

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592398

研究課題名(和文) 歯周病細菌感染によるマクロファージ泡沫化と血管傷害機構

研究課題名(英文) Foam cell formation and atherosclerosis induced by periodontal pathogens.

研究代表者

岡橋 暢夫 (OKAHASHI NOBUO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40150180

研究成果の概要(和文)：近年、様々な研究により、動脈硬化に歯周病細菌や口腔レンサ球菌が関与している可能性が指摘されている。本課題では、動脈硬化の主要な原因となる泡沫細胞の形成にこれらの細菌が関与している可能性を研究した。ヒトマクロファージ株 THP-1 を用い、歯周病細菌および口腔レンサ球菌感染による泡沫細胞形成促進のメカニズムを調べた。いずれの細菌も菌の生死に関わらずマクロファージからの泡沫細胞形成を促進し、口腔レンサ球菌 *S. sanguinis* に関しては、生菌感染の場合、菌数が多いとマクロファージが細胞死を引き起こすことが判明した。この細胞死に関して inflammasome の関与の有無を調べたところ、caspase-1 の活性化は見られず、むしろ活性酸素の関与が考えられた。口腔レンサ球菌がマクロファージの泡沫化を促進するという本研究の成果は新知見であり、これらの菌が感染性心内膜炎のみならず歯周病細菌と同様に心臓血管疾患にも関与している可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Recent investigations suggest that one of the risk factor of atherosclerosis is periodontitis. In the study, we found that oral *S. sanguinis* stimulates foam cell formation from human macrophage cell line THP-1. Both viable and heat-killed *S. sanguinis* was capable of inducing foam cell formation. However, large amount of viable cells induced cell death of infected macrophages. The cell death was found to be related to the production of reactive oxygen species. These results suggest possible involvement of oral streptococci in the pathogenesis of atherosclerosis as well as in that of infectious endocarditis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：口腔細菌学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：口腔レンサ球菌、泡沫細胞、マクロファージ、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

欧米や日本など先進国の多くの国々では、死因の上位を脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化に由来する疾患が占めている。従来、これらの心臓血管疾患は歯周病とは無関係であると考えられていたが、近年の大規模な疫学調査の結果、歯周病が実は動脈硬化などの心血管疾患のリスクファクターであることが判明し、歯周病細菌が単に歯周局所に慢性的な炎症を起こすだけの細菌ではないことが明白になってきた。

動脈硬化病巣の形成においては、マクロファージが Low density lipoprotein (LDL) を取り込んで泡沫細胞となる過程が重要である。脂質を多量に蓄えた泡沫細胞が動脈内壁に沈着し、病変が形成されることが動脈硬化の進行に重要な役割を果たしている。歯周病細菌のマクロファージの泡沫化に及ぼす影響については、わずかに数報、しかも、単に歯周病細菌による刺激がマクロファージの泡沫化を促進するという記載にとどまっており、その機構についてはほとんど何も知られていない。

2. 研究の目的

本申請では、歯周病細菌および口腔レンサ球菌感染によるマクロファージの泡沫化の細胞生物学的機構の解明を目的とした。また、口腔細菌がマクロファージや血管内皮細胞の炎症応答に及ぼす影響、泡沫細胞の病巣部への集積との関連を調べ、心臓循環器疾患における口腔細菌の病原性に新たな光が当てることが最大の狙いである。

3. 研究の方法

ヒトマクロファージとして THP-1 細胞を、口腔細菌として歯周病細菌 *A. actinomycetemcomitans* (*A. a.*) と口腔レンサ

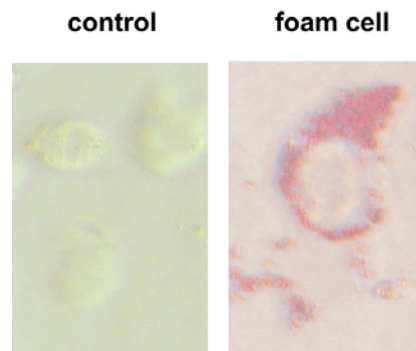
球菌 *S. sanguinis* を用いる。LDL 存在下で THP-1 に口腔細菌を感染させ、泡沫化の促進の有無を調べる。その際、マクロファージからどのようなサイトカインや炎症メディエーターが産生されるかを調べ、さらに菌側のどのような病原因子が泡沫化に関与しているのかを探求する。

4. 研究成果

(1) マクロファージの泡沫化とサイトカイン産生
まず、マクロファージの泡沫化に及ぼす口

図1 口腔細菌刺激による泡沫化

腔細菌感染の効果を検討した。マクロファ-



ジに A. a. 加熱死菌体あるいは同菌 LPS を添加し、変性 LDL を加えて培養したところ、50-60% の細胞においてオイルレッドで染色される油脂滴を細胞内に認め、泡沫化が促進されることが明らかになった(図1)。

近年新しく発見されたサイトカイン IL-32 は様々な炎症応答に関与していることが報告されている。そこで、泡沫化の際に IL-32 の発現が促進されるかどうかを調べた。その結果、歯周病細菌で刺激すると IL-32 の mRNA レベルが数 10 倍、LPS でも 5-6 倍に上昇することが明らかになった。

(2) 口腔レンサ球菌による細胞死

次に口腔レンサ球菌でもマクロファージの泡沫化が促進されるのかどうかを調べた。その結果、口腔レンサ球菌 *S. sanguinis* でも泡沫化が誘導されるが、生菌感染では MOI = 50 以上でマクロファージの細胞死が

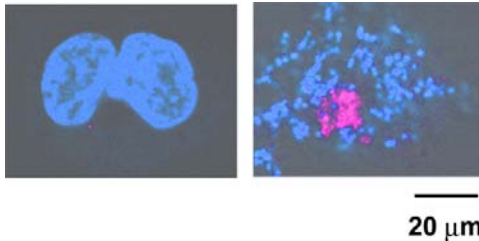


図2 *S. sanguinis* 感染による細胞死

見られた(図2)。*S. sanguinis* 感染による細胞死の際にサイトカイン IL-1 が産生されること、ATP が培地中に遊離することが判明し、自然免疫応答に関与している inflammasome の活性化が考えられた。そこで caspase-1 の活性化をウェスタンブロット法などで検討したが、caspase-1 の活性化が起きているという知見は得られなかった。細胞死に伴って活性酸素が産生されることから、IL-1 の産生は inflammasome の活性化の結果ではなく、感染による活性酸素が細胞にダメージを与える結果であると考えられた。

(3)細胞死を引き起こす病原因子

A 群レンサ球菌や肺炎球菌に関しては SLO や pneumolysin などの毒素の作用によって細胞死が引き起こされることが知られている。*S. sanguinis* にはそのような毒素は報告されていないため、hemolysin や菌体表層に存在する線毛 pili など病原性に関与する可能性のある遺伝子をゲノム情報をもとにクローニングし、そのノックアウト株を作成してマクロファージの細胞死にどのような病原因子が関与しているのかを調べたところ、pili そのものは細胞死には関与していないものの、フィブロネクチンと結合し、菌の細胞付着に関与していることが明らかになった。

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9件)

① Okahashi N, Nakata N, Terao Y, et al. (計11名)(2011) Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. Microb Pathog 50:148-154. (査読有)

② Sakurai A, Maruyama F, ..., Okahashi N, ..., Ooshima T, et al. (計10名) (2010) S specific behavior of intracellular *Streptococcus pyogenes* that has undergone autophagic degradation is associated with bacterial streptolysin O and host small G proteins Rab5 and Rab7. J Biol Chem 285:2266-2267 5.(査読有)

③ Taniguchi N, Nakano K, Nomura R, ..., Ooshima T. (計7名) (2010) Defect of glucosyltransferases reduces platelet aggregation activity of *Streptococcus mutans*: analysis of clinical strains isolated from oral cavities. Arch Oral Biol 55:410-415.(査読有)

④ Nakano K, Nomura R, Matsumoto M, Ooshima T. (2010) Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases—from molecular mechanisms to clinical cases. J Pharmacol Sci 113:120-125. (査読有)

⑤ Okahashi N, Nakata M, Sakurai A et al. (計11名)(2010) Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. Biochem Biophys Res Commun 391:1191-1196.(査読有)

⑥ Nakano K, Nomura R, ..., Ooshima T. (計12名)(2010) Molecular Characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the

cnm gene encoding a collagen-binding protein. Arch Oral Biol 55:34-39.(査読有)

⑦ Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, ..., Ooshima T.(計7名)(2009) Contribution of cell surface protein antigen c of *Streptococcus mutans* to platelet aggregation. Oral Microb Immunol 24:427-430.(査読有)

⑧ Sakurai A, Okahashi N, Maruyama F et al.(計6名)(2008) *Streptococcus pyogenes* degrades extracellular matrix in chondrocytes via MMP-13. Biochem Biophys Res Commun 373:450-454.(査読有)

⑨ Ohno T, Okahashi N, Morisaki I, Amano A. (2008) Signaling pathways in osteoblast proinflammatory responses to infection by *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol 23:96-104.(査読有)

[学会発表] (計5件)

① Nemoto H, Nakano K, ..., Ooshima T. Detection of amoxicillin-resistant streptococcal species in dental plaque specimens. 88th Conference of International Association of Dental Research 2010年7月16日 バルセロナ、スペイン

② 岡橋暢夫、中田匡宣、他 口腔レンサ球菌 *S. sanguinis* 線毛 pili の機能 第83回日本細菌学会総会 2010年3月27日 横浜市

③ Nakano K, Taniguchi N, .. Ooshima T. Presence of serotype k strains of *Streptococcus mutans* is a potential risk factor for cerebral hemorrhage. 56th ORCA Congress 2009年7月3日 ブダペスト ハンガリー

④ 桜井敦朗、岡橋暢夫、他口腔領域レンサ球

菌による宿主上皮細胞への付着侵入と炎症の誘導 第19回Lancefield レンサ球菌研究会 2009年6月26日 福岡市

⑤ Nakano M, Fujita K, Ooshima T Deficiency of glucan-binding proteins alters gene expression in *Streptococcus mutans* 86th General Session of International Association for Dental Research 2008年7月5日 トロント カナダ
[図書](計1件)

①岡橋暢夫(共著) 改訂版 分子予防環境医学 本の泉社 2010年 307-318頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡橋 暢夫 (OKAHASHI NOBUO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：40150180

(2) 研究分担者

大嶋 隆 (OOSHIMA TAKASHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：80116003