# 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号: 32404

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2011~2014

課題番号: 23593100

研究課題名(和文)歯周病原性細菌の細胞内侵入に及ぼす口腔内連鎖球菌の影響

研究課題名(英文)Effect of oral streptococci on the invasion ability of periodontopathic bacterium.

### 研究代表者

竹下 玲(Takeshita, Akira)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号:70236454

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文): ヒトロ腔上皮細胞様細胞に、P. gingivalis の細胞付着・細胞内侵入による生物活性に関するS. oralisの影響を検討することを考えた。まず、P. gingivalisの生物活性を検討した結果、IL-6の発現を誘導した。このIL-6発現は、本菌付着因子41kDa線毛の抗血清で抑制された。しかし、本菌線毛は、IL-6を誘導しなかった。また、このIL-6発現は、Nocodazole等の細胞内侵入阻害剤で抑制された。従って、このIL-6発現は、P. gingivalisの細胞内侵入が密接に関与すると考えられた。今後、このIL-6の発現へのS. oralisの影響を検討する。

研究成果の概要(英文): It has been demonstrated that Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) is a predominant periodontopathic bacterium, and the host cell invasion by P. gingivalis has been suggested as a possible mechanism of pathogenesis in periodontal. In this study, we have proposed the effect of oral streptococci on the bacterial invasion into the oral epithelial cell like cells. Then, P. gingivalis is able to induce the expression of IL-6 gene in the cell. Although anti-41k fimbrial antiserum inhibited the IL-6 gene expression, the bacterial fimbriae is not able to stimulate the cytokine expression. We observed that the induction of IL-6 is blocked by the invasion inhibitor such as Nocodazole, etc. Therefore, P. gingivalis invasion is able to induce IL-6 gene expression in the cells. Hereafter we examine the effect of oral streptococci on IL-6 expression induced via the periodontopathic bacterium.

研究分野: 口腔衛生学・口腔保健学

キーワード: 歯周病原性細菌 口腔上皮細胞 IL-6

## 1.研究開始当初の背景

わが国では、高齢者の増加とともに歯周炎患者が増加している。ゆえに、本疾患の予防のために様々な方法論が確立されつつある。しかしながら、本疾患の発症機構においては、まだ、不明な点も多く、その点が解明されれば、さらに、効果的な予防法や治療法が開発できるものと考えられる。

従来より、幾つかの病原性細菌[赤痢菌や 腸管出血性大腸菌(0157H7)など]は、上皮細 胞内侵入能を有し、細胞内侵入によって、感 染初期段階の宿主の防御(免疫)反応を逃れ た後、強力な外毒素により、急激な症状を誘 導すると考えられている。一方、最近、細胞 内への侵入能力を有しているが、非強毒素産 生菌であるブドウ球菌、インフルエンザ菌、 緑膿菌、並びにライム病ボレリアなどによる 感染症の病態は、慢性かつ難治性であること から、細菌の細胞内侵入は感染の成立のみな らず、慢性化病態の成立・進行にも密接に関 連する可能性が示されている。成人性歯周疾 患は、様々な細菌がお互いに凝集した「塊」 であるプラーク中に存在する Porphyromonas gingivalis(P. gingivalis)が、上皮細胞内 に付着・侵入し、感染を成立することによっ て、発症することが示されている。特に、細 胞内侵入は、本疾患の慢性化に密接に関係す る可能性が示されている。本菌の細胞への付 着には、本菌の有する線毛が、非常に重要で あり、付着因子として、本菌の感染の初期ス テップに密接に関係することが報告されて いる。また、本菌線毛は、サイトカイン誘導 能等の生物活性を有することも報告されて いる。このように、P. gingivalis 単独の病 原性因子・病原性機構についての知見は、解 明されつつあるが、本菌が他の菌と結合した 状態で、よりプラークに近い状態での病原性 については不明な点が多い。特に、プラーク 中に多量に存在する口腔内のグラム陽性連 鎖球菌との凝集した状態での P. gingivalis の病原性については、ほとんど検討されてい ない。

従来より、口腔内のグラム陽性の連鎖球菌 で あ る Streptococcus gordonii 、 並びに Streptococcus oralis 、 Streptococcus sanguis は、粘膜上皮細胞に 付着能を有することが報告されており、その 付着にリポタイコ酸が関与する可能性が示 されている。最近の研究は、このリポタイコ 酸の細胞レセプターが同定されている。さら に、興味あることに、P. gingivalisが、こ れらの連鎖球菌と結合することが報告され ている。元々、これらの連鎖球菌は、口腔内 に多く存在し、プラークの形成の初期段階に 機能的な役割を担っていることから、P. gingivalis の口腔内定着に密接に関係する と考えられている。さらに、P. gingivalis は、Streptococcus oralis (S. oralis) と、 線毛を介して結合することが明らかにされ ている。従って、Streptococcus oralis を

初めとする口腔内のグラム陽性の連鎖球菌は、P. gingivalisの歯面への初期付着をサポートするだけでなく、口腔粘膜上皮細胞への付着とその細胞内侵入に密接に関係する可能性が考えられる。しかしながら、実際に、S. oralisを初めとする口腔内のグラム陽性の連鎖球菌が、P. gingivalisの口腔粘膜上皮細胞への付着とその細胞内侵入に影響を与える可能性についての研究はほとんどもい。そこで、この「秘境」に科学のメスを入れ、歯周炎の発症機構について検討することは意義あることと考え、実験を行うことを企画した。

## 2. 研究の目的

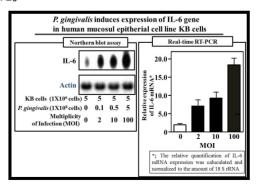
口腔内のグラム陽性の連鎖球菌が、P. gingivalis の口腔粘膜上皮細胞への付着とその細胞内侵入に影響を与える可能性についての研究が目的である。口腔連鎖球菌の影響を検討するアッセイ系として、P. gingivalis による IL-6 の遺伝子発現に関する研究を行うことも目的である。

## 3.研究の方法

- (1) P. gingivalis: 33277 株を使用した。
- (2) 細胞:口腔上皮細胞様細胞 KB 細胞を 使用した。
- (3) Northern blot assay; IL-6 cDNA の ハイブリダイゼーションを行い検討した。 (4) Real time PCR; TaqMan プローブを 用い、IL-6遺伝子発現を定量した。
- (5) 抗 41kDa 線毛抗体: 41kDa 線毛を認識 するポリクロナール抗体を作製し使用し た。
- (6) *P. gingivalis* LPS:フェノール法により抽出した。
- (7) 細胞内侵入阻害剤: Monodansylcadaverine、Ouabain、 Colchicines、Cytochalasin Dと Nocodazoleを使用した。
  - (8) IL-6 の定量; ELISA 法で検討した。

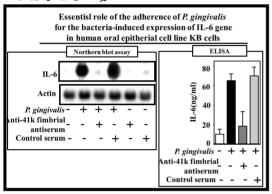
## 4.研究成果

(1) P. gingivalis は、ヒトロ腔上皮細胞様 細胞の IL-6 遺伝子発現を強く誘導し、その 誘導作用は、作用させた菌量に依存的であっ た。



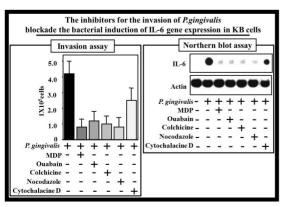
(2) P. gingivalisの細胞への付着と侵入を、 抗41kDa線毛抗体処理で抑制すると、本菌誘 導性IL-6遺伝子発現は、著明に抑制された。

また、実際の培養上清中の IL-6 の量に関して、ELISA 法で検討した結果、本菌によって誘導された IL-6 は、抗 41kDa 線毛抗体処理で、著明に抑制された。又、本菌の線毛は、種々の細胞に作用し、サイトカイン誘導能を有することが示されている。そこで、データは示さないが、本細胞に、本菌線毛を作用させたところ、有意な IL-6 誘導作用は認められなかった。又、本菌の超音破砕物、又は本菌 LPS も、同様に生物活性を示さなかった(データは示さない)。



(3) (2) の結果から、本細胞において、P. gingivalisが誘導する IL-6の遺伝子発現は、細胞外から、細胞膜上のレセプターを介して、誘導される生物活性でないように思われた。そこで、本菌の細胞内への侵入が、重要であると考え研究を行った。即ち、既報によって、P. gingivalis の細胞内侵入を抑制する薬剤として明らかになっているMonodansylcadaverine、 Ouabain、Colchicines、Cytochalasin D、並びにNocodazoleを細胞内侵入阻害剤として、実験に使用した。

私たちの研究グループでも、これらの細胞内侵入阻害剤が、実際に、P. gingivalisの細胞内侵入を抑制することを確認後、本菌誘導性 IL-6 遺伝子発現に対する各阻害剤の作用を検討したところ、強い抑制作用が認められた。これらのことから、本菌に誘導されるIL-6 遺伝発現は、本菌の細胞内侵入が、密接に関係することが示された。



#### 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 4 件)

Murayama R , Kobayashi M ,  $\underline{Takeshita\ A}$  ,  $\underline{Yasui\ T}$  and Yamamoto M : MAPKs , activator protein-1 and nuclear factor-kappa B mediate production of interleukin-1 beta-stimulated cytokines , prostaglandin  $E_2$  and MMP-1 in human periodontal ligament cells . J Periodontal Res , Vol. 46 , 2011 年 . 568-575

杉 陽子,清水良昭,深井智子,竹下 玲, 高橋明子,松本 勝,柴田えり子,宮澤 慶, 末續真弓,永井明子,半澤明子,流石知佳, 上田智恵,兼定幸代,仲筋宣子,<u>安井利一</u>: 中学生・高校生を対象として試作した「あご の健康診断チャート」の学校歯科保健活動に おける有用性.明海歯科医学,41 巻,2011 年,20-33

竹下 玲,江端 淳,末續真弓,流石知佳,中川和弘,小山主之,田中園治,遠藤浩正,田中 入,柏崎秀一,熊倉 学,元治茂樹,大高義文,杉山卓司,佐藤 豊,河野 哲,川俣富貴子,佐藤淑郎,中林靖雄,中筋宣子,杉山義祥,深井智子,<u>安井利一</u>:

Porphyromonas gingivalis 線毛はマウス単球性骨髄性白血病細胞株 M1 細胞のアポトーシスを抑制する.明海歯科医学,40 巻,2011年,67-83,

宮澤 慶,松本 勝,<u>竹下 玲</u>,深井智子, 高橋明子,北 邦宏,<u>安井利一</u>:歯科衛生士 学校におけるスポーツ歯学の取り組みにつ いて,スポーツ歯学17(1),2013年,14-19,

流石知佳,松本 勝,<u>竹下 玲</u>,北 邦宏, 仲筋宣子,小野大地,滝田裕美,<u>安井利一</u>: 療養型病床群入院患者への口腔保健評価手 法に関する研究,明海歯科医学 42(2),2013 年,130-139

# [学会発表](計 11 件)

竹下 珍, 末續真弓, 広瀬公治, 高野安紀子, 岡本和彦, 福浦えり子, 上田知恵, 下島孝裕, 藤沢政紀, 荒木久生, 安井利一: Porphyromonas gingival is 線毛の阻害作用における $\square_2$ -integrin・CD11/CD18 の重要性の解析.第 60 回日本口腔衛生学会・総会, 松戸市, 2011 年 10 月

廣瀬公治,沼田 匠,大橋 明,<u>竹下 玲,</u> 安井利一:ニコチンによるマクロファージの TLR-2発現誘導について.第60回日本口腔衛 生学会・総会,松戸市,2011年10月

竹下 玲, 広瀬公治, <u>高野安紀子</u>, <u>岡本和彦</u>, 松本 勝, 柴田えり子, 流石知佳, 上田知恵, 仲筋宣子, 下島孝裕, 大川周治, <u>安井利一</u>: Porphyromonas gingival is 線毛による単球前駆細胞様 M1 細胞のアポトーシスの阻害作用に関す情報伝達機構の解析,第 61 回日本口腔衛生学会・総会,横須賀市, 2012 年5月

広瀬公治,大橋明石,竹下玲,車田文雄,

安井利一:ニコチンが修飾する歯肉上皮細胞 からの炎症性サイトカインの誘導,第61回 日本口腔衛生学会・総会,横須賀市,2012.5 遠藤浩正,深井穫博,三木昭代,島田 篤, 申 基喆,深井智子,竹下 玲,安井利一:埼 玉県医科歯科連携推進会議を立ち上げて~2 年間の取り組み~,第53回日本歯科医療管 理学会総会・学術大会,那覇市,2012年7月 竹下 玲,廣瀬公治,高野安紀子,岡本和 彦,松本 勝,深井智子,柴田えり子,上田 知恵,仲筋宣子,下島孝裕,大川周治,安井 利一: Porphyromonas gingivalis 線毛による 単球様 M1 細胞のアポトーシスの阻害作用に 関する tyrosine kinase の役割,第62回日 本口腔衛生学会・総会,松本市,2013年5月 広瀬公治,沼田 匠,大橋明石,竹下 玲, 安井利一:ニコチンによるマクロファージの TLR-2 の発現誘導について,第62回日本口腔 衛生学会・総会,松本市,2013年5月

宮澤 慶,松本 勝,竹下 玲,深井智子,高橋明子,北邦宏,仲筋宣子,杉山義祥,安井利一:部分的咬合干渉と身体動揺について,第24回日本スポーツ歯科医学会,渋谷区,2013年6月

竹下 珍, 広瀬公治, 岡本和彦, 高野安紀子, 末續真弓, 松本 勝, 清水良昭, 柴田えり子, 下島孝裕, 大川周治, 安井利一: 骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞における TNF- による単球走化性因子 MCP-1 の発現誘導作用について, 第 63 回日本口腔衛生学会・総会,熊本市, 2014 年 5 月

広瀬公治,大橋明石,<u>竹下 玲</u>,<u>安井利一</u>; Porphyromonas gingivalis による肺上皮細胞 からの LL-37 の発現について,第63回日本 口腔衛生学会・総会,熊本市,2014年5月

<u>岡本和彦</u>, 竹下 玲, 曽根峰世, 栗原美詠, 下川原 忍, 藤澤政紀, <u>安井利一</u>, 大川周治; 骨芽細胞における TNF- による単球走化性 因子 MCP-1 の発現誘導作用について, 平成 26 年度(社)日本補綴歯科学会第 123 回学術大会, 仙台市, 2014 年 5 月

〔図書〕(計 1 件)

竹下 玲, 学健書院, スタンダード衛生・公衆衛生(第14版), 2014, 43-75,

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

出願年月日: 国内外の別:

取得状況(計 件)

名称: 発明者: 権利者: 種類: 番号: 出願年月日: 取得年月日: 国内外の別:

6.研究組織

(1)研究代表者

ホームページ等

竹下 玲 (TAKESHITA, Akira) 明海大学・歯学部・准教授 研究者番号:70236454

(2)研究分担者

岡本和彦 (OKAMOTO, Kazuhiko) 明海大学・歯学部・准教授 研究者番号:50 271234

高野安紀子 (TAKANO, Akiko) 明海大学・歯学部・講師 研究者番号: 20337504

安井利一 (YASUI, Toshikazu) 明海大学・歯学部・教授 研究者番号: 20146252

(3)連携研究者

( )

研究者番号: