

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19266

研究課題名(和文) Porphyromonas gulae の歯肉上皮細胞侵入機構に関する線毛の役割

研究課題名(英文) Role for fimbriae in Porphyromonas gulae invasion of oral epithelial cells

研究代表者

吉田 翔 (Yoshida, Sho)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40801048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物由来歯周病原菌 Porphyromonas gulae について、線毛遺伝子 A/B/C 各保有株の付着侵入能を比較し、歯肉上皮細胞侵入能と P. gulae 線毛遺伝子型との関連性を解明した。また宿主細胞の特定の機能を抑制する阻害剤を用いて P. gulae の宿主細胞への付着侵入経路を解析した。将来的に線毛の病原性を明らかにするため、線毛欠損株の作製も行った。C型線毛保有 D049 株をもとに fimA 遺伝子の欠損部位にエリスロマイシンカセットを挿入し、線毛欠損株を完成させた。これにより今後引き続いて線毛の病原性を解析するための材料を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物由来歯周病原菌 Porphyromonas gulae は伴侶動物を飼育する歯周病患者の病変部プラークから高頻度で検出され、歯周病は動物由来の P. gulae 感染による人獣共通感染症である可能性が考えられ始めている。本研究により P. gulae のヒト歯肉上皮細胞への感染経路が解析され、併せて線毛の歯周病発症における役割を解明した。これらの成果をもとに P. gulae 感染と歯周病発症の関連性が明らかとなり、人獣共通感染症としての歯周疾患の治療法・予防法開発へと繋げる狙いがある。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gulae strains, classified into three genotypes (A, B, C) based on the diversity of fimA genes, were compared their human epithelial cells adhesion/invasion ability each other. We have shown the relation between invasion ability and fimA genotypes of P. gulae. And by using inhibitors suppress specific functions of the host cells, we have investigated the host cell adhesion/invasion routes of P. gulae. Furthermore we prepared fimA knockout P. gulae strain to evaluate pathogenesis of the fimbriae. The mutant strain based on P. gulae D049 has type C fimA gene was constructed by insertion erythromycin cassette into the fimA gene. The mutant strain will be used to investigate details of fimbriae pathogenesis.

研究分野：歯周病原菌

キーワード：歯周病原菌 線毛 fimA 歯肉上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

P. gulae は、ヒト由来歯周病原菌 *P. gingivalis* 類似細菌の新種として 2001 年に様々な動物種から発見された。伴侶動物を飼育する歯周病患者の病変部プラークから *P. gulae* が高頻度で検出され、*P. gingivalis* と共に検出される患者は歯肉の炎症や骨吸収が見られる。一方、伴侶動物を飼育しない歯周病患者からは *P. gulae* の検出は全く認められず、歯周病は動物由来の *P. gulae* 感染による人獣共通感染症である可能性が考えられ始めている。また犬や猫の咬傷感染による敗血症が報告されており、動物種に常在する菌による感染症の成立を理解するためにも、*P. gulae* 感染と歯周病発症の関連性を明らかにすることは重要な課題の 1 つである。

歯周病菌は、宿主免疫や上皮バリアなどの感染防御機構を突破して感染を成立させ、歯周病発症に至る。細胞への付着・侵入は菌体表層にある線毛が大きな役割を果たす。*P. gulae* は線毛の存在が確認されており、研究代表者が所属するグループは *P. gulae* 線毛遺伝子が A/B/C 型の 3 つの型に分類されることを明らかにした。ヒト由来歯周病原菌 *P. gingivalis* では線毛遺伝子タイプ別に宿主細胞への付着・侵入の違いが既に確認されている。*P. gulae* と *P. gingivalis* の線毛遺伝子の相同性は 94%、線毛タンパクのアミノ酸配列の相同性は 97%を示す。このことから、*P. gulae* の宿主細胞への付着・侵入も線毛遺伝子別に異なることが推測される。申請者は、リコンビナント線毛を用いた線毛遺伝子多型と病原性との関連性をカイコモデルにより明らかにした。

このような研究結果から、*P. gulae* の歯肉上皮細胞への付着侵入メカニズムの解析をベースに、線毛の歯周病発症における役割を解明することで、*P. gulae* 感染と歯周病発症の関連性を明らかにできる可能性を考えた。

2. 研究の目的

動物由来歯周病原菌 *Porphyromonas gulae* は、ヒト歯周組織、特に歯周病変部位から検出されることが知られている。そのため歯周病は本菌による人獣共通感染症である可能性が考えられているが、*P. gulae* 感染と歯周病発症との関連性は依然未解明である。*P. gulae* のヒト歯肉上皮細胞への感染経路を明らかにして、歯周病発症を詳細に理解すること、また線毛遺伝子多型と病原性との関連性を解明し、その予防法の開拓に繋がる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *P. gulae* 感染歯肉上皮細胞株を用いた解析

ヒト歯肉上皮細胞株は Ca9-22 細胞株 (歯肉癌由来; JCRB0625) を使用する。*P. gulae* の付着侵入能ならびに *P. gulae* 線毛遺伝子 A/B/C 各保有株 6 株の付着侵入能を比較することで、上皮細胞侵入機構と *P. gulae* 線毛遺伝子型との関連性を解明する。

(2) *P. gulae* 付着侵入経路の解析

真核細胞の形態を維持するタンパク、増殖のためのタンパク合成、情報伝達、生存に必要なエネルギー代謝などに関わる代謝阻害剤が *P. gulae* または宿主細胞の特定の機能を抑制し、*P. gulae* 感染に生じる影響を検討することで *P. gulae* 付着侵入の機序を調べる。歯肉上皮細胞に各種阻害剤や中和抗体を加えた群と、ヒト血清を加えた群を準備し、細胞に *P. gulae* を感染させる。曝露させた菌のうち細胞内に侵入しなかった菌を抗菌薬で除去し、滅菌水で細胞を破裂させ、ライセートを段階希釈する。これを血液寒天培地に播種して嫌気培養を行い、形成コロニー数から *P. gulae* 細胞侵入能を評価する。また各種インテグリン中和抗体を用いて同様に解析する。

(3) *P. gulae* 線毛欠損株の作製

線毛遺伝子 (AB679295.1) が解読されている C 型線毛保有 D049 株を用いる。フュージョン PCR 法で、*fimA* 遺伝子内にエリスロマイシンカセットを挿入した領域を持つプラスミドを作製し、エレクトロポレーションにより D049 菌体内に導入することで *fimA* 遺伝子変異株とする。変異株の作製後はまず PCR 法を実施し、*fimA* 遺伝子領域がカセット挿入によって拡大されていること、かつカセットの方向が正しいことを確認する。さらに抗線毛抗体を一次抗体としたウェスタンブロットングを行い、変異株が抗線毛抗体に標識されないことを確認する。その後プロモーター領域を含む *fimA* 遺伝子を持つプラスミドを作製し、エレクトロポレーションによって変異株の菌体内に導入することで、欠損部位に再び元の *fimA* 遺伝子を挿入した菌株を作製し、病原性が復元されることを確認する。

4. 研究成果

P. gulae 線毛遺伝子 A/B/C 各保有株の付着侵入能を比較し、上皮細胞侵入能と *P. gulae* 線毛遺伝子型との関連性を解明した。その結果すべての菌株は歯肉上皮細胞に付着する一方で、B 型線毛保有 D040 株と C 型線毛保有 D049 株および ST9-1 株に侵入能がみられた (図 1)。これにより C 型線毛保有株が歯肉上皮細胞に対し高い侵入能を持つ可能性が示唆された。

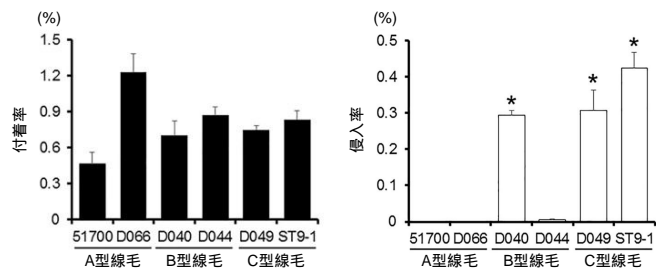


図1: *P. gulae* 各株のヒト歯肉上皮細胞への付着・侵入率

阻害剤	標的	付着抑制率 (%)	侵入抑制率 (%)
サイトカラシンD	アクチン	23.86 ± 2.76	56.47 ± 1.20
ノコダゾール	微小管	7.61 ± 3.51	4.12 ± 2.26
スタウロスポリン	プロテインキナーゼC	3.16 ± 2.27	41.80 ± 4.97
シクロヘキサミド	タンパク合成	4.71 ± 2.91	6.07 ± 2.24
アジ化ナトリウム	エネルギー代謝	11.4 ± 1.75	61.17 ± 4.70

図2: 阻害剤による細胞付着侵入抑制能の比較

P. gulae 付着侵入経路を明らかにするために、宿主細胞の特定の機能を抑制する阻害剤を用いた (図 2)。サイトカラシン D により付着ならびに侵入が抑制されたことから、*P. gulae* の付着・侵入には宿主細胞のアクチン重合が深く関与することが示された。またスタウロスポリンやアジ化ナトリウムにより *P. gulae* の侵入が抑制されたことから、細胞内のプロテインキナーゼ C やエネルギー代謝が菌の細胞内侵入に関与している可能性が示唆された。さらに菌のプロテアーゼも宿主細胞の付着侵入に大きな役割を果たしていることが明らかとなった。

将来的に線毛の病原性を明らかにするため、線毛欠損株の作製も行った。C 型線毛保有 D049 株の cDNA をもとにフュージョン PCR 法を用いて *fimA* 遺伝子の欠損部位にエリスロマイシンカセットを挿入し、線毛欠損株を完成させた (図 3)。これにより今後引き続き線毛の病原性を解析したいと考えている。

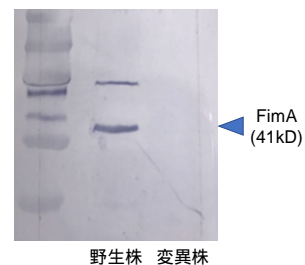


図3: 線毛タンパクの FimA 発現をウェスタンブロットングで観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nomura Ryota, Inaba Hiroaki, Matayoshi Saaya, Yoshida Sho, Matsumi Yuki, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 62
2. 論文標題 Inhibitory effect of a mouth rinse formulated with chlorhexidine gluconate, ethanol, and green tea extract against major oral bacterial species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 206 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.18-0483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Ryota, Inaba Hiroaki, Yasuda Hidemi, Shirai Mitsuyuki, Kato Yukio, Murakami Masaru, Iwashita Naoki, Shirahata So, Yoshida Sho, Matayoshi Saaya, Yasuda Junya, Arai Nobuaki, Asai Fumitoshi, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibition of Porphyromonas gulae and periodontal disease in dogs by a combination of clindamycin and interferon alpha	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 311 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59730-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inaba Hiroaki, Yoshida Sho, Nomura Ryota, Kato Yukio, Asai Fumitoshi, Nakano Kazuhiko, Matsumoto Nakano Michiyo	4. 巻 22
2. 論文標題 Porphyromonas gulae lipopolysaccharide elicits inflammatory responses through toll like receptor 2 and 4 in human gingivalis epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 翔
2. 発表標題 Porphyromonas gulae プロテアーゼによる歯肉上皮細胞傷害能の評価
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------