

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09926

研究課題名（和文）Treponema denticolaの細胞侵入機構と免疫回避機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of cell invasion and immune evasion in Treponema denticola

研究代表者

国分 栄仁（Kokubu, Eitoyo）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70453785

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）： Treponema denticolaは慢性歯周炎の病巣から高頻度で検出され、その発症に深く関与している。本菌のouter sheathにあるタンパクは病原因子として機能している。本研究では病原因子が本菌の運動性に与える影響を解析した。野生株では1分間当たり約16マイクロメートル移動したのに対し、prtP欠損株では4マイクロメートルと移動距離は少なかった。

本菌の欠損株は移動が低下したことから、表層タンパクが運動性に影響することを認めたことから、口腔環境でも同様に歯肉溝内や粘膜上皮での移動にdentilisinとmspが関わることが示唆され、本研究結果を英文雑誌に投稿し、掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は歯周組織の炎症と骨吸収を主とする疾患である。歯周病の病巣からは本研究で使用したTreponema denticolaが高頻度で検出されており、本菌は外膜成分に病原因子を持ち、運動性を有する。また、運動性により宿主上皮細胞への付着・侵入を行うことから、食細胞による免疫機構や物理的清掃から回避することも可能であり、持続感染が歯周病の増悪へと繋がる。

本研究では本菌の外膜成分の欠損株を用いることで表層mspタンパクが運動性、細胞内侵入性における影響を与えることが示唆され、運動に関わるタンパクであることが考えられた。それに対する抗体による歯周病予防の創薬に導くことが今後の課題である。

研究成果の概要（英文）： Treponema denticola is frequently detected in foci of chronic periodontitis and is closely involved in its pathogenesis. Proteins in the outer sheath of this fungus function as virulence factors. In this study, we analyzed the effect of virulence factors on the motility of this bacterium. The wild-type strain moved about 16 micrometers per minute, whereas the prtP-deficient strain moved only 4 micrometers per minute.

The reduced mobility of the prtP-deficient strain of this bacterium suggests that dentilisin and msp are involved in the movement in the gingival sulcus and mucosal epithelium in the oral environment as well, since the surface proteins were found to affect motility, and the results of this study were submitted to an English journal and published.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：Treponema denticola 歯周病 細菌感染 運動性

1 . 研究開始当初の背景

歯周病は国内のみならず世界でも罹患率の高い感染症であり、歯周組織の炎症により歯の喪失を引き起こし、さらに心・脳血管系疾患や糖尿病、糸球体腎炎、早産など多疾患に影響することが報告されている

病原細菌の中でも運動性を有する *Salmonella* や *Yersinia* 属は、マクロファージによる貪食と殺菌からの回避機構として、貪食への抵抗、リソソーム結合の阻害、ファゴソーム膜の破壊等の病原因子を持つことが報告されている。*P. gingivalis* は endocytosis を利用して肉肉上皮細胞に侵入し、gingipain をはじめとする病原因子による細胞障害性を示し、recycling system によって他の細胞に拡散することが報告されているが、*T. denticola* の細胞侵入と貪食への抵抗に関する報告は少ない。*T. denticola* は菌体内部に鞭毛を保持して運動性を有する偏性嫌気性菌であり、らせん状の形態を呈する(図1: 自験例)。本菌は病原因子や運動性により宿主免疫機構を攪乱させて回避する可能性はあるが、組織細胞侵入メカニズムおよびそれに伴う宿主防御の回避機構は未だに不明な点が多い。

2 . 研究の目的

本研究は *Treponema denticola* の細胞侵入および宿主免疫からの回避機構の解明を目的とし、**細胞侵入に関わる病原因子の解明、細胞侵入後の免疫回避機構および宿主細胞動態の解析、と2つの内容に分けて研究を遂行する。**その結果をもとに病原因子を検討し、病原因子の発現を抑制させる siRNA あるいはペプチド抗体を設計・作成して、**病原因子抑制による歯周病予防への臨床応用**を見出す。本研究では *T. denticola* の標準株 ATCC 株、dentilisin および msp 欠損株を用いて宿主細胞に感染させて菌株の病原因子と宿主細胞の動態を解析し、細胞侵入に関する病原因子を解明する。研究代表者および分担者は上記以外にも病原遺伝子欠損株を作成可能であり、発展性のある研究を行える。

また、解析は *T. denticola* の侵入機序および免疫回避機構を Time-Lapse により形態学および分子生物学的手法にて行う。本菌の細胞内の動態について長く残存するという報告があるものの免疫回避機構等の報告は少なく、特に細胞内への侵入を Time-Lapse による報告は非常に少ない。細胞内での細菌の移動は、*Shigella* 属は鞭毛を持たないため宿主細胞のアクチンを利用して移動を行うが、*T. denticola* の細胞内での動態、消化からの回避機構について Time-Lapse による報告例はなく、自験例(図2)では *T. denticola* の細胞への侵入や細胞内からの貪食回避機構について特徴的な結果を得ており、本菌の病原因子あるいは運動性により細胞侵入性や宿主免疫からの回避機構に影響を及ぼす因子を経時的に観察、検討する事が可能である。

3 . 研究の方法

***T. denticola* の細胞侵入に関わる病原因子の解明**

T. denticola の細胞への侵入機構を明らかにするため、遺伝子欠損株を作成し欠損株と標準株で比較して侵入に関する病原因子を検索する。また、口腔粘膜上皮細胞とマクロファージを用いて貪食および侵入に関与する分子を明らかにする。

細菌は *T. denticola* の野性株 ATCC34405、病原遺伝子 dentilisin および msp 欠損株を使用し、細胞は口腔粘膜上皮癌細胞(Ca9-22a)およびマウス腹腔マクロファージもしくはヒト単球系細胞株(U937)を分化させて使用する。感染方法は *T. denticola* を細胞あたり 100 の細菌数に調整して感染させる。サンプルは時間毎に固定して走査型電子顕微鏡(SEM)、透過型電子顕微鏡(TEM)、および蛍光抗体法による共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)にて侵入した細菌数を判定する。

暗視野顕微鏡による time-lapse 撮影を行い、侵入時の動態を経時的に検索し、遺伝欠損株および使用細胞による侵入機序への影響を解析する。

4 . 研究成果

Treponema denticola は、らせん状の運動性微生物であり、慢性歯周炎の主要な病原体である。*T. denticola* の病原因子である Major surface protein (Msp) と dentilisin は外膜に存在する。*T. denticola* の運動性は、宿主組織への定着と侵入に深く関与しており、その成分は細胞外物質との相互作用を介して運動性に寄与していると考えられる。Msp と dentilisin のどちらが *T. denticola* の運動性 (crawling) に関与するか、Msp 欠損株と dentilisin 欠損株を用いて検討を行った。運動性は寒天培地でのコロニーサイズの測定により、速度は暗視野顕微鏡により分析した。変異株のコロニーサイズは野生株より小さかった。また、変異株の移動速度は野生株よりも低く、dentilisin 欠損株が最も低い速度であった。さらに、dentilisin 欠損株の1回転での移動距離(ピッチ)は、野生型株および Msp 変異株に比べて有意に低かった。これらの結果から、デンティリシンは *T. denticola* の移動に関連することが示された。

また、*T. denticola* の病原性を解析するため、*T. denticola* 野生株、Msp 変異株、Dentilisin 変異株が Madin-Darby canine kidney 上皮細胞の細胞間結合タンパクに及ぼす影響を調べるため、培養口腔癌上皮細胞をスクラッチし、*T. denticola* 株を感染させ、スクラッチ分への細胞移動を測定した。また、接着タンパク質および接触接合部のタンパク質の分解をウェスタンブロットティング法を用いて評価した。野生型 *T. denticola* に感染した細胞では、感染後約 30 分で細胞接触接合部の解離が検出されたが、変異型に感染した細胞では検出されなかった。

また、野生型および Msp 欠損変異体では、培養細胞の遊走の障害が観察された。また、野生型および Msp 欠損変異体の感染により、接着タンパク質である focal adhesion kinase、ZO-1、paxillin が加水分解されることが確認された。これらの結果から、*T. denticola* は細胞間接合部のタンパク質を加水分解することで上皮細胞の機能を破壊し、加水分解された焦点接着に関連するタンパク質を介して上皮細胞の治癒を阻害することが示され、病原因子として Msp が関連していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Eitoyo Kokubu, Yuichiro Kikuchi, Kazuko Okamoto-Shibayama, Shuichi Nakamura, Kazuyuki Ishihara	4. 巻 65
2. 論文標題 Crawling motility of <i>Treponema denticola</i> modulated by outer sheath protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and immunology	6. 最初と最後の頁 551-558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12940	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 Eitoyo Kokubu, Yuichiro Kikuchi, Kazuko Okamoto-Shibayama, Kazuyuki Ishihara	4. 巻 63
2. 論文標題 Effect of <i>Treponema Denticola</i> Infection on Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Bulletin of Tokyo Dental College	6. 最初と最後の頁 13-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2209/tdcpublication.2021-0037	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 国分栄仁
2. 発表標題 <i>Treponema denticola</i> の表層タンパクが運動性に与える影響の検討
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	石原 和幸 (Ishihara Kazuyuki) (00212910)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	菊池 有一郎 (Kikuchi Yuishirou) (30410418)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	

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