

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17355

研究課題名(和文) P. gingivalis バイオフィルム剥離に関わる新規プロテアーゼの解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel protease involved in P. gingivalis biofilm detachment

研究代表者

原口 晃 (Haraguchi, Akira)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00734998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身疾患において歯周病細菌によるバイオフィルムが病変部位より検出されることが知られている。本研究では、心疾患において検出されるPgバイオフィルムが他の主要な歯周病原菌によってどのように口腔内バイオフィルムから剥離され血流に乗っているのかを解明していくことを目的とする。歯周病菌のバイオフィルムに対してPiの培養上清の有効性が示唆された。本研究の成果は慢性歯周炎の進行を阻止し、剥離された歯周病細菌が血中に播種し心内膜炎等へ波及するとした歯性病巣感染の機序解明と効果的な予防法へと貢献するものと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性歯周炎病変部位におけるバイオフィルム内の歯周病細菌間相互作用に関する理解が深まり、これら相互作用をターゲットとした新たな歯周病治療法の確立に繋がる。これまでの抗菌療法では歯周病細菌の種類、疾患の状態に合わせた投薬は難しかったが、この新しい知見により、慢性歯周炎病変部位より検出される主要な歯周病細菌を標的とした新たな抗菌療法の確立に繋がることを期待される。さらに、Pgはバイオフィルムから剥離され、血中に入り全身的な病変を引き起こす可能性が示唆されている。これらの研究が進むことにより、歯周病患者の心内膜炎を引き起こすメカニズムの解明に近づき、予防方法が飛躍的に発展する。

研究成果の概要(英文)：It is known that biofilms caused by periodontal bacteria are detected from lesions in systemic diseases. The purpose of this study is to elucidate how Pg biofilms detected in heart diseases are detached from oral biofilms by other major periodontal pathogens and enter the bloodstream. The effectiveness of the Pi culture supernatant on the biofilm of periodontal bacteria was suggested. The results of this study are to elucidate the mechanism and effective prevention of dentate lesion infection, which inhibits the progression of chronic periodontitis and disseminated exfoliated periodontal bacteria spread in the blood and spread to endocarditis, etc.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病原細菌 P. gingivalis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯肉溝に棲息する細菌によって引き起こされる感染症で、歯周病原細菌が歯周組織局所に付着し、バイオフィルムを形成して成長することで、発症し重症化していく(\*2)。菌体外多糖からなるグリコカリックスによって保護されたバイオフィルム中の細菌は、抗菌物質や貪食細胞、免疫グロブリンに対して抵抗性を示して局所に長期に留まり、感染の慢性化、難治化を招くと考えられている。特に red complex である *Porphyromonas gingivalis* (Pg)、*Treponema denticola*(Td)、*Tannerella forsythia*(Tf) や、それ以外の *Prevotella intermedia* (Pi)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)は代表的な歯周病細菌であり、最近では冠性動脈心疾患や脳血管性疾患との関わりにおいて注目されている。しかしながら、複雑なバイオフィルム構造のメカニズムの中で、歯周病細菌間の共生的な関係についての報告は多くあるが、歯周病細菌間でバイオフィルム中の競合的な報告は少ない。申請者らはこれまで、Pg が Aa に対してバイオフィルム形成に優位な関係をもっていることを示している。

Pg ATCC33277 株 (型 *fimA* 菌) が培養上清中に分泌したジンジパイン中の Kgp タンパクの分解活性が Aa ATCC29523 株のバイオフィルムの付着を阻害することを明らかにした。また一方で、Aa のバイオフィルムの凝集に対してはジンジパイン以外の酵素が阻害することを明らかにし、さらにその酵素はジンジパインによってプロセッシングされることで活性化される酵素であることを見出した。一方で、Pg についても線毛型が6種類(、b、)、)あることは明らかにしているが、線毛型によるバイオフィルム形成の差については明らかになっておらず、Pg のバイオフィルムに対する他の歯周病原細菌による付着凝集阻害に関しては明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

これらのどの細菌のプロテアーゼが Pg バイオフィルム剥離に関与しているのか解明し、各線毛型による被阻害因子について同定していくことによって、心疾患において検出される Pg バイオフィルムが他の主要な歯周病原菌によってどのように口腔内バイオフィルムから剥離され血流に乗っているのかを解明していくことを目的とする。これらの関係によって剥離された歯周病細菌が血中に播種し心内膜炎等へ波及するとした歯性病巣感染の機序解明と効果的な予防法へと貢献するものと考えている。

## 3. 研究の方法

歯周病菌は羊血液寒天培地(5% defibrinated laked sheep blood、4% tryptic soy agar、0.5% brain heart infusion、0.1% cysteine、hemin 5 µg/ml、menadione 1 µg/ml) あるいは、enriched BHI broth(3.7% brain heart infusion、0.5% yeast extract、0.05% cysteine)に hemin 5 µg/ml、menadione 1 µg/ml を含む enriched BHI broth を用いて酸素吸収剤であるアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学株式会社) を使用し、嫌気的条件下にて 37 で培養した。株は寒天培地にて培養した菌体を、enriched BHI broth を用いて、嫌気下、37、24 時間培養した後、対数増殖後期まで達した培養液を新鮮な培地に 10 倍希釈して二次培養(嫌気下、37、24 時間)した。更に、二次培養液を新鮮な培地に 20 倍希釈を

し、細菌数を  $3 \sim 5 \times 10^7$  個 /ml になるように三次培養(嫌気下、37℃、24 時間)を行った。培養後、三次培養液を遠心分離 (6,000 × g、4℃、15 分)で菌体を除去し、各株の培養上清を回収した。バイオフィームは 96 穴マイクロタイタープレート、及び細胞培養用滅菌シャーレ内で三次培養を行い、バイオフィームを付着させた。培養後、96 穴マイクロタイタープレートはバイオフィームが形成されたウェル内壁から非付着菌を除去するため、ボルテックスミキサーを用いて 5 秒間振盪し、非付着菌を攪拌除去した。3 ml Phosphate-buffered saline にてウェル内壁を洗浄したものをバイオフィームとして以下の実験に使用した。

各菌のバイオフィームに対して歯周病菌の培養上清を分注後、37℃ 1h 静置し、バイオフィームを PBS で十分に洗浄後、各ウェルに 0.1% Crystal violet 200 μl を添加し、10 分間バイオフィーム細菌細胞壁の染色を行い、バイオフィームを観察した。乾燥後、95% エタノールにて色素抽出を行い、マイクロプレートリーダーを用い、595 nm で吸光度を測定しバイオフィーム形成量を測定した。

#### 4 . 研究成果

歯周病菌それぞれのバイオフィームに対して各歯周病菌の培養上清によって処理をしたところ、それぞれの歯周病菌では Pi の培養上清がそれぞれのバイオフィーム量に影響を与えることが示唆された。また Pg の培養上清では Fn のバイオフィーム量が増加した。そこで Pi の培養上清を 50kDa、30kDa、10kDa で限外濾過を行い、再度バイオフィームに対して剥離効果を検証したところ、10kDa 以下では剥離効果は認められなかったが、それ以上ではバイオフィームに対して影響を与えた。Pi にはシステインプロテアーゼの Interpain A があるためこのプロテアーゼにより影響を与えたと考えられるが、他の Pg や Fn などにもプロテアーゼは持っているため、それぞれの防御機構により Pi 以外のプロテアーゼの影響は受けずにバイオフィームが維持されるが、Pi の培養上清に関してはそれぞれの防御機構を受けない可能性が示唆される。そのメカニズム、また Interpain A 以外の因子 MMP2 や MMP9 などのマトリックスメタロプロテアーゼとの関連も今後検証していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----