

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 年-2008 年

課題番号：19592132

研究課題名（和文） 歯周病原性バイオフィーム形成における細菌間相互作用の
プロテオミクス解析

研究課題名（英文） Proteomics analysis of bacterial interaction in biofilm

研究代表者

石原和幸 (Ishihara Kazuyuki)

東京歯科大学・教授

研究者番号：00212910

研究成果の概要：

難治性根尖性歯周組織炎患者から菌を分離し、それらの菌種間のバイオフィーム形成における相互作用について検討を加えた。得られた菌株のうち複数の菌種間でバイオフィーム形成における相乗効果が認められた。これらのうちその効果が最も顕著に認められた *Fusobacterium nucleatum* と *Porphyromonas gingivalis* 間で相互作用の解析の結果、*P. gingivalis* からの可用性物質によって *F. nucleatum* のバイオフィーム形成が促進され、*F. nucleatum* 菌体のタンパクプロファイルに変化していた。さらにこの組み合わせでの混合感染によって、歯肉上皮細胞および血管内皮細胞への *P. gingivalis* 侵入効率の上昇が認められ、複数の細菌による polymicrobial infection による病原性の変化が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：Biofilm, gene expression, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、特定のグラム陰性嫌気性桿菌群によって引き起こされる感染症である。本疾患は歯肉縁下のグラム陰性桿菌群がその病因に重要な役割を果たしている。歯肉溝内の多菌種によるバイオフィームは、複雑な細菌間相互作用によって作り上げられ、その菌叢の変動によって歯周病原性の高い細菌叢が形成されている。従来までの歯周炎の病因解析は、単独の菌にターゲットを絞ってその病原性の解析が行われ、複数菌による polymicrobial infection としての病因解析はほ

とんど行われておらず、この観点からの解析が必要とされていた。

2. 研究の目的

Polymicrobial infection である歯周炎の病因を明らかにする目的とした。複数菌種の混合感染をシミュレーションした系による歯周病原性の変化の解析を行うため、複数菌種によるバイオフィーム形成のプロセスと宿主細胞への侵入性における細菌間相互作用に focus をあて polymicrobial infection という観点から歯周病原性菌病原性因子の解析を試

みた。

3. 研究の方法

東京歯科大学倫理委員会の承認を得た後、informed consent が得られた患者からサンプル採取を行った。難治性根尖性歯周組織炎の病巣から歯根尖切除手術時に根尖部を採取し、付着している細菌を嫌気培養し分離、同定を行った。得られた歯周病原菌間での、共培養によって biofilm 形成の上昇が認められる組み合わせをスクリーニングした。さらに、これらの組み合わせのうち著明なバイオフィルムの形成促進が認められた *F. nucleatum* と *P. gingivalis* の組み合わせについてさらに解析した。一方を type I collagen coated cell culture 用プレートに接種した。そこに、底部が 0.22 μ l のフィルターになっている inner well を挿入しもう一方の株を接種し、可溶性物質のみがフィルターを通して移行するようにして、plate に形成されるバイオフィルムの形成量の変化を検討した。

さらにこの 2 菌種の混合感染による *P. gingivalis* のヒト歯肉上皮細胞、ヒト動脈内皮細胞侵入の促進作用について、protection assay によって解析を行った。

4. 研究成果

根尖性歯周組織炎から分離された *Fusobacterium nucleatum* TDC 100 と他の細菌種との間でのバイオフィルム形成の解析から、*F. nucleatum* が、*Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus* 等の細菌のバイオフィルム形成促進作用があることを明らかにした (図 1)。

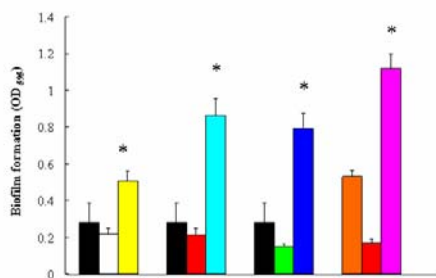


図 1 細菌間のバイオフィルム形成促進作用

この促進作用は、0.22 μ m の膜を介した 2 菌種の混合培養でも認められた。この相乗効果は、どちらの菌株を type I collagen coated cell culture 用 plate に接種した場合にも認められた。これらの結果から、*F. nucleatum* の産生す

る可溶性物質がバイオフィルム形成促進作用を誘導していると考えられた。*F. nucleatum* と共培養した *P. gingivalis* のタンパクプロファイルを解析すると、35 kDa タンパクの発現が上昇していた。このスポットを分離し、アミノ酸配列を解析すると *F. nucleatum* の外膜タンパクであった。

また、*F. nucleatum* と *P. gingivalis* をヒト歯肉上皮細胞および動脈内皮細胞に感染させると、単独で感染させた場合に比べその侵入効率が上昇することを明らかにした。(図 2)

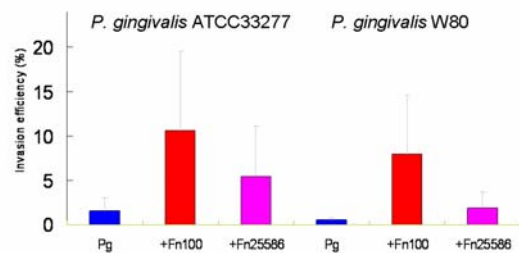


図 2. 混合感染による *P. gingivalis* の動脈内皮細胞への侵入性

これらの結果は、*F. nucleatum* がその産生する可溶性物質によって他の細菌のバイオフィルム形成促進作用を誘導するとともに動脈内皮細胞への侵入のような病原性についても影響を与えていることを示し、polymicrobial infection が歯周病原菌の病原性発揮に重要な役割を果たしていることを明らかにできた。

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 8 件)

① Okuda, T., Kimizuka, R., Miyamoto, M., Kato, T., Yamada, S., Okuda, K. and Ishihara, K., *Treponema denticola* induces interleukin-8 and macrophage chemoattractant protein 1 production in human umbilical vein epithelial cells, *Microb. Infect.*, 9, 907-913, 2007, (査読あり)

② Yamanaka, A., Kouchi, T., Kasai, K., Kato, T., Ishihara, K. and Okuda, K., Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*,

J. Periodontol. Res., 42, 589-592, 2007, (査読あり)

③ Abe, S., Ishihara, K., Adachi, M. and Okuda, K., Tongue-coating as risk indicator for aspiration pneumonia in edentate elderly, Arch. Gerontol. Geriatr., 47, 267-275, 2008, (査読あり)

④ Kobayashi, N., Ishihara, K., Sugihara, N., Kusumoto, M., Yakushiji, M. and Okuda, K., Colonization pattern of periodontal bacteria in Japanese children and their mothers, J. Periodontal Res., 43, 156-161, 2008, (査読あり)

⑤ Saito, A., Inagaki, S., Kimizuka, R., Okuda, K., Hosaka, Y., Nakagawa, T. and Ishihara, K., *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 54, 349-355, 2008, (査読あり)

⑥ Saito, Y., Fujii, R., Nakagawa, K.-I., Okuda, K. and Ishihara, K., Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*, Oral Microbiol. Immunol., 23, 1-6, 2008, (査読あり)

⑦ Fujii, R., Saito, Y., Tokura, Y., Nakagawa, K.-I., Okuda, K. and Ishihara, K., Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions, Oral Microbiol. Immunol., in press, 2009, (査読あり)

⑧ Yamazaki-Kubota, T., Miyamoto, M., Sano, Y., Kusumoto, M., Yonezu, T., Sugita, K., Okuda, K., Yakusiji, M. and Ishihara, K., Analysis of Matrix Metalloproteinase (MMP-8 and MMP-2) Activity in Gingival Crevicular Fluid from Children with Down's Syndrome, J. Periodont. Res., in press, 2009, (査読あり)

[学会発表] (計 28 件)

① Ishihara, K., Induction of Protective Immunity against *Porphyromonas gingivalis* Infection by *rgpA* DNA vaccine, 2007, 55th Annual meeting of Japanese Association for Dental Research, Nov. 17-18, Tsurumi, Japan

② Saito, T., Sakurai, K., Okuda, K. and Ishihara, K., Catecholamine increases *RgpA* expression in *Porphyromonas gingivalis*, J. Dent. Res., 86, 2007, 85th General Session & Exhibition of the IADR / AADR / CADR, March 21-24, New Orleans, USA

③ 稲垣覚, 奥田克爾, 石原和幸, *Treponema denticola* 表層プロテアーゼ dentilisin による病原性発現, 日本再生歯科医学会誌, 2007, 第 5 回日本再生歯科医学会, 9 月 22-23, 東京

④ 稲垣覚, 奥田克爾, 石原和幸, *Treponema denticola* 表層プロテアーゼ dentilisin による病原性発現, 歯科学報, 107, 471, 2007, 第 284 回東歯学会総会, 千葉

⑤ 久保田智子, 宮本 暦, 米津卓郎, 佐野由美子, 奥田克爾, 石原和幸, 薬師寺 仁, Down 症候群歯肉溝滲出液中 MMP の検索, 障害者歯科, 28, 237, 2007, 第 24 回日本障害者歯科学会, 11 月 24-25, 長崎

⑥ 君塚隆太, 石原和幸, 加藤哲男, 奥田克爾, *Treponema denticola* は極性上皮細胞内に侵入する, Journal of Oral Biosciences, 49, 164, 2007, 第 49 回歯科基礎医学会, 8 月 30-31, 札幌

⑦ 石原和幸, アンチエイジング治療と再生医療 *rgpA* DNA vaccine による歯周炎予防抗体の誘導, 日本再生歯科医学会誌, 2007, 第 5 回日本再生歯科医学会, 9 月 22-23, 東京

⑧ 村松恭太郎, 山本勇人, 片倉朗, 柴原孝彦, 奥田克爾, 石原和幸, Hgp44 DNA vaccine による防御性抗体誘導, 歯科学報, 107, 224, 第 283 回東京歯科大学学会, 千葉

⑨ 村松恭太郎, 片倉朗, 柴原孝彦, 奥田克爾, 石原和幸, Hgp44 DNA vaccine による防御性

抗体誘導, *Journal of Oral Biosciences*, 49, 130, 2007, 第 49 回歯科基礎医学会, 8 月 30-31, 札幌

⑩ 竜正大, 上田貴之, 櫻井薫, 齋藤貴之, 石原和幸, 口腔細菌数に老化が与える影響, *日本再生歯科医学会誌*, 5, 55, 2007, 第 5 回日本再生歯科医学会, 9 月 22-23, 東京

⑪ 竜正大, 上田貴之, 櫻井薫, 齋藤貴之, 石原和幸, 唾液中細菌数への唾液量と舌苔付着の影響, *老年歯科医学*, 22, 184-185, 2007, 第 18 回老年歯科医学会総会, 6 月 20-22 日, 札幌

⑫ 竜正大, 上田貴之, 櫻井薫, 齋藤貴之, 石原和幸, 老化と口腔細菌数との関係, *歯科学報*, 107, 471, 2007, 第 284 回東歯学会総会, 千葉

⑬ 君塚隆太, 加藤哲男, 岡田あゆみ, 橋本貞充, 石原和幸, *Rough* 型 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* はアミロイド様物質を形成する, *Journal of Oral Biosciences*, 50, 213, 2008, 第 50 回歯科基礎医学会, 9 月 23-25, 東京

⑭ 石原和幸, 歯周病の動脈硬化への関わり, *日本心臓病学会誌*, 2, 205, 2008, 第 56 回日本心臓病学会, 9 月 8-10 日, 東京

⑮ 石原和幸, 歯周病原性菌プロテアーゼの病原性解析, *日本歯周病学会会誌*, 50, 51, 2008, 第 51 回春期日本歯周病学会, 4 月 24-25 日, 大宮

⑯ 村松恭太郎, 片倉朗, 柴原孝彦, 奥田克爾, 石原和幸, Hgp44 DNA vaccine による *Porphyromonas gingivalis* 感染骨吸収の防御作用, *日本細菌学雑誌*, 63, 158, 2008, 第 80 回日本細菌学会, 3 月 24-26, 京都

⑰ 田中公子, 伊藤理恵子, 新谷誠康, 薬師寺仁, 石原和幸, *Treponema denticola* の bacterial immunity protein の解析, *歯科学報*, 108, 394, 第 286 回東歯学会, 千葉

⑱ 竜正大, 上田貴之, 櫻井薫, 安井雅子, 齋

藤貴之, 石原和幸, 無歯顎者の唾液中細菌叢に影響をおよぼす因子の探索, *老年歯科医学*, 23, 156-157, 2008, 19 回老年歯科医学会総会, 岡山

⑲ 齋藤淳, 稲垣覚, 君塚隆, 石原和幸, *Fusobacterium nucleatum* は *Porphyromonas gingivalis* の宿主細胞侵入を促進する, *Journal of Oral Biosciences*, 50, 115, 2008, 第 50 回歯科基礎医学会, 9 月 23-25, 東京

⑳ 齋藤淳, 稲垣覚, 君塚隆太, 中川種昭, 山田了, 石原和幸, 歯周病原菌の Polymicrobial 感染による宿主細胞への侵入解析, *日本歯周病学会会誌*, 50, 120, 2008, 第 51 回秋期歯周病学会, 10 月 19-20 日, 四日市

㉑ 稲垣覚, 齋藤淳, 君塚隆太, 石原和幸, 歯周病原菌 *Treponema denticola* のヒト歯肉上皮細胞への侵入, *日本細菌学雑誌*, 64, 164, 2009, 第 81 回日本細菌学会総会, 3 月 12-14, 名古屋

㉒ 君塚隆太, 加藤哲男, 岡田あゆみ, 石原和幸, 橋本貞充, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* rough 型集落形成株のアミロイド形成, *日本細菌学雑誌*, 64, 185, 第 81 回日本細菌学会総会, 3 月 12-14, 名古屋

㉓ Sano, Y., Miyamoto, M., Ito, R., Matsumoto, N., Yakushiji, M., Shintani, S. and Ishihara, K., *Treponema denticola* dentilisin involves to coaggregation with *Porphyromonas gingivalis*, 2008, Japanese Association for Dental Research, Nov. 29-30, Nagoya

㉔ Aoki, M., Ishihara, K., Takanashi, K., Honma, S., Ito, T., Yajima, K., Okuda, K. and Sato, T., Transmission of periodontopathic bacteria from natural tooth to implants, *J. Dent. Res.*, 2008, 86th General Session & Exhibition of the International Association for dental Research, Jul. 2-5, Tronto, Canada

㉕ Inagaki, S., Kimizuka, R., Okuda, K. and Ishihara, K., *Treponema denticola* invasion of

human gingival epithelial cells, J. Dent. Res., 2008, 86th General Session & Exhibition of the International Association for dental Research, Jul. 2-5, Tronto, Canada

②⑥ Ishihara, K., Wawrzonek, K., Shaw, L.N., Inagaki, S., Okuda, K. and Potempa, J., Characterization of dentipain, a Streptococcus-pyogenes-Ides-protease homologue in *Treponema denticola*, J. Dent. Res., 2008, 86th General Session & Exhibition of the International Association for dental Research, Jul. 2-5, Toronto, Canada

②⑦ Muramatsu, K., Miyachi, K., Shibahara, T., Okuda, K. and Ishihara, K., HGP44 reduces *Porphyromonas gingivalis* induced alveolar bone loss in mice, J. Dent. Res., 2008, 86th General Session & Exhibition of the International Association for dental Research, Jul. 2-5, Toronto, Canada

②⑧ Ryu, M., Ueda, T., Sakurai, K., Saito, T. and Ishihara, K., Aging affects oral microflora in Japanese elderly, J. Dent. Res., 2008, 86th General Session & Exhibition of the International Association for dental Research, Jul. 2-5, Tronto, Canada

[図書] (計 1 件)

石原和幸, 著分担, 口腔と全身疾患, 中原泉, 鴨居久一 編, クインテッセンス出版, 東京

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
なし

○取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原 和幸 (Kazuyuki Ishihara)

東京歯科大学・教授
研究者番号: 00212910

(2)研究分担者

井上 孝 (Inoue Takashi)

東京歯科大学・教授

研究者番号: 20125008

君塚 隆太 (Kimizuka Ryuta)

東京歯科大学・講師

研究者番号: 90287178

山中 あゆみ (Yamanaka Ayumi)

研究者番号: 40231667

東京歯科大学・助教

(3)連携研究者

なし