

令和元年6月13日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11461

研究課題名(和文) Treponema denticolaの上皮細胞侵入機構と病原性惹起機構の解明

研究課題名(英文) Response of epithelial cells infected by Treponema denticola

研究代表者

国分 栄仁 (Eitoyo, Kokubu)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70453785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Treponema denticolaの病原性を明らかにするため、病原性遺伝子欠損株を用い感染による細胞の動態変化を解析した。dentilisinはTLR2認識パターンを変調させ防御反応から回避する可能性を認めた。表層プロテアーゼは細胞侵入により細胞の運動能を低下させ、ストレス応答の遅延を引き起こすと考えられた。本菌の感染は上皮細胞への侵入とともにその応答を変化させて病原性を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりT. denticolaの病原性因子による口腔粘膜上皮組織への感染および細胞侵入のメカニズムが明らかになる。本菌の病原性の解明および宿主免疫に対する回避機構は、慢性歯周病疾患の機序の解明や口腔内細菌の侵入予防への応用の糸口となる。さらに本菌の構成成分であるMspIは、梅毒の病原体であるTreponema pallidumとの遺伝学的に相同分子があることが知られているため、本研究の成果は、歯周病の病原性に限局されず、Treponema属全体の病原性メカニズムの解析につながり、梅毒あるいはDigital dermatitis等のTreponema感染症の治療に繋がる。

研究成果の概要(英文)： To clarify the pathogenicity of T. denticola, epithelial cells were infected with the wild-type strain or a mutant strain deficient in dentilisin or a major outer sheath protein (prtP or msp respectively). The migration activity of cells infected by prtP compared with those infected by wild-type strain and msp. TLR-2 signal intensity was greater in the cells infected by prtP than in cells infected by the wild-type strain.

These results indicate that prtP modulates pathogen recognition via TLR2 and that dentilisin has the potential to degrade paxillin and HSP70, which decreases cell migration and delays stress response. Collectively, the findings show that prtP modulates the immune response of host cells to T. denticola infection.

研究分野：微生物学

キーワード：Treponema denticola 細胞侵入 サイトカイン 歯周病 免疫応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重度歯周病患者の口腔内から高頻度に検出される *Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola* および *Tannerella forsythia* の3菌種は red complex と呼ばれ、歯周炎の発症と進行に重要な役割を果たすとされている (Socransky et al. 1998)。細菌の細胞への侵入は多くの病原細菌に認められ、細菌の病原因子として重要な役割を果たす。Red complex のうち *P. gingivalis* は endocytosis を利用して歯肉上皮細胞に侵入し、gingipain をはじめとする病原因子による細胞障害性を示し、recycling system によって他の細胞に拡散する (Takeuchi H, et al. 2011)。これに対し *T. denticola* は細胞に侵入するという報告はあるが、その詳細は明らかになっていない。*T. denticola* の主な病原因子として Major surface protein (Msp) と prolyl-phenylalanine 特異的プロテアーゼ dentilisin が報告されており、dentilisin 欠損株はマウスでの膿瘍形成能を低下させる (Ishihara K, 2010)。さらに本菌は食細胞に貪食された後も一定時間細胞内の生存、あるいは細胞から脱出することが報告されている (Olson I, 1984、自験例、図2)。これらの報告は、本菌が細胞に侵入し、その後細胞に傷害性を与えることを示唆している。以上の学術的背景を基盤として、歯周病の原因菌である *T. denticola* の病原性発現機構の解明には本菌の上皮細胞への侵入能力とそれに関わる因子の解析、本菌の細胞侵入後の動態解析、および細胞内侵入後に病原性を示す因子の解析が重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病原菌である *Treponema denticola* による口腔粘膜上皮細胞への侵入機構および病原性発現機構を解明し、その抑制による歯周病予防への応用を検討することである。*T. denticola* は菌体表層成分の膜タンパクによる TLR-2 刺激作用、タンパク質分解酵素によるサイトカイン分解作用および補体活性化作用等の病原因子により宿主免疫機構を攪乱させ、慢性歯周病を引き起こす主要な病原性細菌の1つとされている。本研究では、*T. denticola* の細胞侵入に関わる病原因子を特定し、侵入後の細胞内での動態を検索することにより、上皮細胞における病原性発現メカニズムを特定する。さらに宿主細胞への侵入を抑制する分子を見出し、臨床応用への可能性を検討する。

本菌の上皮細胞への侵入能力とそれに関わる因子の解析：*T. denticola* の口腔上皮細胞内への侵入様式について解析するとともに、侵入に影響を与えるタンパク質を2次元電気泳動により解析する。そして遺伝子の欠損菌株の作成と細胞内シグナルの inhibitor を用いて侵入に関するタンパク質と、作用メカニズムについて明らかにする。

本菌の細胞侵入後の動態解析：細胞内に侵入した細菌は通常であれば消化されるが、一部の細菌は消化システムから逃れることが知られている。我々の予備実験ではマラッセ上皮細胞への感染で細胞外への脱出を示唆する所見を得ている(図2)。そのため本菌が口腔上皮細胞内に侵入後の動態を詳細に解析するため phagocytosis に関するタンパク質発現、さらに侵入後の菌の局在性および生死について time-lapse にて解析を行う。

細胞内侵入によって惹起される病原性の解析：マラッセ上皮遺残細胞に *T. denticola* を感染させた場合、Interleukin (IL)1-、IL-6、-defensin および HSP-70mRNA 発現量の低下を認めた。しかし、口腔粘膜上皮細胞における *T. denticola* 感染による影響は未だ不明で点が多く、本菌のどのような成分がこれらの免疫応答を引き起こすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は3つの課題に分けて研究を推進する。*Treponema denticola* の上皮細胞への侵入能力とそれに関わる因子の解析：*T. denticola* の野性株あるいは遺伝子欠損株を使用し、培養ヒト口腔粘膜上皮細胞に上記細菌を感染させて宿主細胞への侵入機序を解明する。本菌の細胞侵入後の動態解析：侵入後の宿主細胞の動態検索を endosome および Autophagosome に関与する Atg 関連タンパク質の発現を検索し、さらに細胞内での *T. denticola* の生存あるいは分解から回避方法を解明する。細胞内侵入により惹起される病原性の解析：シグナル伝達の inhibitor を用いてサイトカイン発現経路を解析する。また、病原因子関連ゲノム遺伝子を検索し欠損株の細菌を作成する。その細菌を用いて宿主侵入能および宿主細胞内での生存能の低下を引き起こさせる遺伝子を解明する。

(1) *T. denticola* の上皮細胞への侵入能力とそれに関わる因子の解析

T. denticola の口腔粘膜上皮細胞への侵入機構、細胞内での細菌動態および免疫機構を検索し、細菌の病原遺伝子欠損株を用いることで侵入機能に関与する病原因子を解明していく。

T. denticola の上皮細胞内への侵入。細菌は *Treponema denticola* の野性株 ATCC34405、病原遺伝子欠損株の K1 (dentilisin 欠損株)、および DMSP3 (MSP 欠損株) を使用する。感染方法は *T. denticola* を MOI (multiplicity of infection) は1細胞あたり100の細菌数にて感染させる。感染結果は時間毎にサンプルを固定して走査型電子顕微鏡を用いて判定する。また、Calcein および Dil cell-labelling solution 試薬を用いて細胞と細菌をそれぞれ染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による time-lapse 撮影を行い、侵入時の動態を検索する。

T. denticola の細胞内への侵入能力の解析

野性株と病原遺伝子欠損株の上皮細胞内への侵入率を解析するため、免疫抗体法により細胞

内と細胞外に存在する *T. denticola* を染め分け、細胞接着率および細胞侵入率をそれぞれ測定する。

(2) *T. denticola* の細胞侵入後の動態解析

T. denticola の宿主細胞への侵入方法、および侵入後のエンドソ - ム・リソソーム系の殺菌からの回避機構を検索する。

宿主細胞への侵入方法の検索

T. denticola がどのような経路で細胞内に侵入するかを検索するため、Toll 受容体 (TLR) reporter cell line を用いて侵入路を検索する。また、NLR ファミリーである NOD1 および NOD2 の応答が行われているか RT-PCR を用いて検索する。感染させる細菌を野性株と欠損株それぞれ用いて細胞内に侵入する際の病原因子との関連性を検索する。

宿主細胞の endocytosis に関する検索

宿主細胞の autophagy に関する機能を検索するため、蛍光タンパクを発現させた *T. denticola* を用いて、抗 Atg 抗体を用いてタンパク質発現を検出、さらにリソソームの関与を調べるため抗 LAMP-1 (lysosome associated membrane protein) 抗体を用いて CLSM による局在性の検出を行う。

(3) 細胞内侵入により惹起される病原性の解析

野性株・遺伝子欠損株を用いて *T. denticola* の侵入と細胞内での動態を検索した結果をもとに、宿主細胞に対して侵入関連因子の inhibitor あるいは siRNA を用いて侵入効率および宿主免疫応答の変化を検索し、感染に対する有効な病原因子の標的を解明する。

細菌感染による上皮細胞への影響の検索

野性株および欠損株を HOK 細胞に感染させ、免疫関連サイトカインの発現を形態学的および分子生物学的に検索する。対象とするサイトカインは NF- κ B, interleukin (IL) -1, IL-6、熱ショックタンパク (HSP)70、defensin の細胞内でのタンパク質発現を CLSM にて局在性の検索を行う。そして病原性の有無が細胞内免疫機構に与える影響を解明する。

4. 研究成果

口腔扁平上皮癌由来細胞を培養後、*T. denticola* ATCC 35405 (野性株)、表層プロテアーゼ (PrtP) または Major outer sheath protein (Msp) 欠損株を感染させてスクラッチアッセイによる評価、サイトカイン等の mRNA およびタンパク質の発現を検索した。また、TLR reporter cell に感染させ TLR2 シグナルを解析した。TLR2 シグナルはすべての菌株の感染で認め、そのレベルは *prtP* 欠損株で最も高く、次いで野性株と *msp* 欠損株であった。感染 24 時間後の mRNA 発現は IL-1 が野性株で優位に低下し、 α -defensin の発現は野性株で優位に高く、IL-6 および HSP はどの菌株の感染でも増加を認めた。Paxillin と HSP についてタンパクレベルで解析すると非感染群と比較して、野性株および *msp* 欠損株で発現の低下あるいは分解を認めた。スクラッチアッセイでは非感染群と比較して野性株、*msp* 欠損株の感染の順で遊走能を低下させたが *prtP* 欠損株の感染では変化を認めなかった。

T. denticola は dentilisin により TLR2 認識パターンを変調させ細胞の防御反応を回避する可能性が認められた。表層プロテアーゼは、細胞侵入により Paxillin を分解して細胞の運動能を低下させ、さらに HSP を分解することで細胞のストレス応答の遅延を引き起こすと考えられた。これらの結果から、*prtP* は上皮細胞への侵入とともにその応答を変化させて病原性を示すことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- 1 [Kokubu E](#), Kinoshita E, [Ishihara K](#). Inhibitory Effects of Lingonberry Extract on Oral Streptococcal Biofilm Formation and Bioactivity. The Bulletin of Tokyo Dental College. 2019 Feb 28;60(1):1-9. doi: 10.2209/tdcpublish.2018-0007. 査読有
- 2 [Kikuchi Y](#), Kato T, Okuda K, [Kokubu E](#), [Ishihara K](#). Treponema denticola Induces Epithelial Barrier Dysfunction in Polarized Epithelial Cells. The Bulletin of Tokyo Dental College. 2018 Nov 30;59(4):265-275. doi: 10.2209/tdcpublish.2017-0052. 査読有
- 3 [Kokubu E](#), Inoue T, [Ishihara K](#). Response of epithelial cells infected by Treponema denticola. Oral Dis. 2018 Mar;24(1-2):14-18. doi: 10.1111/odi.12794. 査読有
- 4 Inagaki S, Kimizuka R, [Kokubu E](#), Saito A, [Ishihara K](#). Treponema denticola invasion into human gingival epithelial cells. Microb Pathog. 2016 May;94:104-11. doi: 10.1016/j.micpath.2016.01.010. 査読有

[学会発表](計6件)

- 1 [国分 栄仁](#), 臨床と基礎の架け橋 Treponema denticola の細胞侵入機構の解析, 第 306 回 東京歯科大学学会, 2018.
- 2 [国分 栄仁](#), [菊池 有一郎](#), [柴山 和子](#), [石原 和幸](#). Treponema denticola の prtP は上皮細胞の免疫応答を変調させる. 第 60 回 歯科基礎医学会学術大会 2018.
- 3 [国分 栄仁](#), [菊池 有一郎](#), [柴山 和子](#), [石原 和幸](#). Treponema denticola の感染による細胞応

答. 第 91 回日本細菌学会総会 2018.

- 4 菊池有一郎, 太田功貴, 柴山和子, 国分栄仁, 齋藤淳, 石原和幸. *Porphyromonas gingivalis* の鉄獲得機構における ECF シグマ因子 PGN_0319 の役割. 第 90 回 日本細菌学会総会 2017.
- 5 国分栄仁, 菊池有一郎, 柴山和子, 石原和幸. *Treponema denticola* の細胞侵入に影響する病原因子の解析. 第 90 回 日本細菌学会総会 2017.
- 6 菊池有一郎, 国分栄仁, 柴山和子, 大原直也, 中山浩次, 石原和幸. *Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子変異株における菌体表層性状の解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2016.

6 . 研究組織(1)研究分担者

研究分担者氏名: 石原 和幸
ローマ字氏名: Ishihara Kazuyuki
所属研究機関名: 東京歯科大学
部局名: 歯学部
職名: 教授
研究者番号(8桁): 00212910

研究分担者氏名: 菊池 有一郎
ローマ字氏名: Kikuchi Yuichiro
所属研究機関名: 東京歯科大学
部局名: 歯学部
職名: 教授
研究者番号(8桁): 30410418