

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792370

研究課題名(和文) ヒト口腔細菌叢構成菌の自然免疫応答による選択メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of oral flora selection by innate immunity.

研究代表者

角田 衣理加 (KAKUTA, ERIKA)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：30585469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Streptococcus mutans (S. mutans) UA159のヒト ディフェンシン 2 (hBD2) に対する抵抗性について検討した。dlt欠失株では、hBD2の濃度依存的に生菌数が減少する傾向が認められたことから、dlt産物がペプチド耐性に寄与している可能性が示唆された。細胞表面の疎水性は、dlt欠失株で親株より低かった。ショ糖添加液体培地で培養し、試験管表面への付着とグルカン産生を検討したところ、dlt欠失株は親株より少なかった。以上のことから、電位チャージを含めた細菌表面性状とグルカン産生がS. mutans のhBD2耐性に影響している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, resistance against human beta-defensin 2 (hBD2) in Streptococcus mutans UA159 was investigated. In the dlt operon deleted mutant but not in the parent, viable bacterial count tended to decrease by hBD2 treatment in a dose-dependent manner, suggesting that the products of dlt operon might contribute to the peptide-resistance. Cell surface hydrophobicity was lower in the dlt-deleted strain than that in the parent. When cultured in sucrose-supplemented broth, both glass surface-adhesion and the glucan production in dlt deleted strain was lesser than that in the parent. Taken together, the bacterial surface characteristics including electrostatic charge and glucan production might affect to hBD2 resistance in S. mutans.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：Streptococcus mutans ディフェンシン

1. 研究開始当初の背景

生物が生来持っている生体防御機構として、植物、昆虫、哺乳類などに抗菌ペプチドが存在していることが知られている¹⁾。このうちヒトにおける抗菌ペプチドはディフェンシンと総称され、自然免疫として病原性微生物の侵入・定着を防ぐことが知られている。ディフェンシンには、 α -ディフェンシンと β -ディフェンシンの2グループがあり、その違いは、システインモチーフである。 α -ディフェンシンは、気道における抗菌ペプチドとして発見されたのが最初であり²⁾、ディフェンシンは、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、マイコバクテリア、真菌に抗菌活性を持つ³⁾。唾液や口腔においてもディフェンシンによる防御機構が報告されている⁴⁻⁶⁾。 β -ディフェンシンのうち、hBD1は恒常的に発現が見られるのに対し、hBD2は細菌感染や炎症性サイトカイン刺激によってその発現が誘導される特徴をもっている^{7,8)}。抗菌メカニズムは、hBD2が8量体を形成し、細菌の細胞膜にポアを形成することによる⁹⁾。

口腔レンサ球菌は、ヒト口腔において最も優位に常在する細菌として知られている。しかし、なぜ、ヒト口腔において口腔レンサ球菌が優位に常在するのかは未だ不明である。Nishimuraらによると、*S. anginosus*と*S. mitis*は、ヒト α -ディフェンシン2 (hBD2) に対して低感受性であることが報告されている¹⁰⁾。*S. anginosus*は、プラーク中にみられる菌であり、化膿性炎起因菌として知られ、細菌性心内膜炎を起こす頻度はレンサ球菌中最も高いといわれる。さらに、*S. anginosus*のうち、溶血を示すものは口腔癌、食道癌との関連が報告されている¹¹⁾*S. mitis*は、

口腔粘膜、プラーク、唾液に広く分布し、*S. anginosus*と同様に細菌性心内膜炎の原因菌の1つとして重要な菌の1つである。これまで、hBD2は、Naイオン¹²⁾、Caイオン、Mgイオン¹³⁾の存在により、濃度依存的に抗菌活性が減弱することが知られており、イオン環境が抗菌作用発現に重要だと考えられる。しかし、*S. anginosus*と*S. mitis*のhBD2低感受性のメカニズムについて言及した報告はない。今回、研究代表者が行った実験によると、う蝕原性細菌として知られる*Streptococcus mutans*には高いhBD2分解能があることが示され、*S. anginosus*と*S. mitis*についても細胞破砕液にhBD2分解能があることが示された。このことから、口腔レンサ球菌は、hBD2低感受性であることが、ヒト口腔に優位に常在できる根源ではないかと考えた。そこで、本研究では、口腔レンサ球菌のhBD2低感受性のメカニズムを分子生物学的手法を用いて解明し、なぜヒト口腔にレンサ球菌が優位に常在できるかを新たな視点から解明することを目的とする。このメカニズムが解明されれば、う蝕予防、口腔癌、食道癌予防へつながる可能性があり、臨床的意義も大きいと考えられる。

【参考文献】

- (1) Defensins. Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Eur J Haematol. 44:1-8. 1990
- (2) Tracheal antimicrobial peptide, a novel cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. Diamond G, Zasloff M, Eck H, et al. Proc Natl Acad Sci. 88:3952-3956. 1991
- (3) Defensins of vertebrate animals.

- Lehrer RI, Ganz T. *Curr Opin Immunol.* 14:96-102. 2002
- (4) Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, *et al.* *Infect Immun.* 67:2740-2745. 1999
- (5) Expression of the antimicrobial peptide, human defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, *et al.* *J Dent Res.* 79:1669-1674. 2000
Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9:399-414. 1998
- (6) Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. *Crit Rev Oral Med.* 9:399-419. 1998
- (7) A peptide antibiotic from human skin. Harder J, Bartels J, Christophers E, *et al.* *Nature* 387:861.1997
- (8) Production of α -defensins by human airway epithelia. Singh PK, Jia HP, Welsh MJ, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:14961-14966. 1998
- (9) Innate immunity. Ancient system gets new respect. Gura T. *Science.* 16:291(5511):2068-71. 2001
- (10) Oral Streptococci Exhibit Diverse Susceptibility to Human α -defensin-2: Antimicrobial Effects of hBD-2 on Oral Streptococci. E Nishimura, A Eto, M Kato *et al.* *Curr Microbiol.* 48:85-87. 2004
- (11) Effect of ions On antibacterial activity of human beta defensin 2. Tomita T, Hitomi S, Nagase T, *et al.* *Micriobiol Immunol.* 44:749-754. 2000
- (12) Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin2. Matsuzaki K, Sugishita K, Fujii N, *et al.* *Biochemistry* 34:3423-3429. 1995
- (13) Human α -defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotics expressed in human lung. Bals R, Wang X, Freeman T, *et al.* *J Clin Invest* 102:874-880. 1998

2 . 研究の目的

口腔レンサ球菌 (*Streptococcus* 属) は、ヒト口腔常在菌のなかで最も優勢であることが知られている。口腔レンサ球菌について、hBD2 の分解能を調べた結果、*Streptococcus mutans* が分解酵素を持つ可能性があることを発見した。このことから、ヒト抗菌ペプチドであるディフェンシンがヒト口腔常在細菌叢構成に関与しているのではないかと考えた。そこで、本研究では、ヒト口腔レンサ球菌の口腔常在細菌種の選択メカニズムの解明を自然免疫という切り口から解明することを目的とする。

3 . 研究の方法

平成24年度は、口腔レンサ球菌である *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)、

Streptococcus anginosus (*S. anginosus*)を
対象とし、hBD2に対する耐性の有無およびそ
れぞれの被験菌がhBD2を分解できるかどうか
検討を行った。

平成 25 年度は、*S. mutans* UA159 株を用
い、*dlt* 欠失株を作製した。*dlt* 遺伝子は、
細菌の細胞膜表面の電氣的チャージをプラ
スに傾かせることにより、hBD2 が細胞膜表面
に付着し、細胞膜にポア形成することを阻止
し、hBD2 に対する抵抗性を発揮するとされて
いる。作製した *dlt* 欠失株を用いて、hBD2 に
対する感受性試験を行った。

また、細胞膜の変異があるため、疎水性や付
着性についての変化があると考え、*dlt* 欠失
株と親株を用いて、菌体疎水性試験および
付着性試験を実施した。

4 . 研究成果

(1)hBD2 耐性および hBD2 分解能の検討

S. mutans、*S. anginosus*を対象とし、hBD2
耐性およびhBD2分解能の検討を行った結果、
S. mutans、*S. anginosus*ともに、hBD2に明
らかな殺菌効果は認められず、PIの存在が
hBD2の分解を阻害するという結果は得られな
かった(図 1 , 2)。

図 1

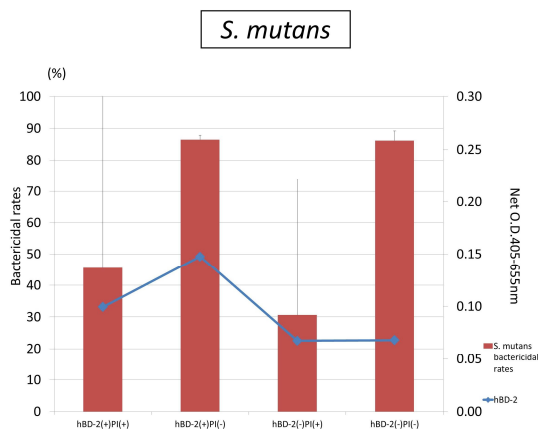
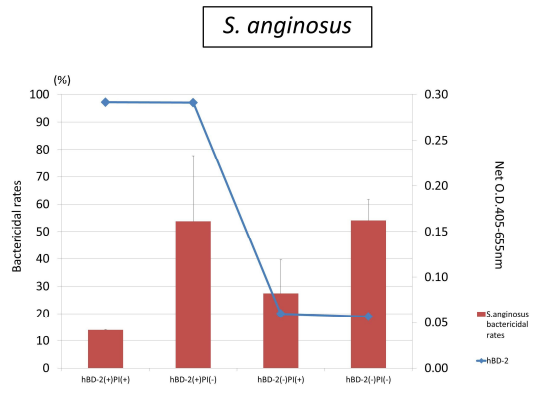


図 2



(2) *dlt* 欠失株の hBD2 に対する感受性の検討

前年度の結果を受け、細胞膜電位の陽チャ
ージ転換を担うとされる *dlt* 遺伝子の欠失株
を *S. mutans* UA159 株を用いて作製した(図
3)。この *dlt* 欠失株を用いて、hBD2 に対す
る感受性試験を行った。その結果、親株に比
べ、濃度依存的にやや感受性が高まる傾向が
認められた(図 4)。

図 3

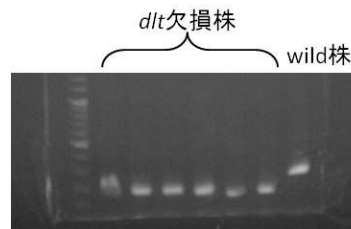
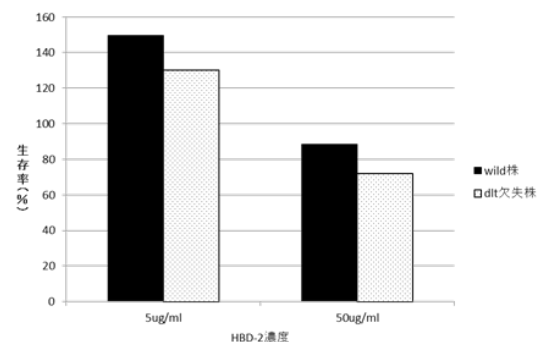


図 4



(3) *dlt* 欠失株の菌体疎水性の検討

dlt 欠失株と親株を用いて、菌体疎水性試
験を実施した。その結果、*dlt* 欠失株(54%)

で親株(88%)より低かった。このことから、電位チャージを含めた細菌表面性状が関与する可能性が示唆された。

(4) *dlt* 欠失株の付着性の検討

細胞膜の変異があるため、付着性についての変化があると考え、*dlt* 欠失株と親株を用いて、試験管表面への付着性試験を実施した。その結果、非付着菌体の量が *dlt* 欠失株と親株がほぼ同量にも関わらず、同分画からのWIG量は親株より *dlt* 欠失株が少なかった(図5, 6)。

図5

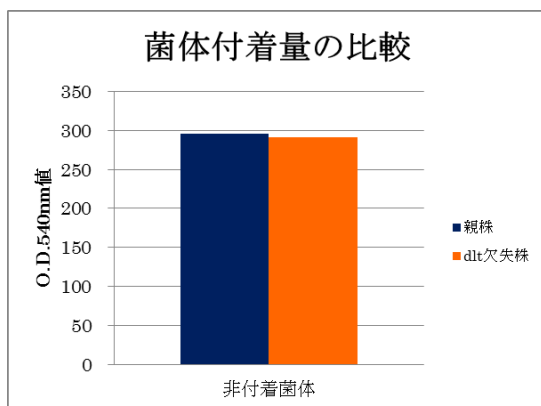
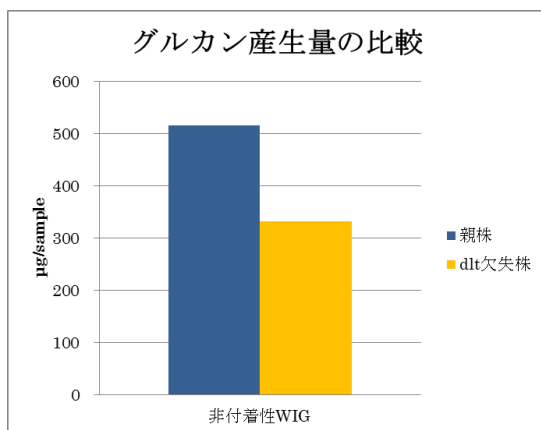


図6



以上のことから、電位チャージを含めた細菌表面性状とグルカン産生が *S. mutans* の hBD2 耐性に影響している可能性が示唆された。

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 5 件)

Kakuta E, Nomura Y, Naono Y, Koresawa K, Shimizu K, Hanada N. Correlation between health-care costs and salivary tests. Int Dent J. 2013.63:249-53.

査読有

野村 義明, 福田 雄, 角田 衣理加, 村田 貴俊, 大塚 良子, 今井 奨, 花田 信弘.

Streptococcus anginosus 選択培地開発における抗菌剤の検討 BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM26:89-92,2013. 査読有

八島 章博, 福永 裕子, 岡本 真理子, 鴨井 美帆, 園田 華子, 中川 幸香, 角田 衣理加, 西岡 千賀子, 湯浅 茂平, 渡貫 圭, 山本 健, 前田 伸子, 中川 洋一. 社交不安障害と口臭症. 日本口臭学会会誌 4:9-13.2013. 査読有

角田 衣理加, 井田 亮, 野邑 ひろみ, 玉置 洋, 阿保 備子, 大塚 良子, 村田 貴俊, 野村 義明, 花田 信弘. Oral Conditions that Affect Salivary Biomarkers: Preliminary Survey by Self-administrated Questionnaire. 口腔衛生学会雑誌:62 391-396.2012. 査読有

西岡 千賀子, 長谷川 直子, 岡部 早苗, 野口 恵弥子, 角田 衣理加, 八島 章博, 湯浅 茂平, 山本 健, 中川 洋一. 口臭の発生頻度ならびに自覚症状発現の背景. 日本口臭学会会誌 3 :7-11.2012. 査読有

[学会発表](計 7 件)

角田 衣理加ら. 唾液中細菌検査および血漿抗体価検査による SPT 期進行の予知判定. 第 56 回秋季日本歯周病学会. 2013.9.22. 前橋市民文化会館(群馬県).

Erika Kakuta et al. Human Beta Defensin-2 adsorption and antimicrobial effects against oral streptococci. 6th The Annual Meeting of the IADR Continental European Division. 2013.9.4 - 9.7. Palazzo dei Congressi (イタリア).

大塚 良子ら. ムタナーゼとデキストラナーゼからなるキメラ酵素によるバイオフィルムの分解. 第 77 回 鶴見大学歯学会例会. 2013.6.29. 鶴見大学会館(神奈川県)

武内博朗ら. 口腔の健康に関する微生物学的エンドポイントの再考. 第 62 回口腔衛生学会総会. 2013.5.15-5.17. キッセイ文化ホール(長野県).

Erika Kakuta et al. Degradation of water-insoluble glucan by mutanase and dextranase fusion enzyme. 45th Meeting of the Continental European Division of the IADR. 2012.9.12-9.15. フィンランディアホール(フィンランド).

Erika Kakuta et al. Relationship between medical expenses and salivary biomarkers. 100th FDI Annual World Dental Congress. 2012.8.29 - 9.1. 香港コンベンション・エキシビジョンセンター(中国).

角田衣理加ら. 高機能キメラ酵素の創出による歯面バイオフィルム分解の試み. BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM総会. 2012.7.13. ガーデンパレスホテル(大阪府).

6. 研究組織

(1)研究代表者

角田 衣理加 (Erika Kakuta)
鶴見大学・歯学部・学部助手
研究者番号：30585469

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし