

平成21年 4月 27日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18791384

研究課題名 (和文) 酵母発現系を用いたクラミジアの増殖機構の解析

研究課題名 (英文) Evaluation of the replication mechanism of chlamydia by yeast expression system

研究代表者

神原 賢治 (KANBARA KENJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60305141

研究成果の概要：

クラミジアを始めとし、細菌感染によって産生される $TNF\alpha$ を効果的に抑制できた。この事は、動脈硬化などの発生を抑制的に作用する事が考えられ、クアミジアを始めとする各種細菌の相乗的な炎症反応を抑制による心疾患を始めとするリスク軽減に、有効である事が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究分野：口腔細菌

科研費の分科・細目：歯学 病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：クラミジア、 $TNF\alpha$

1. 研究開始当初の背景

歯科治療を通じて感染の可能性のある病原微生物は多岐にわたる。なかでも、従来歯科領域で余り重要とされていなかったクラミジア (*Chlamydia*) は感染力が強いいため簡単に感染・伝播し注意が必要である。*Chlamydia* は従来トラコーマや、非淋菌性尿道炎、肺炎などが重要な疾患とされてきましたが、近年 *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) と動脈硬化の関係が報告され注目されている。これは動脈硬化の部分から歯周病の原因菌である *Porphyromonas*

gingivalis などと並び、*C. pneumoniae* が数多く発見されているからです。更に心筋梗塞との関連も示唆されています。このように、従来無関係とされた疾患との関連性が示されて来ている。また、細菌との相互作用や相乗相加作用などに関しても、全く評価されてきていない。これら基本的な解析がなされてきていないのは、クラミジアの増殖機構が不明である事に起因しており、そのため、感染の制御法を開発し、更なる効果的な治療法の確立を戦略的に検討する事ができなかった。今回我々は、口腔内細菌との相互作用によつ

て、心筋梗塞等の疾患を増強させている可能性もあると考え、基本的な口腔細菌の炎症抑制活性をターゲットにし、全く新規な TNF- α 抑制剤を用いた、基礎的な研究を行った。

2. 研究の目的

一般に *Chlamydia* の治療法は、マクロライド系やニューキノロン系、あるいはテトラサイクリン系抗生物質が処方されるが、咽頭に感染した場合は、性器に感染した場合と比較すると、完全消失するまでの日数が約2倍かかるとも言われている。2004年より保険適応となった *Chlamydia* の治療薬アジスロマイシン 1000mg の1回投与を実施したケースでは、治療終了後22日目にPCR法で検査すると、*Chlamydia* の除菌率は子宮頸管では100%に対し、咽頭では86%だったという報告があり、咽頭感染の場合7人に1人は除菌に失敗する計算になる。このように、咽頭に *Chlamydia* が感染すると排除する事が難しく、真に効果的な治療法があるとは言えない状況である。

口腔内には、多種多様の細菌が共生しているが、*C. pneumoniae* に限らず歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* や、ウ蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* が心筋梗塞や動脈硬化と関連がある事が示されている。

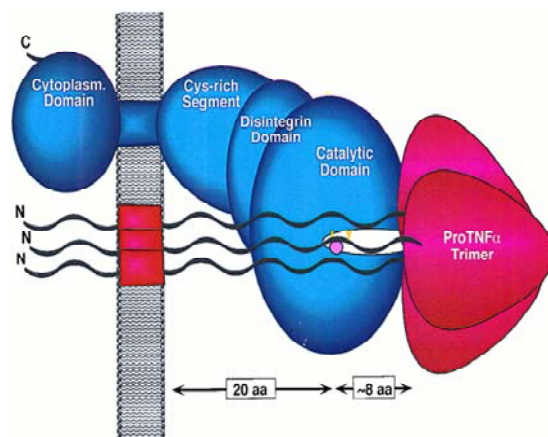
今回我々は、口腔内細菌やクラミジアが、お互いに局所的な炎症を増強し合う事等を筆頭に、どのような機序で心疾患を発症させるのか？また、その制御法に関して検討されてきていない事から、詳細な検討を行う。すなわち、口腔細菌やクラミジアが起因する疾患に関して基礎的情報を取得し、疾患への関連性や他の菌種との相互作用等に関しての新たな知見を得る事を目的としている。

3. 研究の方法

今回我々は、免疫反応の最上流に位置される TNF α に注目した。TNF α は、他の炎症性サイトカインの産生を促し、感染個体を細菌感染を引き金に免疫系を駆動させる事で感染防御を促し、炎症を著しく増強する働きがある。この炎症の増強作用は、マクロファージなどの貪食細胞を著しく活性化させ、動脈硬化などを負の方向へ増強する可能性が考えられる。また、TNF α の活性を抑制する事は、免疫応答を負に調節する事が知られており、リウマチなどの生物学的薬剤で認められるように、感染個体を易感染性にする恐れもある。

我々は、まず歯周病原細菌にターゲットを絞り検討を行う事にした。なぜなら、口腔内常在菌が、心臓へ到着するには、口腔内からの血流に乗って到着するしか無く、その原因と

考えられる事として、外科的な処置によって血流に乗る可能性と、歯周疾患など局所の歯肉に生じる炎症から血流に乗る可能性が考えられるからである。外科的処置の場合は、既に心疾患にリスクが高い患者には、あらかじめ抗菌薬の事前投与が行われるが、歯周疾患の場合は、日常での抗菌薬の投与などを始めとする、医学的な予防対策が困難であるからである。逆説的に言えば、今回我々が用いる TNF α 阻害剤は、日常行う歯磨き粉などに混ぜる事で炎症を抑制し、歯周疾患の予防に繋がれば、極めて有用であると考えられる。我々は、まず新規 TNF α の無細胞系でのインビトロにおける系での抗 TNF α 活性を評価した。TNF α 産生は、TACE (TNF- α converting enzyme) と呼ばれるメタロプロテアーゼによって切断される事で TNF α が遊離し広範囲に炎症のシグナルを広める事が可能であるが、我々は細胞内での TNF α の産生を阻害する薬剤ではなく、膜上に提示されたプロ TNF α の切断を抑制する TACE 阻害剤を用いた。



無細胞系での TACE 阻害剤が十分に活性を持つ事が確認できた後、細胞系にて本薬剤が TNF α 産生を抑制可能かどうか、評価した。細胞の刺激には、大腸菌と *Agreggatibacor Actiomicetemcomitance* 並びに *Porphyromonas gingivalis* の LPS、または、*Porphyromonas gingivalis* の全菌体を用いた。*Porphyromonas gingivalis* の LPS は、他の菌と異なり Toll-like receptor 4 に対するアゴニストではなくアンタゴニストとして働くと言う報告もありその真偽は未だ不明であるが、他の LPS と比べて TNF α 産生能が低いため、全菌体でも検討を行った。

TNF α の産生は、ウェスタンブロット法を用いたタンパクレベルで評価を行うと共に、mRNA レベルで抗 TNF α 製剤が TNF α の産生に影響をもたらしていない事をも確認し、理論上の作用機序で TNF α の産生が抑制されている事を同時に確認した。

インビトロの評価を行うと同時に、インビボでの評価系の検討を行った。現在、歯周病原細菌感染による自然発症動物モデルが殆どなく、系の確率から検討を行った。

我々は、この評価系は歯肉を擦加させる事で、心疾患モデルにもなり得ると考えている。すなわち、このモデル動物実験は、実際の歯周疾患からの心疾患の影響も検討評価可能な系である。

我々は、ラットを用い CMC (カルボキシメチルセルロース) にエマリュジョンさせた *Agreggatibacor Actiomicetemcomitance* 又は *Porphyromonas gingivalis* を歯肉に接種した。これを一日おきに五回行った後、一ヶ月後に屠殺し、ラットの顎骨の骨吸収レベルで歯周病の評価をした。また、TNF α の産生抑制評価は、口腔から腸に直接 TACE 阻害剤を投与した後、腹腔に生菌もしくは LPS を投与した後の、経時的な血中の TNF α の量をエライザ法により測定する事で評価した。

4. 研究成果

新規 TACE 阻害剤は、無細胞系で効果的に酵素活性を抑制できる事が明らかとなり、選択制も高い事が分かった。

また、細胞系での評価では、新規新規 TACE 阻害剤が TNF α の mRNA の産生に影響を与えず、細胞表面に TNF α が産生している事が分かった。

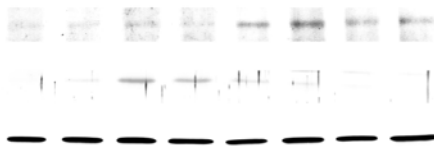


図 上段 TACE、中段膜型 TNF α 、下段 β -actin。レーン左から、時間 (h) 0、0.5、1.0、1.5、3.0、6、12、24。

また、TACE 阻害剤を処理する事で、効果的に細胞レベルでも TNF α の産生を抑制できる事も確認した。

動物実験では、プレリミナリーの実験から、*Porphyromonas gingivalis* を歯肉に接種する事で、有意に骨吸収が認められ、歯周病を発症したと判断できた。

動物実験における TNF α の産生抑制評価は、TACE 無処理のラットは、血中の TNF α の産生が 90 分をピークに産生増強が認められたが、TACE 阻害剤をあらかじめ処理する事で、有意に血中の TNF α の 3 阿世量の減少が認められた。

これらの結果から、歯周病原菌である Pg は in vitro において TNF- α 産生を誘導し、炎症反応を増大させ、動脈硬化などの増悪因子となりうると思われた。新規の TNF- α 阻害剤は、効率よく TNF α の産生を抑制した事から、動脈硬化を始めとする疾患を抑制する可能性が考えられた。In vivo でも同様の結果が得られた。

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 6 件)

1. Iwaya Y, Machigashira M, Kanbara K, Miyamoto M, Noguchi K, Izumi Y, Ban S. Surface Properties and Biocompatibility of Acid-etched Titanium. Dent Mater J 2008; 27(3): 415-421. (査読有り)
2. Takeuchi H, Setoguchi T, Machigashira M, Kanbara K, Izumi Y. **Hydrogen sulfide inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest via an elevated p21 Cipl level in Ca9-22 cells.** J Periodontal Res. 2008 Feb;43(1):90-5. (査読有り)
3. Yamashita D, Sato H, Miyamoto M, Machigashira M, Kanbara K, Ban S. Apatite coating on zirconia using glass coating technique. J Ceram Soc Jpn. 2008; 116(1349): 20-22. (査読有り)
4. Daisuke Yamashita., Kenji Kanbara., Miho Machigashira., Motoharu Miyamoto., Hideo Sato., Yuichi Izumi., Seiji Ban. : **Proliferation of Osteoblast-like Cells on Zirconia/alumina Nanocomposite.** *Key Engineering Materials Vols. 361-363 (2008) pp 1099-1102* (査読有り)

5. Yamashita D, Sato H, Miyamoto M, Machigashira M, Kanbara K, Ban S. Apatite coating on zirconia using glass coating technique. Archives of Bioceramics Research 2007; 7: 269-272. (査読有り)

6. M. Miyamoto, D. Yamashita, H. Kono, H. Takeuchi, K. Kanbara, M. Machigashira, Y. Izumi and S. Ban **Evaluation of biocompatibility with bioactive surface modification of Titanium.** Archives of Bioceramics Research; 6; .312-314, 2006 (査読有り)

[学会発表] (計1件)

M. Miyamoto, D. Yamashita, H. Kono, H. Takeuchi, K. Kanbara, M. Machigashira, Y. Izumi and S. Ban ; Evaluation of biocompatibility with bioactive surface modification of Titanium
The 6th Asian BioCeramics Symposium (ABC2006), November 7 - 10, 2006 Bangkok, Thailand.

6. 研究組織

(1)研究代表者

神原 賢治 (KANBARA KENJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：60305141

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し