

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670794

研究課題名(和文)口腔レンサ球菌との共生を目指して：自然免疫の増強

研究課題名(英文)Commensalism with oral streptococci: Up-regulation of innate immunity

研究代表者

高田 春比古 (Takada, Haruhiko)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30135743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔に常在するレンサ球菌には、プロバイオティクス機能が期待できる。本研究では、これら細菌と共生することで、自然免疫が増強される可能性を探った。その結果、1) 活性型ビタミンD類(VD)で口腔上皮細胞を刺激すると様々な抗菌因子、特にLL-37産生が亢進した。2) VDと菌体成分を組み合わせると、更に有効であった。3) LL-37は歯周病原性で様々な全身疾患にも係るPorphyromonas gingivalisの増殖を抑制した。今後は、口腔レンサ球菌とVDとを組み合わせ、抗菌作用の増強を図り、口腔ならびに全身の健康増進の可能性を模索したい。

研究成果の概要(英文)：Oral commensal streptococci may act as probiotics. In this study, we investigated whether commensalism with oral streptococci activates the innate immune system of the host. We demonstrated that: 1) the active form of vitamin D (VD) species activated oral epithelial cells to produce anti-bacterial factors, especially CAP18 (LL-37); 2) combined stimulation of oral epithelial cells with VD and bacterial components induced a higher level of production of LL-37; and 3) LL-37 inhibited the proliferation of Porphyromonas gingivalis, which has been suggested as a causative agent of not only periodontal diseases and also various systemic diseases. Based on these findings, we aim to improve the oral as well as systemic health of the host via the control of oral bacterial flora with the combined application of oral streptococci and VD species.

研究分野：口腔微生物学・免疫学

キーワード：口腔レンサ球菌 口腔上皮細胞 自然免疫 抗菌因子 LL-37

1. 研究開始当初の背景

口腔常在菌叢の主体を成すレンサ球菌は各種糖類を代謝(発酵)して乳酸等の有機酸を産生する広義の乳酸菌類に属している。ビフィズス菌、乳酸桿菌、腸球菌等(いずれも乳酸菌類)の生菌を経口摂取して腸内細菌叢を改善して健康増進を目指すプロバイオテイクスが広く受け入れられている。即ち、所謂「善玉菌」を摂取して「悪玉菌」を駆逐する手法が実用化されている。口腔レンサ球菌も「善玉菌」の要件を備えている。我々は期せずして、その恩恵に浴しているのかもしれない。

近年、自然免疫の研究が急速に進展して、口腔領域でもその役割が注目されている。申請者は口腔上皮細胞の自然免疫系に着目して、1)口腔上皮細胞が微生物に特有の成分をパターン認識するToll様受容体(TLR)やNOD1/NOD2を具備していること。2)その機能は、各種抗菌因子産生に特徴があることを実証してきた(*Curr Pharm Design* 2006; *J Dent Res* 2008)。上皮細胞が産生する抗菌因子としてはディフェンシン類とカテリシジンが良く知られている。ヒトではCAP18/LL-37が唯一のカテリシジンである。近年、LL-37は抗菌作用の他に多彩な作用を発揮することが次々に解明されている。申請者らは、LL-37が歯肉線維芽細胞に作用して肝細胞増殖因子(HGF)産生を増強することを見出した。HGFは各種細胞に対して、増殖、運動、分化を促す多機能因子であり、口腔粘膜の恒常性維持にも関わる可能性がある。

一方、骨代謝系で重要な役割を担う活性型ビタミンD3(VD3)が免疫系にも作用することが知られている。筆者らも、VD3で前処理したヒト単球系細胞が各種TLRならびにNOD1/2リガンド刺激に応じて、高レベルの炎症性サイトカイン応答を示すことを見出した。上皮細胞の抗菌因子産生に関しても同様の仕組みが働くかもしれない。

そこで、VD3と口腔レンサ球菌を組み合わせ、自然免疫を更に増強して、天然のプロバイオテイクスの可能性を実証して、これらの菌との共生の概念を確立したいと考えた。

2. 研究の目的

口腔上皮細胞は微生物をパターン認識する自然免疫レセプターを具備しており、リガンド刺激に応じて様々な抗菌因子を産生する。一方、ビタミンD類も抗菌因子産生を誘導する。抗菌因子のCAP18/LL-37は歯肉線維芽細胞にHGF産生を促す。そこで、1)各種口腔常在菌(TLR2,4, NOD1,2 リガンド等を具備することが想定される)、特にレンサ球菌種と、キノコ類等の食品に含まれるビタミンD類が口腔上皮細胞に対して相乗的にCAP18産生を誘導し、2)CAP18刺激で歯肉線維芽細胞がHGF産生を増強し、3)産生されたHGFが口腔上皮の恒常性維持に重要な役割を演じるとの作業仮説を着想した。この作業仮説を実証して、自然免疫とビタミン類のクロストークが口腔上皮の恒常性維持に寄与する可能性を提示するとともに、食餌性ビタミンDの新規な機能(機能栄養食品の可能性)の解明を目指した。これらの研究によって、口腔レンサ球菌種との共生関係がヒトの健康増進、特に口腔粘膜の恒常性維持に繋がる可能性を提起したいと考えて本研究を企画した。

3. 研究の方法

(1) 各種口腔レンサ球菌の自然免疫増強作用の比較検討

初年度は研究棟の改修作業に伴い仮移転先の仮設研究室では当初計画の実施は困難であった。そこで、筆者らがこの方面で実施してきた多くの実験成績を整理して、供試すべき菌種・菌株を絞り込むことにした。即ち、化学合成NOD2リガンドのムラミルジペプチド(MDP)を予め静脈注射したC3H/HeNマウスにレンサ球菌の全菌体を尾静脈注射して、血

清中の TNF- α ならびに IL-6 レベルを測定した (バイオアッセイによった)。各種菌体成分の口腔上皮細胞に対する抗菌因子産生誘導作用を検討した。

(2) 各種菌体成分の口腔上皮細胞に対する抗菌因子産生誘導作用の検討

レンサ球菌実験に先立って、各種菌体成分に対応する化学合成リガンドで、口腔上皮細胞を刺激して抗菌因子産生誘導作用を検討した。口腔上皮系細胞としては、ヒト口腔組織由来の株価細胞：HSC-2, HSC-3, HSC-3 および Ca9-22 を供試した。

(3) 活性型ビタミンD類の口腔上皮細胞に対する抗菌因子産生誘導作用の検討

活性型ビタミン D₃ (VD₃), そのアナログ OCT (中外製薬より分与) キノコ等に含まれるビタミン D₂ の活性型 (VD₂) で上記株化ヒト口腔上皮細胞を刺激して抗菌因子産生誘導作用を検討した。

(4) 菌体成分とビタミン D 類を組み合わせたの抗菌因子産生誘導の検討

(2)(3)の成績に基づいて、最適な組み合わせで効率よく抗菌因子産生を誘導する条件を探る。さらに口腔レンサ球菌とビタミン D 類の組み合わせる条件を模索する。

4. 研究成果

(1)各種口腔レンサ球菌の自然免疫増強作用の比較検討

総計 13 菌種 131 菌株の口腔レンサ球菌の全菌体はいずれも MDP 前投与した C3H/HeN マウスの血中に、TNF- α ならびに IL-6 を誘導する明確な作用を示した。唾液ならびにデンタルプラークの代表的な常在菌である *Streptococcus salivarius* と *Streptococcus sanguinis* にも明確な作用が確認された (成績は磯部 豊博士の学位論文中に公表) ので、これら 2 菌種を中心に今後の研究を組み立てることとした。

(2) 各種菌体成分の口腔上皮細胞に対する抗菌因子産生誘導作用の検討

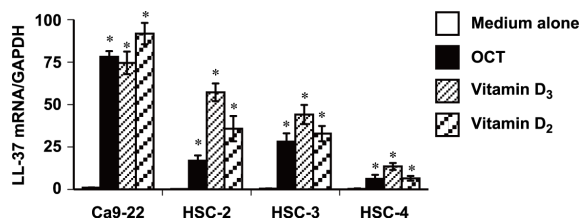
ヒト口腔組織由来の株価細胞：HSC-2, HSC-3, HSC-3 および Ca9-22 ; を供試して、各種菌体成分に対応する化学合成リガンドの抗菌因子産生誘導作用を検討した。その結果、TLR2 ならびに TLR4 リガンドが、遺伝子レベル

(real-time PCR) で β デイフェンシン (HBD2, HBD3) ならびに LL-37 を誘導したが、その作用は弱かった。

(3) 活性型ビタミンD類の口腔上皮細胞に対する抗菌因子産生誘導作用の検討

活性型ビタミン D 類の VD₃, OCT, D₂ の活性型 (VD₂) で上記株化ヒト口腔上皮細胞を刺激して抗菌因子産生誘導作用を検討したところ、いずれも強力に LL-37 (CAP18) を誘導した。さらに、上記 TLR2, TLR4 リガンドと共存させると更に高レベルの LL-37 を誘導した。そこで、レンサ球菌に関してもビタミン D 類との組み合わせでの研究を進める方向で研究を進めることにした。その際の至適条件を探るために、ビタミン D 類の作用を詳細に検討した。

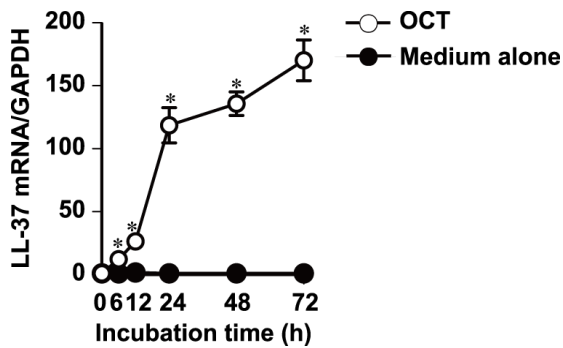
ビタミン D 類による各種口腔上皮細胞株に対する LL-37 誘導作用



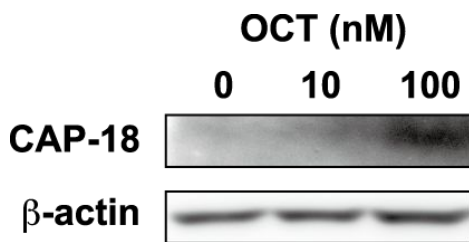
各種口腔上皮系細胞株を 10%FBS 加 E-MEM 培地に各種ビタミン D 類 (100 nM) を添加して 24 時間培養して、LL-37 遺伝子発現の動態を real-time PCR 法で測定した。供試した 4 種の口腔上皮細胞株はいずれもビタミン D 類の刺激に応じて、明確な LL-37 応答を示した。なかでも Ca9-22 の反応性が最も顕著であった。別の研究 (ヒト単球系) ではビタミン D 類の中で、OCT が最も強力に作用したので、当面 OCT を主体に研究を進めることにした。

OCT 刺激による口腔上皮細胞株 Ca9-22 の LL-37 遺伝子発現増強

OCT (100 nM) を Ca9-22 培養系に添加して、継時的に LL-37 mRNA 発現を測定したところ 72 時間まで発現が上昇した。サイトカイン産生誘導に比較して、長時間に亘る遺伝子発現の上昇が認められることが判明した。

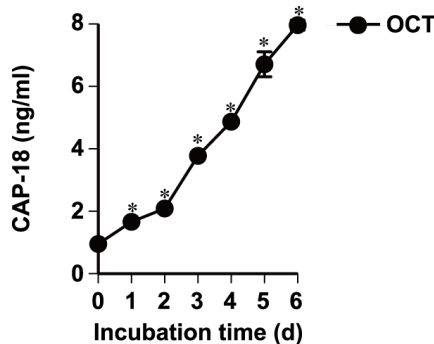


OCT 刺激による口腔上皮細胞株 Ca9-22 の CAP18 産生増強 (Western blotting)



LL-37 は CAP18 分子の活性構造である。LL-37 遺伝子発現の上昇に対応して実際に CAP18 分子の産生が高まっているかどうかを検討するために、OCT (10 ないし 100 nM) で 24 時間刺激した Ca9-22 細胞を回収して CAP18 産生レベルを Western blot 解析した。その結果、明確な産生増強が照明された。

OCT 刺激による口腔上皮細胞株 Ca9-22 の CAP18 産生増強 (ELISA)

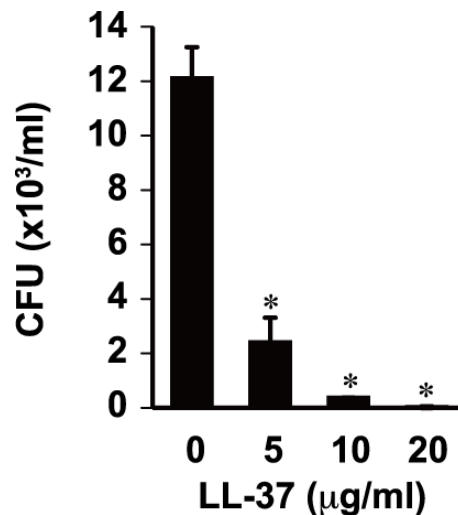


更に CAP18 産生増強の time-course を検討するため、OCT (100 nM) で刺激した Ca9-22 細胞の培養上清中の CAP18 を継時的に ELISA 法で測定した。その結果、培養 6 日目まで、産生の増加が認められた。即ち、遺伝子発現の上昇に対応して極めて長時間に亘る CAP18 産生の増強が証明された。

LL-37 の歯周病原細菌に対する抗菌作用

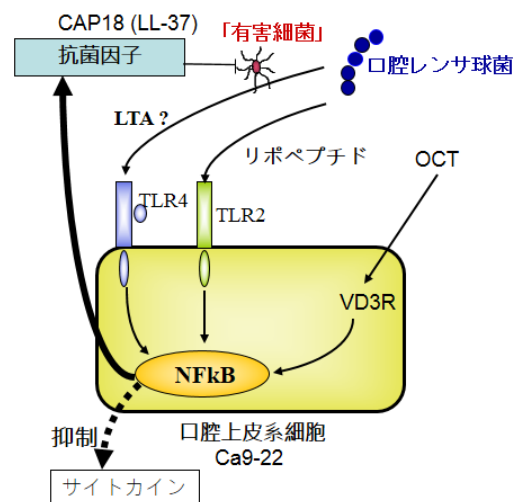
産生された LL-37 (CAP18) が実際に口腔内の病原菌に有効であるかどうかを検討するために、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* に対する合成 LL-37 (順天堂大学の長岡 功教授より恵与) を *P. gingivalis* 培養に添加して、継時的に生菌数 (培養してコロニー数を測定) を

算定した。その結果、LL-37 の濃度に依存して明確な抗菌作用が証明された。



<今後の展望>

以上の成績より、口腔のプラークならびに唾液中に常在する代表的なレンサ球菌種の *S. sanguinis* ならびに *S. salivarius* と VD 類 (当面 OCT を供試予定) を組み合わせて口腔上皮細胞 (当面 Ca9-22 を供試予定) を刺激すると抗菌因子、特に CAP18 (LL-37) を高レベルに誘導することが期待される。産生された LL-37 は口腔の有害細菌、即ち *P. gingivalis* に代表される歯周病関連細菌の増殖を抑えて、口腔粘膜の健全な恒常性維持に寄与するものと期待される (下記概念図参照)。 *P. gingivalis* の全身的な病理作用を勘案すると、この効果は口腔に留まらず全身の健康維持にも寄与すると考えられる。



口腔レンサ球菌と上皮系細胞の自然免疫 (概念図)

口腔レンサ球菌の表層には各種自然免疫リガンドが局在している。これらは宿主細胞の TLR2/4 を活性化する。一方、活性型 VD 類 (OCT 等) も強力に上皮系細胞を活性化する。両者は相乗的に作用する可能性が高い。上皮系細胞では自然免疫系刺激に応じて専ら抗菌因子を産生する。この結果、口腔レンサ球菌は口腔の有害細菌を駆逐して、宿主の健康維持に寄与するものと期待される。

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2件)

(1) **Ishida M, Kitaura H, Kimura K, Sugisawa H, Aonuma T, Takada H, Takano-Yamamoto T.** Muramyl dipeptide enhances lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption through increased RANKL expression in stromal cells. *Journal of Immunological Research* doi 10.1155/2015/132765, 2015 (査読有)

(2) **Ikeuchi T, Nakamura T, Fukumoto S, Takada H.** A vitamin D3 analog augmented interleukin-8 production by human monocytic cells in response to various microbe-related synthetic ligands, especially NOD2 agonistic muramyl dipeptide. *International Immunopharmacology* **15(1)**: 15-22, 2013, doi 10.1016/j.intimp.2011.07.025 (査読有)

〔学会発表〕 (計2件)

(1) **多田 浩之、松下 健二、長岡 功、高田 春比古** *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインは IL-33 誘導を介してヒト歯肉上皮細胞からの CAP18/LL-37 産生をダウンレギュレーションする 第 20 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会(東京) 2014.12.6

(2) **多田 浩之、松下 健二、高田 春比古** *Porphyromonas gingivalis* によるヒト歯肉上皮細胞の LL-37 発現誘導は IL-33 により下方制御される 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会(福岡) 2014.9.27

〔図書〕 (計1件)

Tada H, Shimauchi H, Takada H, Matsushita K. Possible roles of IL-33 in periodontal diseases: *Porphyromonas gingivalis* induced IL-33 in human gingival epithelial cells. In Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N (Eds) *Interface Oral Health Science 2014*, Springer, Tokyo 2014, pp 293-303.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 春比古 (TAKADA, Haruhiko)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：30135743

(2) 研究分担者

多田 浩之 (TADA Hiroyuki)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：70431632