

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09918

研究課題名(和文) 歯周病菌 *P. gulae* が保有する病原因子の分子生物学的解析とその多様性の解明研究課題名(英文) Molecular Biological analysis of virulence factors possessed by animal-derived periodontal pathogen *P. gulae*

研究代表者

稲葉 裕明 (Inaba, Hiroaki)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：70359850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究費では、動物由来歯周病菌 *Porphyromonas gulae* が保有する病原因子(線毛、プロテアーゼ、LPS)の機能解析を行った。

線毛解析：線毛欠損株と相補株を完成させ、歯肉上皮細胞の付着侵入能に影響を及ぼす一方、菌の性状(増殖能、黒色素産生能)に影響をおよぼさなかった。LPS解析：歯肉上皮細胞のトル様受容体2と4の活性から炎症反応までに至るシグナル伝達経路を明らかにした。プロテアーゼ解析：*P. gulae* が保有する血色素凝集能、菌増殖能、*A. viscosus* との共凝集に影響をおよぼすことを明らかにした。また、細胞接着、接着斑、グロブリン等を分解することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

P. gulae 感染は人畜共通感染症の可能性を持ち、人類の歯周病発症に関与する可能性が知らせている。本研究課題により明らかになった *P. gulae* 病原因子群の機能解析を世界に先駆けて報告すると共に、歯周病発症との関連性を明らかにすることができ学術的意義は高いと考えられる。これら明らかになった病原因子群の機能をターゲットにした予防方法、治療方法の開発、ならびに *P. gulae* 感染症に対する創薬につなぐことが出来る一端を証明することができた。また、医療関係者や患者への教育内容を充実させることができ、社会的な意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research fund found the functional analysis of *P. gulae* virulence factors, including fimbriae, proteases, and LPS. Fimbriae analysis: FimA-deficient strain and a complementary strain were used in this study. Fimbriae was involved in *P. gulae* adherence and invasion on human gingival epithelial cells, while their properties, such as bacterial proliferation, black pigmentation, were not. LPS analysis: *P. gulae* LPS modulate the activity of multiple signaling pathways via TLR2 and TLR4, resulting in the increase in inflammatory responses. Protease analysis: *P. gulae* proteases have an impact on hemagglutination, coaggregation with *A. viscosus*, and are required for bacterial growth. In addition, cell contact and adhesion-related human proteins were degraded by *P. gulae* proteases. Moreover, *P. gulae* proteases were shown to cleave α -globulin, fibrinogen, and fibronectin.

研究分野：病態系口腔科学

キーワード：*P. gulae* 線毛 プロテアーゼ LPS 病原因子 歯周病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Porphyromonas gulae は、ヒト以外の動物から分離される *P. gingivalis* 類似性をもつ新種として 2001 年に発見され、2017 年現在 11 種類の動物から分離されている。伴侶動物を飼育する歯周病患者の病変部から *P. gulae* が多く検出され、歯肉炎症や骨吸収が見られるが、伴侶動物を飼育しない歯周病患者からは全く検出されない。このことは、動物を飼育することにより伴侶動物からヒトへ *P. gulae* が直接伝播、歯周病発症に関与すると共に、歯周病は動物由来 *P. gulae* 感染による新たな人獣共通感染症である可能性が考えられる。病原細菌が生体内に侵入し、感染症が成立後、病的症状は細菌が産生する病原因子により進行する。*P. gulae* が保有する病原因子は、線毛の研究が最も進んでいる。研究代表者らは、*P. gulae* 線毛遺伝子は核酸配列の違いにより病原性の異なる A/B/C 型に分類し、その違いが歯肉上皮細胞への付着侵入能が異なる。さらに細胞遊走性を阻害することも証明した。また *P. gulae* が持つ 3 種類の病原因子 (線毛、LPS、プロテアーゼ複合体) の存在を明らかにした。

2. 研究の目的

動物由来歯周病菌 *P. gulae* 病原因子 (線毛、LPS、プロテアーゼ) と歯周病発症メカニズムとの関連性を解明し、理解すると共に、歯周病発症の制御法につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞株と細菌株

実験には、ヒト歯肉上皮癌由来細胞株 Ca9-22 (JCRB細胞バンク ; JCRB0625) を使用した。菌株は *Porphyromonas gingivalis* ATCC3327 (I型線毛)、および *Porphyromonas gulae* ATCC 51700 (A型線毛)、D040 (B型線毛)、D044 (B型線毛)、D049 (C型線毛)、D066 (A型線毛)、ST9-1 (C型線毛) 株ならびに *Actinomyces viscosus* ATCC 15987 を使用した。

(2) 試薬類

LPS精製 :

LPS extraction kit (iNtRON Biotechnology) を用いて精製 (右図)

プロテアーゼインヒビター :

Antipain、PMSF、TLCK、leupeptin を使用

精製タンパク :

ヒトリコンビナントタンパク γ -globulin、fibrinogen、fibronectin を使用

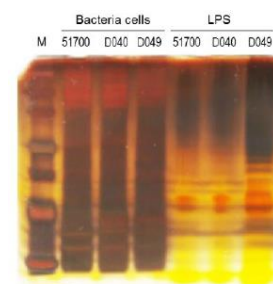


図1 精製した *P. gulae* LPS

(3) 線毛変異株の作成

C型線毛保有株 D049 株 *fimA* 領域 (AB679296.1) を基に上下 500kb の遺伝子配列を解読した。これら解読を行った遺伝子領域を鋳型に、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 (ErmF) を挿入した線毛欠損プラスミドを作成した。相補プラスミドは、線毛欠損プラスミドに *fimA* 領域オープンリーディングフレームと共にテトラサイクリンカセット (TetQ) を挿入して作成した。これらのプラスミドを電気穿孔法により *P. gulae* D049 株に導入し、線毛変異株ならびに相補株を作成した。

4. 研究成果

<LPS>

(1) *P. gulyae* LPS 刺激による TLR2 と TLR4 活性とシグナル伝達の解析

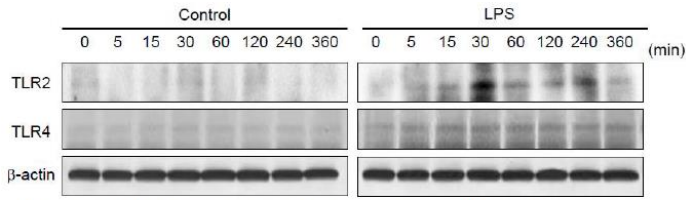


図2 *P. gulyae* LPS 刺激による TLR2 ならびに TLR4 の発現

P. gulyae LPS (D049 株由来) の刺激により、歯肉上皮細胞の TLR2 ならびに TLR4 の発現が上昇した (図2)。続いて下流のシグナル伝達経路の解析 siRNA を用いて行ったところ、TLR2 や TLR4 を介して、ERK1/2 や p38 のリン酸化が誘発されていることが明らかになった (図3)。

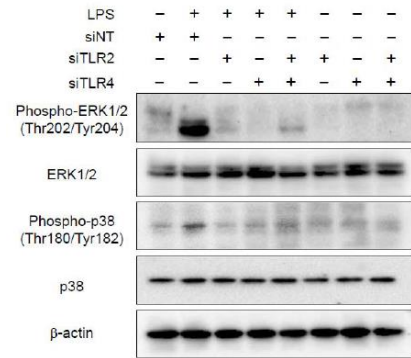


図3 *P. gulyae* LPS 刺激によるシグナル伝達解析

(2) *P. gulyae* LPS 刺激による炎症反応の解析

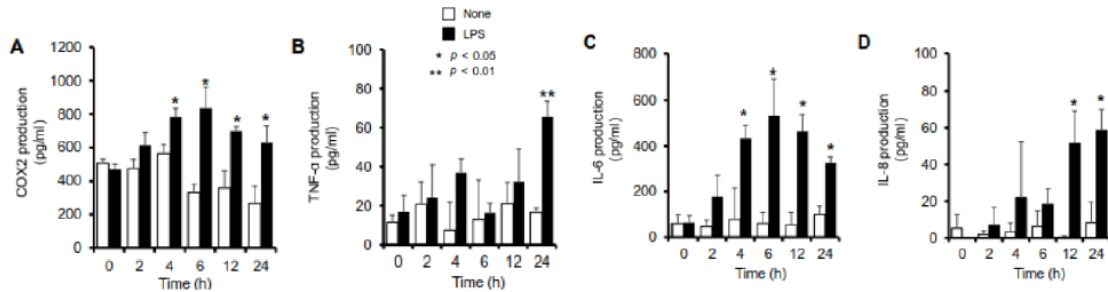


図4 *P. gulyae* LPS 刺激による炎症反応 (ELISA解析)

A: COX2, B: TNF- α , C: IL-6, D: IL-8

P. gulyae LPS の刺激後、歯肉上皮細胞から COX2、TNF- α 、IL-6、IL-8 の分泌が誘導されることを ELISA 解析で明らかにした (図4)。またこれらの炎症反応はリアルタイム PCR 法でも証明した。

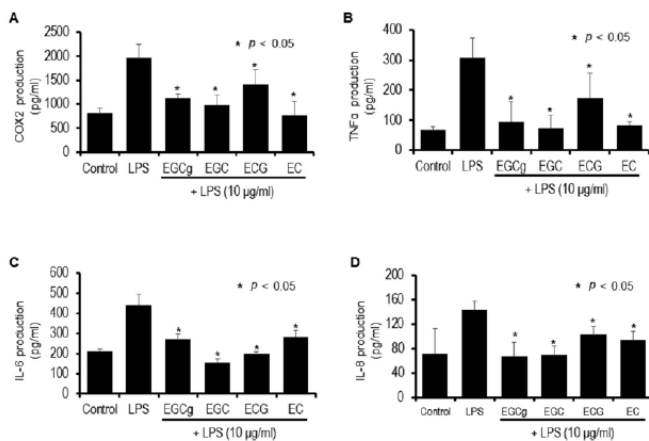


図5 緑茶ポリフェノール群による炎症抑制 (ELISA解析)

A: COX2, B: TNF- α , C: IL-6, D: IL-8

COX2、TNF- α 、IL-6、IL-8 の分泌は、緑茶ポリフェノール群 (EGCg, EGC, ECG, EC) で抑制されることも ELISA 解析により明らかになった (図5)。

これらの結果より、*P. gulyae* LPS は歯周組織の炎症を惹起することが示唆されると共に、*P. gulyae* の抗炎症作用を保有する物質の探索に成功した。

<プロテアーゼ>

(1) *P. gulae* プロテアーゼのトリプシン活性の解析
 続いて *P. gulae* が保有するプロテアーゼの解析を行った。予備実験 (API ケンキ) によりトリプシン活性の保有を確認し、各菌株のトリプシン活性を計測した (図6)。ヒト由来歯周病菌 *P. gingivalis* と同程度のトリプシン活性を保有すると共に、各菌株間の活性に違いは認められなかった。また、プロテアーゼは菌体外にも分泌されることが明らかになった。

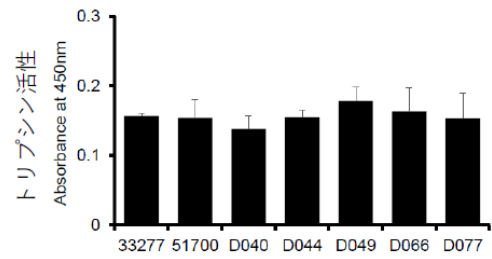


図6 *P. gulae* プロテアーゼのトリプシン活性

(2) *P. gulae* プロテアーゼと菌の生態 (増殖、共凝集) との関連性の解析

P. gulae プロテアーゼと菌の増殖との関連性を明らかにした (図7)。予備実験にて、栄養飢餓状態の培地を使用した *P. gulae* の増殖曲線を確認したところ、144時間で静止期に到達した。各プロテアーゼインヒビターを用いて144時間での菌増殖を確認したところ、増殖が抑制されたことから、*P. gulae* の増殖にプロテアーゼが関与していることが示唆された。

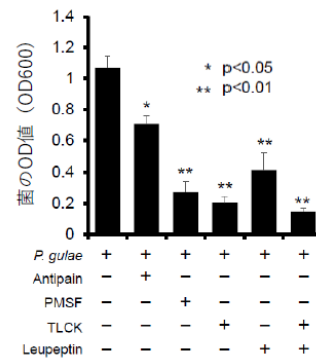


図7 *P. gulae* プロテアーゼと菌の増殖
 培養開始144時間後のデータを示す。

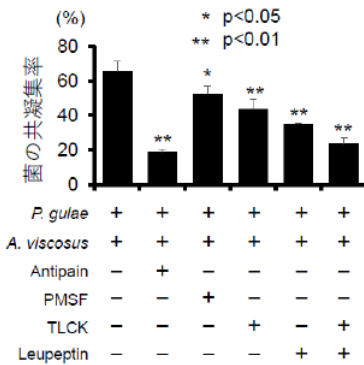


図8 *P. gulae* と *A. viscosus* の共凝集
 共凝集開始48時間後のデータを示す。

続いて、他種の口腔細菌との共凝集を調べるため、*A. viscosus* との共凝集を確認した (図8)。共凝集開始48時間後、プロテアーゼインヒビターにより共凝集が抑制されたことから、*P. gulae* と口腔細菌によるバイオフィーム形成に *P. gulae* プロテアーゼが関与する可能性が示された。

(5) *P. gulae* プロテアーゼは血球凝集能を保有する

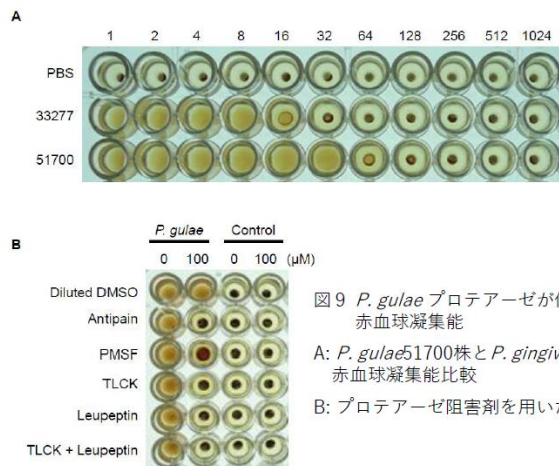


図9 *P. gulae* プロテアーゼが保有する赤血球凝集能
 A: *P. gulae*51700株と *P. gingivalis*33277株の赤血球凝集能比較
 B: プロテアーゼ阻害剤を用いた解析

続いて *P. gulae* が宿主におよぼす影響を明らかにした。ヒツジ赤血球を用いて血球凝集能を確認した (図9A)。*P. gulae* 血球凝集能はヒト歯周病菌 *P. gingivalis* と同様に保有すると共に、プロテアーゼインヒビターにより血球凝集能が抑制されることが明らかになった (図9B)。

これらの結果から、*P. gulae* が保有する血球凝集能はプロテアーゼが関与していることが示唆された。

(6) *P. gulae* プロテアーゼと歯肉上皮細胞の細胞接着関連タンパク分解との関連性の解析

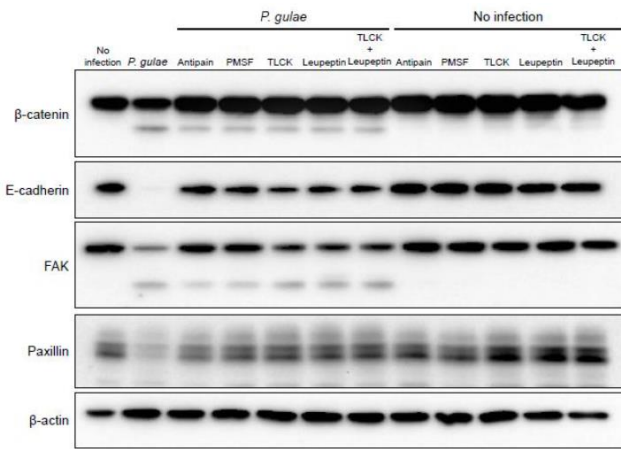


図 10 *P. gulae* 感染歯肉上皮細胞の細胞接着分子群への影響

P. gulae に 6 時間感染した歯肉上皮細胞は、細胞接着関連タンパク β -catenin、E-cadherin、FAK、Paxillin を解析した。6 時間後、これらのタンパクは分解されるが、プロテアーゼインヒビターにより分解が抑制された(図 10)。これらの結果より、*P. gulae* プロテアーゼが細胞接着関連タンパクを分解することで、歯周組織の崩壊に関与している可能性が示唆された。

(7) *P. gulae* プロテアーゼとヒト糖タンパクのタンパク分解との関連性の解析

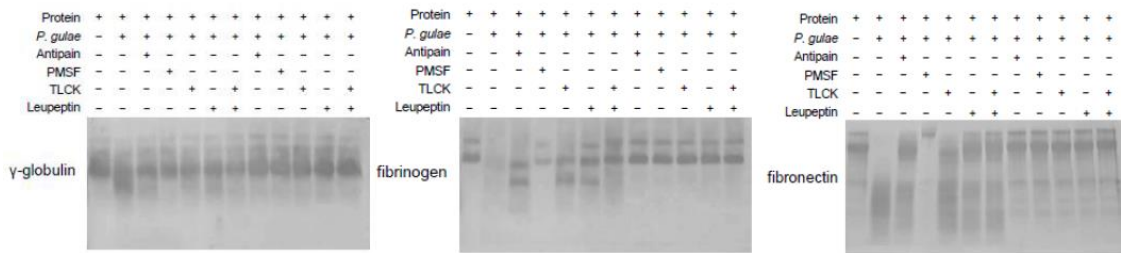


図 11 *P. gulae* によるヒト糖タンパクへの影響

糖タンパクの仲間である細胞外マトリックスに存在するフィブロネクチン、血漿に多く存在する γ グロブリンやフィブリノーゲンに対する *P. gulae* プロテアーゼの影響を観察した。これらのタンパクと *P. gulae* を共培養することでタンパクが分解されるが、プロテアーゼインヒビターにより分解の抑制傾向が認められた(図 11)。これら結果から、ヒトに存在する糖タンパクは *P. gulae* プロテアーゼにより分解され、宿主に対して様々な影響をおよぼす可能性を示唆した。

<線毛>

(1) *P. gulae* 線毛と歯肉上皮細胞への付着侵入との関連性の解析

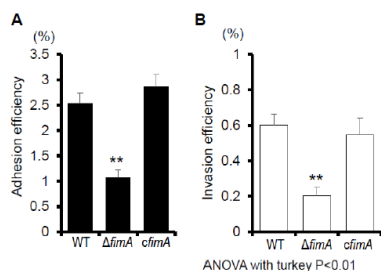


図 12 *P. gulae* 線毛変異株の歯肉上皮細胞への付着侵入
A: 付着能 B: 侵入能

P. gulae 病原因子の宿主への影響を変異株を用いて明らかにするため、線毛変異株ならびに相補株を作成した。図 12 に示すように、*P. gulae* の欠損により歯肉上皮細胞への付着侵入が抑制された。これらのことから、線毛は歯肉上皮細胞への感染に関与すると共に、歯周病発症の起点となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hamada M, Inaba H, Nishiyama K, Yoshida S, Yura Y, Matsumoto-Nakano M, Uzawa N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prognostic association of starvation-induced gene expression in head and neck cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98544-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida S, Inaba H, Nomura R, Murakami M, Yasuda H, Nakano K, Matsumoto-Nakano M	4. 巻 13
2. 論文標題 Efficacy of FimA antibody and clindamycin in silkworm larvae stimulated with Porphyromonas gulae.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 1914499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20002297.2021.1914499.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Urmi AS, Inaba H, Nomura R, Yoshida S, Ohara N, Asai F, Nakano K, Matsumoto-Nakano M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Roles of Porphyromonas gulae proteases in bacterial and host cell biology.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13312.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nomura R*, Inaba H*, Yasuda H*, Shirai M, Kato Y, Murakami M, Iwashita N, Shirahata S, Yoshida S, Matayoshi S, Yasuda J, Arai N, Asai F, Matsumoto-Nakano M, Nakano K. (*Contributed equally)	4. 巻 22
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 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 -

1. 著者名 Nomura R, Inaba H, Matayoshi S, Yoshida S, Matsumi Y, Matsumoto-Nakano M, Nakano K	4. 巻 10
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 206-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63861-4.	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 Morikawa Y, Morimoto S, Yoshida E, Naka S, Inaba H, Matsumoto-Nakano M	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification and functional analysis of glutamine transporter in Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 1797320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20002297.2020.1797320.	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 Urmi AS, Inaba H, Nomura R, Yoshida S, Ohara N, Asai F, Nakano K, Matsumoto-Nakano M	4. 巻 in press
2. 論文標題 Roles of Porphyromonas gulae proteases in bacterial and host cell biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13312	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 Yoshida S, Inaba H, Murakami M, Yasuda H, Nakano K, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Altered virulence of fimA variant strains in a silkworm infection model of Porphyromonas gulae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8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、稲葉裕明、仲野道代
2. 発表標題 Porphyromonas gulae線毛のバイオフィルム形成能と遺伝子多型の関連
3. 学会等名 第42回岡山歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山今日子、稲葉裕明、濱田 正和、吉田 翔、仲野 道代
2. 発表標題 血清飢餓状態が頭頸部癌細胞株に及ぼす影響と飢餓誘導遺伝子の予後との関連性
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田翔、稲葉裕明、仲野道代
2. 発表標題 Porphyromonas gulae 線毛遺伝子多型のバイオフィルム形成能への影響
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉裕明、吉田翔、仲野道代
2. 発表標題 Porphyromonas gulae LPS 誘発炎症反応における緑茶ポリフェノールの抗炎症作用
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東恩納司、森下陽介、稲葉裕明、草野展周、塚原宏一
2. 発表標題 岡山大学病院における抗菌薬適正使用支援チーム（AST）の取り組みと評価
3. 学会等名 第36回日本環境感染学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下陽介、東恩納司、稲葉裕明、草野展周、塚原宏一
2. 発表標題 岡山大学病院での急性単純性膀胱炎に対する尿検査実施状況および経口抗菌薬の処方動向に関する実態調査
3. 学会等名 第36回日本環境感染学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田翔、稲葉裕明、Urmi Saki Alam、野村良太、仲野和彦、仲野道代
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
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Urmi Saki Alam、稲葉裕明、吉田翔、野村良太、仲野和彦、仲野道代
2. 発表標題 The role of Porphyromonas gulae protease on bacterial growth and hemagglutination
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会
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
---------	---------