

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390506

研究課題名（和文） 化合物および新規タンパク質を用いた病原性口腔バイオフィルムの制御システムの開発

研究課題名（英文） Development of control system for pathogenic oral biofilm using compound and new proteins

研究代表者 泉福英信（Senpuku Hidenobu）

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：20250186

研究成果の概要（和文）：新しい薬剤を開発して口腔疾患の予防方法を開発することを目的とし検討を行った。Polypyrroles やフルクタナーゼは、う蝕や歯周病の原因となるバイオフィルム形成を抑制した。この抑制効果は、新しいモデル動物として開発した NOD/SCID, *E2f-1*^{-/-} マウスを用いて確認した。これらの結果、Polypyrroles やフルクタナーゼは、口腔疾患予防システムを開発する上で有用な薬剤であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated development of preventive methods for oral diseases using new drug. Polypyrroles and fructanase inhibited biofilm formation, which cause dental caries and periodontal diseases. This inhibition effects were confirmed in the new animal model; NOD/SCID, *E2f-1*^{-/-} mice. From these results, it was considered that polypyrroles and fructanase were useful for development of prevention system for dental diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,200,000	60,000	7,260,000
2010 年度	3,500,000	15,000	3,515,000
2011 年度	3,300,000	15,000	3,315,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	90,000	14,090,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：バイオフィルム、抑制物質、ペプチド、唾液分泌低下、う蝕予防、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus gordonii*、NOD/SCID, *E2f-1*^{-/-}、IgA、フルクタナーゼ、

1. 研究開始当初の背景

1) 現在の口腔微生物を介する疾患とその発症の問題点

戦後、欧米の菓子および甘味飲料が日本へ入ってきた結果、昭和 30, 40 年代にはう蝕を有するヒトが急増し、その多う蝕罹患患者群の高齢化が進んでいる。その患者群の、高齢化の結果根面う蝕や歯周病の増加

につながっていると考えられている。高齢化とともにう蝕、歯周病を起因とする全身疾患（心臓病、動脈硬化等）および誤嚥性肺炎なども増加してきている。右肩上がりで増加している HIV 感染者、白血病患者、放射線科学療法を受けた頭頸部癌患者や骨髄移植を受けた患者なども、唾液分泌低下、歯周病、口腔真菌症、口腔潰瘍等の様々

な口腔症状を起こしやすい。このように、口腔微生物叢の変化、口腔微生物に関わる疾患が年々増加してきているのが現状である。

2) 現在明らかになっていない重要な点

口腔に病原性微生物が感染するのを制御しているのは、口腔微生物のなかでも特に多数を占める Streptococci、Lactobacilli、Actinomyces などの乳酸産生菌などである。これらの細菌は、微生物間コミュニケーションのもとにバイオフィームという宿のなかで共生している。口腔バイオフィームは、宿主の防御力とバランスを取りながら、ダイナミックに細菌間シグナルを返して口腔表面に形成されて、口腔の安定した微生物叢の維持にも関わっている。しかし、食生活の変化、加齢、全身疾患、病原性の強い微生物の全身感染等が起ると、正常な微生物ネットワークが崩れ、時間および慢性的な症状の経過とともに病原性微生物が蓄積し口腔疾患の発症につながっていく。しかし、病原的な細菌叢から正常な口腔細菌叢に戻しそれを維持安定化させる薬剤は開発されていない。

2. 研究の目的

効果的な薬剤を開発するために、我々は以前の研究により明らかにされた陽電荷の繰り返し構造を持ったペプチドが唾液蛋白質に結合し Streptococci の歯表面への付着を抑制することに着目した。この同じ構造を持つ Polypyrrole や Phenylene ethynylene などの水溶性の有機化合物を用いて、*S. mutans* や *S. sobrinus* などのう蝕原因菌、*P. gingivalis* や *A. actinomycetem comitans* などの歯周病関連菌の歯表面付着、菌凝集およびバイオフィーム形成への効果およびその他口腔常在菌への効果を *in vitro* および *in vivo* で検討を行うことを計画した。また、*S. faecium*, *S. mitis*, *S. salivarius* からバイオフィーム形成抑制物質を精製して、プロテオーム解析から抑制物質を特定して、その抑制物質の効果を確認することも計画した。その水溶性有機化合物を用いた病原性細菌の付着抑制効果とバイオフィーム抑制物質を利用したバイオフィームの病原性化の阻害

効果を利用して口腔疾患予防システムの構築を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

平成 21 年度は有機化合物を用いて、*S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. mitis*、*S. oralis*、*S. sanguinis*、*P. gingivalis*、*A. actinomycetem comitans*、などの実験室株および臨床分離株の *in vitro* における付着およびバイオフィーム形成への効果を検討する。手持ちのない菌株の臨床分離株は、新たに分離を行う。有機化合物による上述の口腔細菌付着阻害効果を *In vivo* で検討するために唾液分泌の低下した NOD-SCID, *e2f-1^{-/-}* にヒト唾液を処理して口腔細菌の唾液レセプターであるアグルチニンペプチド (SRCRP2) を表出したマウスを作製する。平成 22 年以降に、*S. salivarius* からのバイオフィーム形成抑制物質の精製を行い、プロテオーム解析から物質を特定する。ゲノムの明らかになっていない *S. salivarius* に関してプロテオーム解析が十分にできないことから、ゲノム解析を行う。候補タンパク質の特定後、その物質にバイオフィーム形成抑制効果があるか *in vitro* で検討を行う。唾液分泌低下マウスを利用した新しい口腔感染モデル動物を利用して有機化合物および組み換えタンパク質の効果を検討する。さらに有機化合物と抑制タンパク質を利用して、病原性バイオフィーム形成を制御できるか口腔疾患予防システムの構築を検討する。

以下の 4 つのステップにより化合物や組み換えタンパク質の口腔病原微生物に対する効果を明らかにし、新規制御方法を構築する。

1) 口腔バイオフィーム形成菌の単離およびスクリーニング

2) 化合物の選択やバイオフィーム形成抑制物質の精製、特定および抑制タンパク質の菌付着および増殖および凝集への作用の解明

3) バイオフィーム形成への化合物および抑制タンパク質の作用の解明

4) *in vivo* における化合物および抑制タンパク質の病原微生物に対する作用

5) 病原性バイオフィーム制御方法の開発

4. 研究成果

1) 新しいバイオフィーム抑制剤の解析①

水溶性の有機化合物である5%

Polypyrrolesにて唾液コートしたハイドロキシアパタイトディスクを処理すると

*Streptococcus mutans*のバイオフィーム形成は、スクロースが含まれない培地において抑制された。しかし、スクロースを含む培地においては抑制されなかった。この

Polypyrrolesは、スクロース依存性のバイオフィーム形成に対して、その抑制効果が認められないことが明らかとなった。このことから、Polypyrroles は、*S. mutans*の初期付着を抑制することができるが、細胞外多糖を基に形成される成熟バイオフィームには効果を示さないことが明らかとなった。

2) 新しいバイオフィーム形成遺伝子の検討

スクロースを含まない培地における臨床分離株のバイオフィーム形成能を調べると、バイオフィーム形成能の高い、中程度、低い株に分類することができた。高い株と低い株を利用して、バイオフィーム形成時遺伝子発現の違いをマイクロアレイにて解析すると、高い株において発現量が4倍以上増加した遺伝子 74 個が明らかになった。それらの遺伝子を利用して、浮遊細胞とバイオフィーム細胞における遺伝子発現の差を検討すると、QSシステムに依存した遺伝子である *sunL* がバイオフィーム形成を制御する遺伝子であることが明らかとなった。また、*gtfB*, *gtfC*, *com* 遺伝子群および *sunL*、バシトラシン感受性の高まった *mbrC*, *mbrD* は、グルコース含有培地において、pH 低下や抗生物質存在下による死菌形成、菌体外 DNA の放出に深く関わり、それらがバイオフィーム形成に物理的に作用することが明らかとなった。それらの死菌形成、DNA の菌体外放出は、QSシステムによる耐酸性やバクテリオシン産生などに影響を受けていることが考えられた。

3) 新しいバイオフィーム形成剤の検討②

様々な複合菌を用いたバイオフィーム形成実験から、*S. salivarius* は *S. mutans* と共培養するとスクロース含有培地においてバイオフィーム形成を抑制することが明らかとなった。*S. salivarius* ATCC 9759 の培

養上清を用いて、抑制物質を精製し、TOFF MAS 解析にて物質の特定を行った。その結果 *exo-beta-d-fructosidase* (*FruA*) が、バイオフィーム形成を抑制する物質であることが明らかとなった。*FruA* は、*S. mutans* が産生する *Glucosyltransferase* によるスクロースを基質としたグルカン合成が行われる前にスクロースを分解することでバイオフィーム形成を抑制することが明らかとなった。この *FruA* は培地中のスクロースを感知してより分泌されることも明らかになった。真菌である *Aspergillus niger* の産生する市販の *FruA* (相同性 31.6%、類似性 59.6%) も *S. mutans* のバイオフィーム形成を抑制する。よって、多くの菌に広く保存された *FruA* は、口腔バイオフィーム形成阻害物質として大きな役割があることを示唆した。

4) 口腔感染モデル動物の確立と抑制剤の効果

唾液分泌低下マウスである

NOD/SCID, *E2f-1*^{-/-}マウスを利用して、*S. mutans*の口腔感染モデル実験系を確立する検討を行った、ヒト唾液や唾液成分を菌を感染する前に口腔に2.5分処理をすると、菌の定着量が上昇することが明らかとなった。特にIgAの生理的濃度で処理をすると、アルブミン、ムチン、リゾチームよりも、コントロールとして用いたカゼインよりも菌接種後120分で有意に*S. mutans*の歯表面定着量が上昇した。この理由を検討するために、IgAと*S. mutans*をあらかじめ反応させ、その後遠心により抗*S. mutans*抗体を除去したIgAサンプルを作製した。このサンプルは、前処理により歯表面において菌の定着量が上昇することがなかった。よって、唾液成分の前処理における*S. mutans*の定着量の上昇は、抗*S. mutans*抗体の存在が深く関わっていることが明らかとなった。しかし菌を接種して24時間経つと、定着量は著しく減少した。このままでは長期の感染実験に使用することができない。そこで菌を接種してから低濃度スクロース水(1%)とスクロースを含まない固形食を同時に与えた。その結果、スクロース水や固形食を単独で与えた場合よりも有意にその定着量が上昇した。これで、*S. mutans*の口腔感染モデルを確立することができた。そこで、このモデルを利用して、昨年度バイオフィーム抑制剤として明らかにしていたフルクタナーゼの効果の

確認を行った。

*Actinomyces naeslundii*や*Streptococcus gordonii*の単独接種や混合接種の効果の検討も行った。その結果、混合接種は単独接種よりも有意に個々の定着量を上昇させた。

5) 研究結果のまとめ

Polypyrrolesは菌の初期付着を抑制し、フルクタンナーゼは多糖体を介したバイオフィルムの成熟を抑制することが考えられた。これらの物質はバイオフィルム形成の異なったステップを抑制していることから、混合して使用すれば強力な口腔バイオフィルム形成抑制つまり口腔疾患予防システムが構築できることが考えられた。

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 10 件)

- ① Matsui-Inohara H, Uematsu H, Narita T, Satoh K, Yonezawa H, Kuroda K, Ito T, Yoneda S, Kawarai T, Sugiyama H, Watanabe H, Senpuku H. (2009) E2F-1-deficient NOD/SCID mice developed showing decreased saliva production. *Experimental Biology and Medicine*. 234: 1525-1536.
DOI: 10.3181/0905-RM-173
- ② Fujibayashi T, Nakamura M, Tominaga A, Satoh N, Kawarai T, Narisawa N, Shinozuka O, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H. (2009) Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. adherence and biofilm formation. *Japanese Journal Infectious Diseases*. 62: 337-342.
<http://www0.nih.go.jp/JJID/62/337.html>
- ③ Nakamura M, Fujibayashi T, Tominaga A, Satoh N, Kawarai T, Shinozuka O, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H. (2010) Hinokitiol inhibits *Candida albicans* adherence to oral epithelial cells. *Journal of Oral Biosciences*. 52: 42-50.
- ④ Nishiyama Y, Inaba E, Uematsu H, Senpuku H. (2010) Effects of mucosal care on oral pathogens in professional oral hygiene to the elderly. *Archives of Gerontology & Geriatrics*. 51: e139-e143.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.archger.2010.04.009>.

- ⑤ Senpuku H, Miyazaki H, Yoneda S, Yoshihara A, Tada A. (2010) A quick statistically accurate diagnosis for caries risk in the elderly. *Clinical Laboratory*. 56: 505-512.
- ⑥ Okuda K, Hanada N, Usui Y, Takeuchi H, Koba H, Nakao R, Watanabe H, and Senpuku H. (2010) Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation using analogues of the SspB peptide. *Archives of Oral Biology*. 55: 754-762.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.06.014>.
- ⑦ Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N, Sekizuka T, Kuroda M, Ochiai K, Hirokazu Ogihara H, Kosono S, Yoneda S, Watanabe H, Morinaga Y, Uematsu H, and Senpuku H. (2011) *Streptococcus salivarius* FruA Inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*. 77: 1572-1580.
DOI: 10.1128/AEM.02066-10
- ⑧ Narisawa N, Kawarai T, Suzuki N, Sato Y, Ochiai K, Ohnishi M, Watanabe H, and Senpuku H. (2011) Competence-dependent endogenous DNA rearrangement and uptake of extracellular DNA gives a natural variant of *Streptococcus mutans* without biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 193: 5147-5154.
DOI: 10.1128/JB.05240-11
- ⑨ Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, and Senpuku H. (2011) Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. *PloS ONE*. 6: e26163.
DOI: 10.1371/journal.pone.0026163
- ⑩ Ito T, Maeda T, Senpuku H. (2012) Roles of salivary components in *Streptococcus mutans* colonization in a new animal model using NOD/SCID. *e2f1* mice. *PLoS ONE*. 7: e32063.
DOI: 10.1371/journal.pone.0032063

[学会発表] (計 24 件)

- ① Senpuku H, Role of salivary IgA antibody against surface protein antigen of *Streptococcus mutans* in diagnosis and preventive treatment. 4th Medical Biotech Forum, Dailian, China, August 10. 2009.
- ② 泉福英信、高齢者における体力と免疫力；活性化NK細胞との関係、第64回日本体力医学会シンポジウム、新潟、2009年9月19日。
- ③ Yoneda S, Narisawa N, Kawarai T, Watanabe H, and Senpuku H.

- Identification of new genes regulated aggregation and biofilm formation of *Streptococcus mutans* clinical isolates. Poster, Eurobiofilms 2009, Italy, Rome, 2-5 September, 2009.
- ④ 泉福英信、オートインデューサー制御を利用した複合微生物のバイオフィーム形成について、第82回日本生化学会シンポジウム、オーガナイザー、2009年10月23日、神戸
 - ⑤ Ogawa A, Mitobe J, Fujita S, Kuroda M, Watanabe H, Uematsu H, and Senpuku H, Study of inhibiting substances from *Streptococcus salivarius* to *Streptococcus mutans* biofilm formation. Poster, Eurobiofilms 2009, Italy, Rome, 2-5 September, 2009.
 - ⑥ Narisawa N, Kawarai T, Yoneda S, Watanabe H, and Senpuku H, The effects of naturally-derived variants in virulence expression of *Streptococcus mutans*. Poster, Eurobiofilms 2009, Italy, Rome, 2-5 September, 2009.
 - ⑦ Kawarai T, Yoneda S, Saeki Y, Tsugane T, Ochiai K, Watanabe H, and Senpuku H. Water-insoluble glucan-independent biofilm formation by *Streptococcus mutans* under acidic condition. Poster, Eurobiofilms 2009, Italy, Rome, 2-5 September, 2009.
 - ⑧ 米田早織、成沢直規、河原井武人、泉福英信、*Streptococcus mutans* バイオフィームの病原性調節遺伝子の解明、第 51 回歯科基礎医学会、新潟、2009 年 9 月。
 - ⑨ Ito T, Matsui H, Maeda T, Watanabe H, and Senpuku H. Establishment of new mouse model using NOD/SCID. *e2f-1*^{-/-} mouse for initial adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans*, Poster, 5th ASM Conference on Biofilms, November 15 - 19, 2009, Cancun, Mexico.
 - ⑩ 河原井武人、成澤直規、米田早織、佐伯洋二、津金貴則、落合邦康、渡辺治雄、泉福英信、*Streptococcus mutans* の非水溶性グルカン非依存のバイオフィーム形成機序、第 83 回日本細菌学会総会、神奈川、2010 年 3 月。
 - ⑪ 米田早織、成澤直規、河原井武人、渡辺治雄、泉福英信、臨床分離株 *Streptococcus mutans* の新規バイオフィーム形成遺伝子とその働きについて、第 83 回日本細菌学会総会、神奈川、2010 年 3 月。
 - ⑫ 成澤直規、河原井武人、米田早織、渡辺治雄、泉福英信、*Streptococcus mutans* 自然変異株出現に影響する環境ファクターの探索、第 83 回日本細菌学会総会、神奈川、2010 年 3 月。
 - ⑬ Senpuku H, Yoneda S, Narisawa N, Kawarai T, Sato Y, Ochiai K, and Watanabe H, Roles of sunL in *Streptococcus mutans* biofilm formation and aggregation. Oral Presentation, 88th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, Barcelona, Spain. July 14-17. 2010.
 - ⑭ Satoh K, Narita T, Matsui-Inohara H, Ito T, Senpuku H and Sugiya H, Study of dry mouth behavior of E2F-1-deficient NOD/SCID mice, Poster Discussion, 88th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, Barcelona, Spain. July 14-17. 2010.
 - ⑮ Ito T, Kawarai T, Narisawa N, Zhang X, Kanaguchi N, Maeda T, and Senpuku H, *Streptococcus mutans* colonization on human saliva-treated tooth in NOD/SCID. *E2f1*^{-/-} mice. Poster, 88th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, Barcelona, Spain. July 14-17. 2010.
 - ⑯ Narisawa N, Kawarai T, Yoneda S, Ito T, Watanabe H, and Senpuku H, Appearance mechanisms of smooth colony variant in *Streptococcus mutans*. Poster, 88th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, Barcelona, Spain. July 14-17. 2010.
 - ⑰ 河原井武人、成澤直規、泉福英信、アッサム茶抽出成分による *Streptococcus mutans* バイオフィーム阻害に関する研究、第 52 回歯科基礎医学会、東京、2010 年 9 月。
 - ⑱ 成澤直規、伊藤達朗、鈴木奈緒央未、佐藤裕、落合邦康、中尾龍馬、泉福英信、う蝕原性 *Streptococcus mutans* smooth-colony-variant 出現メカニズムと病原性発現に関する検討、第 52 回歯科基礎医学会、東京、2010 年 9 月。
 - ⑲ Tuna Elif, 前田隆秀、泉福英信、Effect of polypyrrole on biofilm formation of *S. mutans*, 第 52 回歯科基礎医学会、東京、2010 年 9 月。
 - ⑳ Senpuku H, FruA and SspB peptide from oral streptococci and saliva IgA to PAc(361-389) peptide play multiple functions in biofilm formation, Aarhus University, Special Seminar, Aarhus, Denmark, USA, 7/4. 2011.
 - 21 Senpuku H, Diagnosis and prevention for dental caries development, cell to cell

communication in dental biofilm formation. Istanbul University Dental school, Special Seminar, Istanbul, Turkey, 7/1, 2011.

- 22 泉福英信、口腔ケアによる口腔微生物バリアー構築と免疫活性化の可能性、第20回日本口腔感染症学会、横浜、2011年11月13日
- 23 鈴木奈央未、成澤直規、落合邦康、泉福英信、*Streptococcus mutans*におけるCSP依存新規病原性関連遺伝子の検討、第53回歯科基礎医学会、岐阜、2011年10月。
- 24 泉福英信、伊藤龍朗、渡邊治雄、大西真、Effects of salivary components on *Streptococcus mutans* biofilm in NOD/SCID. *e2f1*^{-/-} mice、第85回日本細菌学会総会、長崎、2012年3月。

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：バイオフィルム形成抑制剤

発明者：泉福英信、河原井武人、米田早織、堤淑明

権利者：泉福英信、河原井武人、米田早織、堤淑明

種類：技術特許

番号：2010-175211

出願年月日：2010年8月4日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉福 英信 (SENPUKU HIDENOBU)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：20250186

(2) 研究分担者

河原井武人 (KAWARAI TAKETO)

国立感染症研究所・細菌第一部・研究員

研究者番号：90409079

(3) 研究分担者

中尾龍馬 (NAKAO RYOMA)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：10370959

(4) 研究分担者

菅野直之 (SUGANO NAUYUKI)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：30246904

(5) 連携研究者

渡邊治雄 (WATANABE HARUO)

国立感染症研究所・所長

研究者番号：70142130