう蝕(虫歯)は、口腔内でう蝕原性菌がバイオフィームを形成することにより引き起こされる慢性感染症である。

これまでに、う蝕を防ぐ方法として、う蝕原性菌のバイオフィーム阻害剤を用いる手法など病原微生物側に着目したう蝕の予防法の開発が進んでいるが、病原微生物に対する免疫力に注目してバイオフィーム形成を予防する方法の開発は進んでいない。

通常、生体内の防御機構として、唾液中のリゾチーム、ラクトフェリン、分泌型IgA抗体(sIgA)といった成分が細菌の付着を予防しているが、う蝕を予防するためには、生体内の防御因子の産生を増やし、う蝕原性菌のバイオフィーム形成を防ぐことが有効であると考えられる。

宿主の防御因子である唾液中の分泌型IgA抗体は、B細胞から分化した形質細胞によって産生され、口腔内粘膜免疫で重要な役割を果たしている。通常、これらの分泌型IgA抗体は一般的な病原細菌からの保護を担当していて、T細胞の免疫応答が関与しないT細胞非依存的な抗体産生により供給されている。一方、ヘルパーT細胞依存性である抗原特異的な分泌型IgA抗体が、特定の病原微生物を標的とする粘膜免疫応答では重要な役割を担っている。免疫学的アプローチによる確なう蝕予防を展開するには、T細胞依存性な免疫応答に関する研究が必要であるとされる。しかしながら、う蝕原性菌の全菌体ワクチンには、心筋との交差反応性があることから禁忌とされ、抗体エピトープを念頭においた成分ワクチンの開発へと移行していった背景があり、これまでのう蝕原性菌に対する免疫学的研究において、T細胞依存性な免疫応答に焦点を置いた研究は見当たらない。

2. 研究の目的

本研究では、う蝕原性菌に対する低分子化合物を用いることでバイオフィーム形成を防ぐだけでなく、宿主の免疫細胞がバイオフィーム形成を阻害する機構にも着目し、微生物と宿主の両面的なアプローチからう蝕原性菌のバイオフィーム形成を阻害しう蝕予防に繋げることを目的とした。

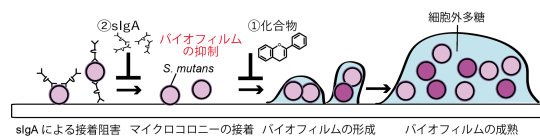


図1. バイオフィーム形成阻害に向けた微生物側と宿主側に着目した両面的なアプローチ。う蝕原性菌をターゲットにした化合物によるバイオフィーム形成阻害。う蝕原性菌をターゲットにしたIgA抗体によるバイオフィーム形成阻害。

3. 研究の方法

(1)微生物学的視点から低分子化合物による

う蝕原性菌のバイオフィーム形成阻害能を検証した。検証を行った化合物は、我々がすでに報告している大腸菌や黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害する低分子化合物(Arita-Morioka et al., 2015)だけでなく、その類縁体の低分子化合物(Arita-Morioka et al., submitted)にも着目した。これらの低分子化合物の添加により、う蝕原性菌のバイオフィーム形成が阻害されるか *in vitro* で評価した。

(2)う蝕原性菌特異的なIgA抗体を産生させるため、クラススイッチを引き起こすう蝕原性菌コンポーネントの同定を目的として、全ゲノムが判明しているう蝕原性菌を抗原として分画し、細胞壁、細胞膜、細胞質といった各種菌体成分にした。その分画成分を *in vitro* でマウス骨髄から分化した樹状細胞に抗原提示させたのち、ヘルパーT細胞及びB細胞を用いて反応させIgAへのクラススイッチをflow cytometryで評価した。また、T細胞における応答を確認するため、この分画を抗原提示細胞及びヘルパーT細胞と *in vitro* で反応させ、クラススイッチのマスターレギュレーターであるTfhを誘導するかflow cytometryを用いて検証した。さらにう蝕原性菌非感染あるいは感染マウス由来のヘルパーT細胞を用いた場合で比較した。

(3)う蝕の病態に関わる全身の免疫細胞の解析を目的として、う蝕原性菌感染マウスおよび非感染マウスにおけるう蝕原性菌特異的なIgA量をELISAにて測定した。また、う蝕原性菌の感染モデルマウスを用いて、全身のリンパ節を回収し、う蝕原性菌によるTfhへの分化及びIgAへのクラススイッチが起きているリンパ節をflow cytometryを用いて評価した。

4. 研究成果

(1)う蝕の発症に重要であるう蝕原性菌のバイオフィーム形成に着目し、微生物学的なアプローチとして低分子化合物によるう蝕原性菌のバイオフィーム形成が阻害できるか *in vitro* で検証した。その結果、う蝕原性菌のバイオフィーム形成を *in vitro* で濃度依存的に阻害できる化合物を見出した。また、この化合物を用いることでう蝕と密に関わっているう蝕原性菌の酸耐性能も低下することも見出した。

(2)免疫学的なアプローチからう蝕原性菌のバイオフィーム形成阻害を目指す方法として、抗原特異的なIgA抗体によるバイオフィームの形成阻害が考えられる。そこで、抗原特異的なIgA抗体を産生させるため、IgAへのクラススイッチを誘導するう蝕原性菌の抗原分画を見出した。具体的には骨髄細胞由来樹状細胞を抗原提示細胞とし、抗原としてう蝕原性菌を細胞壁、細胞膜、細胞質といった各種菌体成分としたものを用いて、ヘルパーT細胞及びB細胞を用いて反応させIgAへのクラススイッチをflow cytometryで評価

したところ IgA へのクラススイッチを誘導する分画を見出した。さらに T 細胞の応答を確認するため、この分画を用いて骨髄細胞由来樹状細胞とヘルパー T 細胞を用いて *in vitro* で反応させ、クラススイッチのマスターレギュレーターである Tfh を誘導するか確認したところ、この分画で誘導能が高い事を見出した。さらに、う蝕原性菌感染マウスあるいは非感染マウス由来のヘルパー T 細胞で比較したところう蝕原性菌感染マウス由来のヘルパー T 細胞を用いることで Tfh の誘導能が高い事を見出した。

(3) う蝕の病態に関わる全身の免疫細胞の解析を目的として、う蝕原性菌感染マウスおよび非感染マウスにおけるう蝕原性菌特異的な IgA 量及び全 IgA 量を ELISA にて測定した。また、う蝕原性菌の感染モデルマウスを用いて、全身のリンパ節を回収し、う蝕原性菌による Tfh への分化及び IgA へのクラススイッチを flow cytometry を用いて解析し、う蝕原性菌の感染により応答が起こっているリンパ節を見出した。

以上の結果より、微生物学的なアプローチとして、低分子化合物を用いることでう蝕原性菌のバイオフィーム形成が濃度依存的に抑えられるだけでなく、う蝕原性菌の酸耐性能も低下することを見出した。さらに宿主の免疫応答の側面からバイオフィーム形成を阻害するアプローチにも着目し、う蝕原性菌特異的な IgA 抗体を産生させるため、IgA へのクラススイッチを引き起こす抗原分画を絞り込んだ。また、う蝕原性菌に対する全身の免疫応答を理解するため、う蝕原性菌を感染させたマウスを用いて各部位におけるリンパ節を解析したところう蝕原性菌の感染により Tfh の分化と IgA へのクラススイッチが起こるリンパ節を同定した。これらの知見は、う蝕の予防法だけでなく様々なバイオフィーム感染症の予防法・治療法の開発につながると考えられる。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

Sugimoto S, Arita-Morioka K, Terao A, Yamanaka K, Ogura T, Mizunoe Y. Multitasking of Hsp70 chaperone in the biogenesis of bacterial functional amyloids. *Communications Biology*. 2018. in press (査読あり)

Tasaki S, Cho T, Nagao J, Ikezaki S, Narita Y, Arita-Morioka K, Yasumatsu K, Toyoda K, Kojima H, Tanaka Y. Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. *FEMS Yeast Research*. 18(3). 2018 (査読あり)

Hashimoto M, Nagao J, Ikezaki S, Tasaki S, Arita-Morioka K, Narita Y, Cho T, Yuasa K, Altman A, Tanaka Y. Identification of a Novel Alternatively Spliced Form of Inflammatory Regulator SWAP-70-Like Adapter of T Cells. *International Journal of Inflammation*. 2017:1324735, 2017 (査読あり)

[学会発表](計 26 件)

1. 杉本真也, 有田(森岡) 健一, 山中 邦俊, 小椋 光, 水之江 義充 (2018) ミリセチン類縁体による菌体外アミロイド線維依存的バイオフィームの制御. 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡)
2. 有田(森岡) 健一, 永尾潤一, 成田由香, 田崎園子, 池崎晶二郎, 安松香奈江, 長環, 田中芳彦 (2017) Myricetin 類縁体を用いたバイオフィーム感染症の制御法の開発. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本).
3. 永尾 潤一, 成田 由香, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 田崎 園子, 池崎晶二郎, 長 環, 田中 芳彦 (2017) 歯周病病態形成における免疫制御機構の解明. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本).
4. 成田 由香, 永尾 潤一, 有田(森岡)健一, 池崎晶二郎, 田崎 園子, 安松香奈江, 長環, 田中 芳彦 (2017) 実験的歯周炎モデルマウスを用いた病態を惹起する菌体成分の同定. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本).
5. 田崎 園子, 長 環, 永尾 潤一, 成田 由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 小島 寛, 田中 芳彦 (2017) 口腔カンジダ症に対して T 細胞応答を誘導する抗原探索. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本).
6. 長 環, 池崎晶二郎, 田崎 園子, 安松佳奈恵, 成田 由香, 有田(森岡)健一, 永尾 潤一, 田中 芳彦 (2017) mild heat stress 下の *Candida albicans* バイオフィームと宿主免疫応答の解析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本).
7. 池崎晶二郎, 永尾 潤一, 橋本麻利江, 田崎 園子, 安松香奈江, 成田 由香, 有田(森岡)健一, 長 環, 池邊 哲郎, 田中 芳彦 (2017) ヘルパー T 細胞に発現する新規免疫シグナル分子の同定とその機能解析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本).
8. 安松香奈江, 成田 由香, 長 環, 永尾 潤一, 有田 健一, 田崎 園子, 池崎晶二郎, 小島 寛, 田中 芳彦 (2017) インプラント細菌汚染モデルを用いた除染効果の検討. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本).
9. 池本梨央南, 豊屋 有希, 永尾 潤一, 成田 由香, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 田崎 園子, 池崎晶二郎, 長 環, 田中 芳彦 (2017) う蝕ならびに歯周病を抑制する口腔内細菌の探索. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本).
10. 池崎晶二郎, 長 環, 田崎 園子, 安松佳奈恵, 成田 由香, 永尾 潤一, 有田(森岡)健一, 田中 芳彦 (2017) mild heat stress 条件下における *Candida albicans* の遺伝子発現と細胞応答. 第

- 61 回日本医真菌学会総会（金沢）。
11. 田崎 園子, 長 環, 永尾 潤一, 成田 由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 小島 寛, 田中 芳彦 (2017) *Candida albicans* に対する T 細胞による免疫機構の解明. 第 61 回日本医真菌学会総会（金沢）
 12. Sonoko Tasaki, Tamaki Cho, Jun-ichi Nagao, Yuka Narita, Marie Hashimoto, Shojiro Ikezaki, Kanae Yasumatsu, Keita Toyoda, Ken-ichi Arita-Morioka, Hiroshi Kojima, Yoshihiko Tanaka. (2017) Investigation of mechanisms underlying the T cell response in oral candidiasis. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, (Sendai).
 13. Shojiro Ikezaki, Junichi Nagao, Marie Hashimoto, Sonoko Tasaki, Kanae Yasumatsu, K Toyoda, Yuka Narita, Ken-ichi Arita-Morioka, Tamaki Cho, Yoshihiko Tanaka. (2017) A novel alternative splicing of T-cell signaling molecule modulates TCR-mediated responses in Th2 cells. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, (Sendai).
 14. 杉本 真也, 宮川 玲奈, 寺尾 明莉, 有田 健一, 山中 邦俊, 小椋 光, 水之江 義充 (2016) 細胞外アミロイド線維形成タンパク質の細胞内品質管理機構. 第 39 回日本分子生物学会年会. (横浜)
 15. 有田(森岡)健一, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 田崎園子, 池崎晶二郎, 長 環, 田中 芳彦 . (2016) 分子シャペロン DnaK をターゲットにした低分子化合物を用いた新しいバイオフィルム阻害法の開発. 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会・総会. (札幌)
 16. 橋本麻利江, 永尾潤一, 田崎園子, 池崎晶二郎, 成田由香, 長環, 有田(森岡)健一, 湯浅賢治, 田中芳彦. (2016) アレルギー疾患に関わる新しいシグナル分子の解析. 第 23 回 日本歯科医学会総会. (福岡).
 17. 田崎園子, 長環, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 小島寛, 田中芳彦. (2016) 口腔カンジダ症を制御する免疫制御機構の解明. 第 23 回日本歯科医学会総会. (福岡).
 18. 池崎晶二郎, 長 環, 田崎園子, 橋本麻利江, 成田由香, 永尾潤一, 有田(森岡)健一, 田中芳彦. (2016) Mild heat stress 条件下における *Candida albicans* の遺伝子発現と細胞 応答. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術 集会. (東京)
 19. 田崎園子, 長 環, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 小島 寛, 田中 芳彦 . (2016) *Candida albicans* に対する T 細胞応答を誘導する表層抗原探索. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会. (東京)
 20. 田崎園子, 長 環, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 小島寛, 田中芳彦. (2016) 口腔カンジダ症を制御 する T 細胞応答の誘導. 第 58 回歯科基礎 医学会学術大会・総会. (札幌)
 21. 池崎晶二郎, 長 環, 田崎園子, 橋本麻利江, 成田由香, 永尾潤一, 有田(森岡)健一, 池邊哲郎, 田中芳彦. (2016) *Candida albicans* のバイオフィルム形成における mild heat stress の影響. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会. (札幌)
 22. 永尾潤一, 成田由香, 田崎園子, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 長 環, 田中芳彦. (2016) 病原微生物による歯周病の免疫学的解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会. (札幌)
 23. 成田由香, 永尾潤一, 田崎園子, 有田(森岡)健一, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 長 環, 田中芳彦. (2016) 歯周病をひきおこす病原微生物の菌体成分の同定. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会. (札幌)
 24. 長 環, 田崎園子, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 田中芳彦. (2016) *Candida albicans* 由来 CD4+ T 細胞分化誘導画分の解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会. (札幌)
 25. Marie Hashimoto, Jun-ichi Nagao, Shojiro Ikezaki, Sonoko Tasaki, Yuka Narita, Ken-ichi Arita (Morioka), Kanae Yasumatsu, Tamaki Cho, Kenji Yuasa, Yoshihiko Tanaka. (2016) Role of a novel immune signaling molecule in Th2-type response. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. (Okinawa)
 26. Sonoko Tasaki, Tamaki Cho, Jun-ichi Nagao, Yuka Narita, Marie Hashimoto, Shojiro Ikezaki, Kanae Yasumatsu, Ken-ichi Arita (Morioka), Hiroshi Kojima, Yoshihiko Tanaka. (2016) Investigation of the mechanism of T cell response in oral candidiasis. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. (Okinawa)
- 〔その他〕
ホームページ等
- 6 . 研究組織
 - (1) 研究代表者
有田 健一 (ARITA KEN-ICHI)
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教
研究者番号：90780205
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし
 - (4) 研究協力者
なし