

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592709

研究課題名(和文) 歯周病原性細菌の宿主細胞への侵入に対する真菌の増強作用に関する分子生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular biological studies on the effects of fungi on invasion of host cells by periodontal pathogenic bacteria

研究代表者

玉井 利代子 (Tamai, Riyoko)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号：90367566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* による宿主細胞への侵入機構と *Candida albicans* またはその菌体成分による *P. gingivalis* 侵入菌数増加のメカニズムを解明するために、この侵入に係わる宿主細胞のタンパク質分子の動態と関連する菌体成分について探索した。その結果、*C. albicans* 生菌または死菌によって、歯周組織構成細胞の galectin-3 放出が増加した。Galectin-3はグラム陰性菌外膜に存在する LPS と結合するので、同分子の動態はグラム陰性菌 *P. gingivalis* の侵入増加に関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of *C. albicans* on the adhesion and invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. Heat-killed *C. albicans* and water-soluble mannoprotein-beta-glucan complex from *C. albicans* did not enhance *P. gingivalis* adhesion. However, pretreatment of the cells with heat-killed *C. albicans* or water-soluble mannoprotein-beta-glucan complex from *C. albicans* significantly enhanced *P. gingivalis* invasion. In addition, *C. albicans* and *C. parapsilosis* up-regulate galectin-3 secretion by human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts. These results suggest that the dynamics of galectin-3 may participate in the increase in invasion of *P. gingivalis* which is gram negative bacteria because galectin-3 binds to LPS which exists in gram-negative bacteria outer membrane.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* 侵入 *Candida albicans* 真菌 混合感染

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、口腔内に常在する特定の嫌気性細菌群によって引き起こされる感染症と考えられている。なかでも、歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は慢性歯周炎患者の歯周ポケットから高頻度に検出される。一方、*Candida albicans* は口腔においても常在する病原性の弱い真菌だが、口腔カンジダ症などの日和見感染症を引き起こす。また、同真菌は歯肉縁下プラークからも検出される。さらに、共凝集やバイオフィルム形成・増殖における歯周病原性細菌と *C. albicans* 間の相互作用の報告が多数ある。そこで、同じ歯周ポケット内から検出される複数種の微生物が、他菌種の歯周組織構成細胞への侵入に影響を与えることにより歯周病を増悪することが考えられた。宿主の病態形成において微生物の宿主細胞への侵入は重要であるが、混合感染を想定した歯周病原性細菌による宿主細胞への侵入機構の分子生物学的研究は、緒についたばかりであった。宿主細胞の応答に関しては、*C. albicans* 生菌または死菌が LPS に対する宿主細胞の反応を高め、致死率を上げることがマウスの *in vivo* 実験で明らかになっており、申請者も *in vitro* で検討して同様の結果が得られた。しかしながら、宿主細胞への侵入における細菌と真菌の相互作用についての研究はほとんど行われていなかった。

申請者は、*C. albicans* 菌体または同菌のマンナンが *P. gingivalis* のヒト歯肉線維芽細胞への侵入増加を引き起こすことを報告した(第52回歯科基礎医学会発表(2010年9月21日))。以前、申請者は、*P. gingivalis* および口腔トレポネーマの口腔上皮細胞への侵入に接着分子 ICAM-1 と細胞表面の脂質に富んだ窪み caveolae が関与することを示唆した。さらに、別の接着分子である integrin や caveolae 非依存のエンドサイトーシスが *P. gingivalis* の歯肉上皮細胞への侵入に関与する報告もある。一方、歯周組織構成細胞、すなわち口腔上皮細胞、歯肉線維芽細胞および歯根膜線維芽細胞は Toll-like receptors を発現しているが、真菌の細胞壁に含まれる β -グルカンに対するレセプターである dectin-1 は Toll-like receptors のシグナル伝達と共に相乗的なサイトカイン産生を誘導する。申請者が検討した結果、歯肉線維芽細胞は dectin-1 を発現していた。また、*C. albicans* に対するマウスマクロファージ様細胞による認識と同細胞からのエスケープに *C. albicans* 自身の細胞壁成分が貢献する報告がある。以上のことから、*C. albicans* 菌体認識によるシグナル伝達が *P. gingivalis* の歯周組織構成細胞への侵入を増加することが考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、*P. gingivalis* による歯周組織構成細胞をはじめとした宿主細胞への侵入機構と *C. albicans* またはその菌体成分による *P. gingivalis* 侵入菌数増加のメカニズムを明らかにすることを目的として、これら微生物の侵入にかかわる宿主細胞のタンパク質分子の動態ならびに関連する菌体成分について探索するものである。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞の単離・培養：ヒト歯肉線維芽細胞は、便宜抜去歯から得られる歯肉から単離・培養して、増殖したものを継代培養後、実験に供試する。ヒト口腔上皮癌細胞である Ca9-22 細胞は 10% ウシ血清を含む MEM 培地で継代培養したものをを用いる。

(2) *P. gingivalis* の細胞内侵入：(1) で述べた種々の細胞と *C. albicans* 死菌または菌体成分を共培養後、無血清培地による洗浄で *C. albicans* を除去してから *P. gingivalis* を加える。90 分共培養後、メトロニダゾールおよびゲンタマイシンを含む培養液を用いて培養し、細胞外の菌体を除去する。次に蒸留水で種々のヒト細胞を溶解後、同溶解液をヘミンおよびメナジオン添加血液寒天培地に播種し嫌気培養する。1 週間後に得られた黒色コロニー数を算定し、*C. albicans* による *P. gingivalis* の宿主細胞侵入増加の有無を検討する。

(3) 細胞表面分子の発現変化の検討：*C. albicans* 菌体または(2)で *P. gingivalis* 侵入増加がみられた *C. albicans* 由来抽出物を種々のヒト細胞と培養して、菌体認識レセプターや接着分子、細胞骨格関連分子などの細胞表面または内部のタンパク質の発現変化の有無をフローサイトメトリーまたはウエスタンブロット法で検討する。

(4) シグナル伝達分子のリン酸化検出：そこで、*C. albicans* 菌体または(2)で *P. gingivalis* 侵入増加がみられた *C. albicans* 由来抽出物と培養した歯周組織構成細胞の全タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法や ELISA 法、またはフローサイトメトリーで Syk などのシグナル伝達分子のリン酸化を検出する。また、抑制剤を用いてシグナル伝達経路を検討する。

4. 研究成果

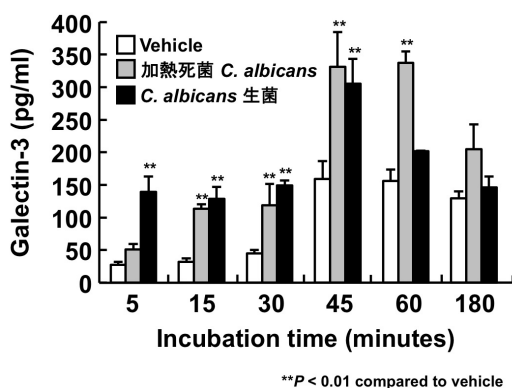
(1) *C. albicans* 加熱死菌または *C. albicans* の細胞壁から抽出したマンナンを含む培地でヒト歯肉線維芽細胞およびヒト歯肉上皮癌細胞を 3 時間前培養することによって、*P. gingivalis* の同細胞への侵入数が濃度依存的に増加することが判明した。

(2) フローサイトメトリーで検討した結果、Ca9-22 細胞は、*C. albicans* の細胞壁に含まれる β -glucan のレセプターである dectin-1 と *C. albicans* 認識に関与する galectin-3 を細胞表面に発現していた。また、

DC-SIGN, TLR2, protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2 はわずかに発現していた。そして、ヒト歯肉線維芽細胞は、dectin-1 と galectin-3 を細胞表面に発現していた。

(3) *C. albicans* 加熱死菌添加 15 分後に、Ca9-22 細胞の Syk 分子が活性化した。

(4) *C. albicans* 生菌 (MOI 1)、*C. parapsilosis* 生菌 (MOI 1) または *C. albicans* 加熱死菌 (MOI 100) 添加によって、Ca9-22 細胞の galectin-3 放出が 3 時間以内に増加した (下図)。



(5) *C. albicans* 生菌 (MOI 1) または *C. parapsilosis* 生菌 (MOI 1) 添加によって、ヒト歯肉線維芽細胞の galectin-3 放出が 3 時間以内に増加した。

(6) 抑制実験では、細胞運動阻害薬サイトカラシン D, PI3K または calpain 抑制剤 (10 または 50 μ M) を使用したが、いずれの抑制剤も *C. albicans* 生菌による Ca9-22 細胞の galectin-3 放出を抑制しなかった。すなわち、galectin-3 の放出は細胞骨格関連分子の活性化に非依存であった。

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 2 件)

Riyoko Tamai, Yusuke Kiyoura · *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* rapidly up-regulate Galectin-3 secretion by human gingival epithelial cells · *Mycopathologia* · 査読有 · 177 巻 · p.75-79 · 2014 年 · DOI: 10.1007/s11046-013-9725-1

Riyoko Tamai, Miho Sugamata, Yusuke Kiyoura · *Candida albicans* enhances invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* · *Microbial Pathogenesis* · 査読有 · 51 巻 · p.250-254 · 2011 年 · DOI: 10.1016/j.micpath.2011.06.009

[学会発表] (計 5 件)

玉井利代子 · *Candida* species rapidly up-regulate galectin-3 secretion by human gingival epithelial cells · 第 87 回日本細菌学会総会 · 2014 年 3 月 26 日 · タワーホール船堀

玉井利代子 · *Candida albicans* upregulates galectin-3 secretion by Ca9-22 cells · 第 42 回日本免疫学会学術集会 · 2013 年 12 月 12 日 · 幕張メッセ
玉井利代子 · *Candida albicans* による歯肉癌上皮細胞 Ca9-22 の galectin-3 放出増加 · 第 55 回歯科基礎医学会学術大会総会 · 2013 年 9 月 22 日 · 岡山コンベンションセンター

玉井利代子 · *Candida albicans* 加熱死菌によるヒト歯肉癌上皮細胞への *Porphyromonas gingivalis* の侵入菌数の増加 · 第 53 回歯科基礎医学会学術大会総会 · 2011 年 10 月 1 日 · 長良川国際会議場
Riyoko Tamai · Heat-killed *Candida albicans* promotes invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* · International Union of Microbiological Societies 2011 Congress · 2011 年 9 月 10 日 · 札幌コンベンションセンター

[図書] (計 0 件)

[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

玉井 利代子 (TAMAI, Riyoko)
奥羽大学 · 歯学部 · 准教授
研究者番号：90367566

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：