

## 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 10 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592344

研究課題名（和文）歯周病原性細菌コンソーシア形成機構の解析

研究課題名（英文）Investigation of consortia formation by periodontopathic bacteria

研究代表者

石原 和幸 (Ishihara Kazuyuki)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00212910

研究成果の概要（和文）：

本研究では歯周病原性菌病原性解析を目的とし、細菌間の相互作用を解析した。慢性歯周炎病巣から分離される *P. gingivalis* と *T. denticola* 間では、Hgp44 により共凝集することが明らかになった。増殖においては、*F. nucleatum* と *Prevotella intermedia*、*C. ochracea*、*P. gingivalis* 等の間にバイオフィーム形成促進が認められた。さらに *F. nucleatum* と *P. gingivalis* の組み合わせにおいては、増殖のみならずヒト歯肉上皮細胞侵入性の上昇が認められた。これらの結果は、歯周病原性菌がコンソーシアを形成することによりデンタルプラーク中で優位となり、病原性を発揮していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this project, our goal was to investigate bacterial interaction in the process of biofilm formation to clarify the virulence of periodontopathic bacteria in dental plaque. In the process of colonization, *P. gingivalis* adhered to *T. denticola* by means of Hgp44, which is located on its surface. A synergistic effect was observed in co-culture of *F. nucleatum* and *P. intermedia*, *C. ochracea*, or *P. gingivalis*. In addition, invasion of epithelial cells by *P. gingivalis* was enhanced by co-infection with *F. nucleatum* or *P. gingivalis*. These results suggest that organization as consortia confers an advantage on periodontopathic bacteria in the formation of dental plaque.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：口腔細菌学、バイオフィーム、歯周病、歯周病原性菌、Synergistic effect, コンソーシア

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は壮年期以降の 30%が罹患する国民病とも言える疾患である。さらに近年、歯周炎は、心血管系疾患、糖尿病等の疾患に関与している事も示されてきている。歯周炎の発症には歯肉縁下バイオフィームでのグラム陰性桿菌群の増加とそれに対する生体の防御反応による歯周組織傷害が重要な役割を果たしている。炎症の原因病原体を含む歯肉縁下バイオフィームにおいては、成熟の過程で功績種の変化が起きている。この形成・成熟のプロセスにおいて歯周病原性菌増加が可能になるのに関わる細菌間相互作用についてはまだ不明な点が多い。歯周病原性バイオフィームは複数の細菌によって構成されている。これらの細菌間に形成されるコンソーシアでの細菌間コミュニケーションは、バイオフィームの細菌組成変化時に重要な役割を果たしていると考えられている。この細菌間相互作用の解析は、歯周病原性バイオフィーム形成のメカニズムを明らかにし、歯周病の原因に迫ることを可能とする。

*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* の 3 菌種は、慢性歯周炎局所から高頻度に分離され、その発症と進行に重要な役割を果たしていると考えられている。これらの細菌を含む歯周病原性菌群は、健康者の歯肉溝バイオフィームの中に少ないながらも日和見病原体として存在している。現在の所、その条件はまだ明らかになっていないが、ある条件になるとこれらの細菌が増加し、歯周病の発症に寄与するようになると考えられている。歯周病原菌は類似した位置で consortia を形成し、相互に影響を及ぼし合っていると考えられる。

700 種を超える細菌が共生する歯肉縁下バイオフィーム中での歯周病原性菌 consortia の解明は最近になって盛んになってきている。Socransky らは歯肉縁下バイオフィームで 5 種の細菌のグループをあげ、*P.gingivalis*, *T.forsythia*, *T.denticola* の 3 菌種 (red complex) が重要な歯周炎で増加していることを報告している。このそれぞれの菌種は歯周組織破壊を引き起こすための病原性因子を持つと共にお互いに synergistic effect を示すことが報告されている。*Fusobacterium nucleatum* は、すでに歯面に定着している early colonizer に歯周病原性菌の間をつなぐ bridge の働きをしている。われわれは、*T. denticola* と *P. gingivalis* の間に共凝集作用があること、*F. nucleatum* と *P. gingivalis* の間に biofilm 形成促進作用が有ることを明らかにしてきた。これらの因子は、歯周病原菌がコンソーシアを形成する因子であり、バイオフィームの病原性にも影響を与えると考えられる。

## 2. 研究の目的

特定の嫌気性グラム陰性菌種からなるバイオフィームは、歯周病の発症と進行に関与している。歯周病原性菌は歯周病原性バイオフィームないでコンソーシアを形成し、その形成をコントロールしていると考えられる。本研究では歯周病発症における歯周病原性菌病原性を明らかにするため、慢性歯周炎に高頻度で分離される red complex と呼ばれる歯周病原性細菌群 (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*) およびこれらの細菌の定着に重要な役割を果たす *Fusobacterium nucleatum* に焦点を当て、これらの菌種における細菌間相互作用について解析を行った。

## 3. 研究の方法

根尖および歯肉溝内からの菌の分離は、血液平板を用いた嫌気培養によって行い、16S rRNA 配列により菌種を決定した。共凝集は Cisar らの方法により測定した。共凝集に関わる遺伝解析のための欠損株作成は相同性組換えによって行った。菌種間相互作用のための混合培養には、2 菌種を細胞培養用 plate に加えて混合培養を行うと共に、1 菌種を接種した細胞培養用 plate に、0.2 μm のフィルターの底を持つ tissue culture insert セットし底にもう 1 菌種を加え、可溶性画分だけが移行する状態で 2 菌種の培養を行った。バイオフィーム形成は crystal violet により染色した。バイオフィームを形成した細菌の autoinducer-2 酸性は、*Vibrio harveyi* BB170 の発光によって測定した。

## 4. 研究成果

歯肉溝から分離された菌種を用い相互作用を解析すると、*F. nucleatum* と *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* および *Capnocytophaga ochracea* との間に共凝集性が認められた。*F. nucleatum* と *P. intermedia* 及び *P. nigrescens* の共凝集は、*P. intermedia* または *P. nigrescens* の加熱により失われた。これとは対照的に *F. nucleatum* と *C. ochracea* の共凝集は、*F. nucleatum* の加熱により失われた。*F. nucleatum* と *P. intermedia* あるいは *P. nigrescens* との共培養では、それぞれの単独培養に比べ、バイオフィーム形成が有意に上昇した。しかし、*P. intermedia* または *P. nigrescens* の培養上清を加えても、*F. nucleatum* のバイオフィーム形成促進は認められなかった。さらに AI-2 産生は供試菌株全てに認められたが、バイオフィル

ム形成能とは関連しなかった。*C. ochracea* と *F. nucleatum* の共培養ではそれぞれの単独培養に比べ、バイオフィーム形成が上昇した。さらに *C. ochracea* の培養上清を加えて *F. nucleatum* を培養すると、バイオフィーム形成能の上昇が認められた。

*P. gingivalis* と *T. denticola* の共凝集のメカニズム解析では、*P. gingivalis* のタンパク分解酵素である arg-gingipainA (RgpA), arg-gingipainB (RgpB), lys-gingipain (Kgp) を欠損させると共凝集反応が消失した。*P. gingivalis* の線毛の欠損株によっては共凝集は影響を受けなかった。さらに RgpA, Kgp, HemagglutininA の欠損株によっても共凝集活性が認められなかった。この3つのタンパクに共通のドメインとして認められる Hgp44 に注目し、Hgp44 の copy 数と共凝集活性について欠損株を用いて比較すると、Hgp44 の数の減少とともに共凝集反応が弱くなっていた。これらの結果から、Hgp44 は、*P. gingivalis* と *T. denticola* の共凝集の主要な ligand として機能し、歯周病原菌によるコンソーシア形成に重要な役割を果たすことが明らかになった。

歯肉溝内でのコンソーシア形成には病原体と宿主間の cross talk が重要な働きを果たす。*P. gingivalis* と宿主の間の cross talk について歯肉溝滲出液中でストレスに伴って変動する noradrenaline が *P. gingivalis* の増殖に与える影響について解析した結果では、noradrenaline によって *P. gingivalis* の増殖速度の低下と病原性因子である RgpB 産生の上昇が認められ、宿主のストレスに対する応答が歯周病原細菌の病原性に影響を与えていることが明らかになった。

根尖部から分離された細菌の主要なものは、*Fosobacterium nucleatum*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* であった。根尖部から分離された菌種の組み合わせによるバイオフィーム形成促進作用を解析すると、*F. nucleatum* と *Porphyromonas gingivalis* との間にバイオフィーム形成促進作用が認められた。Two compartment system を用いて解析すると、この作用は、*P. gingivalis* 由来の可溶性 mediator によると考えられた。

さらにこの2菌種を用い、ヒト歯肉上皮細胞への感染実験を行った。*P. gingivalis* のヒト歯肉上皮細胞への侵入性は、単独感染の場合に比べて、*F. nucleatum* との混合感染の場合に著明な上昇が見られた。これらの菌種間の共凝集を阻害する galactose によってその侵入性が 25%程度抑制を受けたことより、細菌間の共凝集がこの侵入性に一部関与していると考えられた。さら

に *F. nucleatum* の侵入阻害性を有し *P. gingivalis* 侵入を抑制しない cyclohexiamide が混合感染時の *P. gingivalis* の侵入が強く抑制したことから、*P. gingivalis* の侵入に *F. nucleatum* と細胞との間の相互作用が重要な役割を果たしていると考えられた。これらの結果は、polymicrobial infection が歯周病原性菌の病原性発揮に重要な役割を果たすことを示唆している。

これらの結果から、バイオフィーム中のグラム陰性桿菌には、共凝集による物理的な定着手段に加え、バイオフィーム内での優位性を確保するために細菌間相互作用によりそのバイオフィーム形成能を増加させ、さらにその病原性も変化させていると考えられる。

## 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 23 件)

- ① Fujii, R., Saito, Y., Tokura, Y., Nakagawa, K.I., Okuda, K., Ishihara, K., Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions, Oral Microbiol Immunol, 査読有 24, 2009, 502-505, DOI: 10.1111/j.1399-302X.2009.00534.x
- ② Kato, T., Uzawa, A., Ishihara, K., Inhibitory effect of galectin-3 on the cytokine-inducing activity of periodontopathic Aggregatibacter actinomycetemcomitans endotoxin in splenocytes derived from mice, FEMS Immunol Med Microbiol, 査読有 57, 2009, 40-45, DOI: 10.1111/j.1574-695X.2009.00577.x
- ③ Saito, A., Inagaki, S., Ishihara, K., Differential ability of periodontopathic bacteria to modulate invasion of human gingival epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*, Microb Pathog, 査読有 47, 2009, 329-333, DOI: 10.1016/j.micpath.2009.09.012
- ④ Abe, S., Imaizumi, M., Mikami, Y., Wada, Y., Tsuchiya, S., Irie, S., Suzuki, S., Satomura, K., Ishihara, K., Honda, M.J., Oral bacterial extracts facilitate early osteogenic/dentinogenic differentiation in human dental pulp-derived cells, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 査読有 109, 2010, 149-154, DOI: 10.1016/j.tripleo.2009.08.028
- ⑤ Ishihara, K., Virulence factors of *Treponema denticola*, Periodontol 2000,

- 査読有 54, 2010, 117-135, DOI: 10.1111/j.1600-0757.2009.00345.x
- ⑥ Ishihara, K., Wawrzonek, K., Shaw, L.N., Inagaki, S., Miyamoto, M., Potempa, J., Dentipain, a *Streptococcus pyogenes* IdeS protease homolog, is a novel virulence factor of *Treponema denticola*, *Biological chemistry*, 査読有 391, 2010, 1047-1055, DOI: 10.1515/BC.2010.113
- ⑦ Ito, R., Ishihara, K., Shoji, M., Nakayama, K., Okuda, K., Hemagglutinin/Adhesin domains of *Porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *Treponema denticola*, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 査読有 60, 2010, 251-260, DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00737.x
- ⑧ Komiya-Ito, A., Ishihara, K., Tomita, S., Kato, T., Yamada, S., Investigation of subgingival profile of periodontopathic bacteria using polymerase chain reaction, *Bull Tokyo Dent Coll*, 査読有 51, 2010, 139-144, DOI: JST.JSTAGE/tdpublication/51.139 [pii]
- ⑨ Miura, T., Iohara, K., Kato, T., Ishihara, K., Yoshinari, M., Basic peptide protamine exerts antimicrobial activity against periodontopathic bacteria, *J Biomed Sci Eng*, 査読有 3, 2010, 1069-1072, DOI: 10.4236/jbise.2010.311138
- ⑩ Ryu, M., Ueda, T., Saito, T., Yasui, M., Ishihara, K., Sakurai, K., Oral environmental factors affecting number of microbes in saliva of complete denture wearers, *J Oral Rehabil*, 査読有 37, 2010, 194-201, DOI: 10.1111/j.1365-2842.2009.02042.x
- ⑪ Saito, T., Ishihara, K., Ryu, M., Okuda, K., Sakurai, K., Fimbriae-associated Genes are Biofilm-forming Factors in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Strains, *Bull Tokyo Dent Coll*, 査読有 51, 2010, 145-150, DOI: JST.JSTAGE/tdpublication/51.145 [pii]
- ⑫ Yamazaki-Kubota, T., Miyamoto, M., Sano, Y., Kusumoto, M., Yonezu, T., Sugita, K., Okuda, K., Yakushiji, M., Ishihara, K., Analysis of matrix metalloproteinase (MMP-8 and MMP-2) activity in gingival crevicular fluid from children with Down's syndrome, *J Periodontal Res*, 査読有 45, 2010, 170-176, DOI: 10.1111/j.1600-0765.2009.01214.x
- ⑬ Inagaki, S., Saeki, Y., Ishihara, K., Funoran-containing Xylitol gum and tablets inhibit adherence of oral streptococci, *J Oral Biosci*, 査読有 53, 2011, 82-86, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/joralbiosci/53/1/53\\_1\\_82/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/joralbiosci/53/1/53_1_82/_pdf)
- ⑭ Kubota, M., Tanno-Nakanishi, M., Yamada, S., Okuda, K., Ishihara, K., Effect of smoking on subgingival microflora of patients with periodontitis in Japan, *BMC Oral Health*, 査読有 11, 2011, 1, DOI: 10.1186/1472-6831-11-1
- ⑮ Muramatsu, K., Kokubu, E., Shibahara, T., Okuda, K., Ishihara, K., HGP44 induces protection against *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice, *Clin Vaccine Immunol*, 査読有 18, 2011, 888-891, DOI: 10.1128/CVI.00556-10
- ⑯ Saito, T., Inagaki, S., Sakurai, K., Okuda, K., Ishihara, K., Exposure of *P. gingivalis* to noradrenaline reduces bacterial growth and elevates ArgX protease activity, *Arch Oral Biol*, 査読有 56, 2011, 244-250, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2010.09.014
- ⑰ Yamada, M., Ishihara, K., Ogawa, T., Sakurai, K., The inhibition of infection by wound pathogens on scaffold in tissue-forming process using N-acetyl cysteine, *Biomaterials*, 査読有 32, 2011, 8474-8485, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.074
- ⑱ Yasui, M., Ryu, M., Sakurai, K., Ishihara, K., Colonization of the oral cavity by periodontopathic bacteria in complete denture wearers, *Gerodontology*, 査読有 2011, DOI: 10.1111/j.1741-2358.2011.005.x
- ⑲ Aoki, M., Takanashi, K., Matsukubo, T., Yajima, Y., Okuda, K., Sato, T., Ishihara, K., Transmission of Periodontopathic Bacteria from Natural Teeth to Implants, *Clin Implant Dent Relat Res*, 査読有 14, 2012, 406-411, DOI: 10.1111/j.1708-8208.2009.00260.x
- ⑳ Hosaka, Y., Saito, A., Maeda, R., Fukaya, C., Morikawa, S., Makino, A., Ishihara, K., Nakagawa, T., Antibacterial activity of povidone-iodine against an artificial biofilm of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*, *Arch Oral Biol*, 査読有 57, 2012, 364-368, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.09.005
- ㉑ Ohki, T., Itabashi, Y., Kohno, T., Yoshizawa, A., Nishikubo, S., Watanabe, S., Yamane, G., Ishihara, K., Detection

of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction, *Am Heart J*, 査読有 163, 2012, 164-167, DOI: 10.1016/j.ahj.2011.10.012

② Okuda, T., Kokubu, E., Kawana, T., Saito, A., Okuda, K., Ishihara, K., Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella* species, *Anaerobe*, 査読有 18, 2012, 110-116, DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.09.003

③ Okuda, T., Okuda, K., Kokubu, E., Kawana, T., Saito, A., Ishihara, K., Synergistic effect on biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Campylobacter jejuni*, *Anaerobe*, 査読有 18, 2012, 157-161, DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.01.001

[学会発表] (計 16 件)

① Saito A, Inagaki S, Kimizuka R, Ishihara K: Invasion of host cells by periodontopathic bacteria in polymicrobial infection, 87 th General session & exhibition of the International Association for Dental Research, Apr. 1-4, Miami, USA 2009.

② Yamaguchi Y, Fujii R, Asai T, Ito R, Nakagawa K-I, Ishihara K: *Porphyromonas gingivalis* enhances outer membrane protein expression of *Fusobacterium nucleatum*, 87 th General session & exhibition of the International Association for Dental Research, Apr. 1-4, Miami, USA 2009.

③ 稲垣覚, 齋藤淳, 君塚隆太, 石原和幸: 歯周病原菌 *Treponema denticola* のヒト歯肉上皮細胞への侵入, 第 81 回日本細菌学会総会, 3月 12-14, 名古屋 2009. *日本細菌学雑誌*, 64:164.

④ 石原和幸: 細菌の生残戦略をめぐるあらたな展開 複数菌種によるバイオフィルム形成機構, 第 82 回 日本生化学会, Oct.

21-24, Kobe 2009.

⑤ Inagaki S, Saito A, Kimizuka R, Ishihara K: *Treponema denticola* invasion of human gingival epithelial cells, 88 th General session & exhibition of the International Association for Dental Research, July. 12-17, Barcelona, Spain 2010.

⑥ Ishihara K, Inagaki S, Kimizuka R: *Treponema denticola* invasion of human gingival epithelial cells, Godon Conference, Spirochetes, Biology of, Jan. 31-Feb. 6 2010.

⑦ Saito A, Inagaki S, Kokubu E, Ishihara K: Differential ability of periodontopathogens to modulate *Porphyromonas gingivalis* host invasion, 88 th General session & exhibition of the International Association for Dental Research, July. 12-17, Barcelona, Spain 2010..

⑧ 国分栄仁, 稲垣覚, 君塚隆太, 石原和幸: *Treponema denticola* の細胞侵入に対する Malassez 上皮遺残細胞の細胞動態, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 9月 20-22 日 2010.

⑨ 石原和幸: 歯周病原性菌と心血管系疾患, 第 83 回日本細菌学会 3月 27-29 日, 横浜 2010.

⑩ 石原和幸, 稲垣覚: *Treponema denticola* の IdeS 類似システインプロテアーゼ dentipain の解析, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 9月 20-22 日 2010. J

⑪ Asai T, Nakagawa K-I, Ishihara K: Identification and characterization of potential solute-binding protein of *Treponema denticola*, XIII

International Congress for Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September 2011, Sapporo.

- ⑫ Kokubu E, Inagaki S, Kimizuka R, Ishihara K: Behavior of epithelial rests of Malassez cells infected by *Treponema denticola*, XIII International Congress for Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September 2011, Sapporo 2011.
- ⑬ Okuda T, Kokubu E, Saito A, Okuda K, Ishihara K: Periodontopathic biofilm formation of *Fusobacterium nucleatum* with *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* or *Capnocytophaga ochracea*, XIII International Congress for Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September 2011, Sapporo 2011.
- ⑭ 国分栄仁, 稲垣覚, 君塚隆太, 石原和幸: *Treponema denticola* の細胞侵入に対する Malassez 上皮遺残細胞の細胞動態, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 9 月 30 日-10 月 2 日, 岐阜 2011.
- ⑮ Kokubu E, Inagaki S, Kimizuka R, Ishihara K: Behavior of epithelial rests of Malassez cell infected by *Treponema denticola*, 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27-29 日、長崎 2012.
- ⑯ Tanaka K, Inagaki S, Shintani S, Ishihara K: Characterization of bacteriocin associated protein in *Treponema denticola*, 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27-29 日、長崎 2012.

[図書] (計 2 件)

- ① Saito, A., Inagaki, S., Kokubu, E., Kimizuka, R., Ishihara, K. Invasion of Host Cells by *Porphyromonas Gingivalis* in Polymicrobial Infection,

In: Yamamoto, S.L., ed. Periodontal Disease: Symptoms, Treatment and Prevention. Hauppauge NY: Nova Science Publishers, Inc., 257-271 (2011)

- ② Ishihara, K., Inagaki, S., Saito, A. Chapter 44. Capnocytophaga, In: Liu, D., ed. Molecular Detection Of Human Bacterial Pathogens. Boca Raton, FL: CRC press (2011)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 和幸 (ISHIHARA, KAZUYUKI)

東京歯科大学微生物学講座・教授

研究者番号 : 00212910

(2) 研究分担者

加藤 哲男 (KATO, TETSUO) 東京歯科大学

微生物学講座・教授

研究者番号 : 00159253

(3) 研究分担者

君塚 隆太 (KIMIZUKA, RYUTA)

東京歯科大学微生物学講座・講師

研究者番号 : 90287178

(4) 研究分担者

稲垣 覚 (INAGAKI, SATORU)

東京歯科大学微生物学講座・助教

研究者番号 : 20385165