

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893217

研究課題名(和文)微小流路実験システムを用いた宿主-寄生体相互関係に関与する因子の解析

研究課題名(英文)Analysis of the host - parasite related factors using micro channel system.

## 研究代表者

守下 昌輝 (Morishita, Masaki)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60710522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：RAW264.7を歯周病原細菌*A. actinomycetemcomitans*由来のLPSで刺激し、ICAM-1の発現を確認した。piliとICAM-1の結合能の評価に、QCM装置を用いて評価した。その結果、piliとICAM-1が結合していることが示された。従って、piliとICAM-1の結合が感染性心内膜炎に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A. actinomycetemcomitans LPS stimulation induced an increase in expression of ICAM-1 on the surface of RAW 264.7 cells, suggesting that ICAM-1 is related to cell-to-bacteria aggregation. Therefore, we examined whether pili adhere to cells via ICAM-1 on the surface of macrophages using a QCM technique. The frequency was decreased by approximately 2000 Hz in *S. sanguinis* SK36 pili-deficient-mutant, while that was decreased by approximately 14000 Hz in *S. sanguinis* SK36. These results suggest that pili on the surface of *S. sanguinis* bind to ICAM-1 on the surface of the cell clumps. Our findings also indicate that LPS enhances not only cell-to-cell, but also bacteria-cell aggregation via ICAM-1 on the surface of macrophages. Furthermore, there is a possibility that cell-to-bacteria interaction enhances cell-to-cell aggregation, suggesting that pili and ICAM-1 are involved in infective endocarditis caused by *S. sanguinis* via interaction of these molecules.

研究分野：歯周病学

キーワード：Streptococcus sanguinis LPS ICAM-1

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 感染性心内膜炎と *Streptococcus sanguinis*

*Streptococcus sanguinis* は通性嫌気性グラム陽性細菌で、健康なヒトの口腔内歯肉縁上プラーク中において最も多く存在する細菌である(Paik S *et al.*, *Infect Immun* 2005; 73(9): 6064-6074)。特徴の1つとして、血小板を活性化し凝集させる能力をもつ(Douglas CW *et al.*, *J Med Microbiol* 1993; 39(3): 179-182)。近年、抜歯窩等から *S. sanguinis* が血液中に侵入・循環し、心臓弁の異常部位や損傷した心臓組織に付着することによって、感染性心内膜炎を惹起することが報告されている(Li X *et al.*, *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4): 547-558)。また、*S. sanguinis* は細胞表面に長い糸状構造をもつ線毛(pili)を有しており、その線毛が唾液で覆われた歯面上に形成されるペリクルへ結合する(Okahashi N *et al.*, *Microb Pathog* 2011; 50(3-4): 148-154)ことやフィブリン線維に pili を介して結合することが明らかになっており、細胞への結合能を有することが推測される (Okahashi N *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(2): 1192-1196)。

### (2) マクロファージの接着・凝集塊形成に対する歯周病細菌 LPS の影響

歯周病原細菌感染が、全身疾患に関連する報告がなされている。そのなかで、我々は歯周病と動脈硬化症との関係について着目した。まず、血管内の状態を再現するため微小流路チップを開発し、微小流路を用いた実験系を構築した。この微小流路チップには5つの流路が存在し、1流路中にマイクロピラーを20個、計100個を配置している。室温で微小流路へマウスマクロファージを流通させたところ、マイクロピラー上にマクロファージ細胞凝集塊が形成された。歯周病原細菌

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 由来のリポ多糖(Lipopolysaccharide; LPS)にてマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を刺激後、細胞を流通させた。細胞凝集塊形成量は増加し、細胞表面上に Intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) の発現が認められた(Tsutsumi T *et al.*, *J Periodont Res* 2010; 45(4): 550-556)。以上から、歯周病原細菌由来の LPS により、血管内でマクロファージ細胞凝集塊が形成される可能性が示唆される。

動脈硬化症の進行は、oxidized low-density lipoprotein(酸化 LDL)をマクロファージが取り込み、細胞内に脂質が多量に貯留する泡沫細胞が形成されることで誘発される(Kruth HS, *Curr Mol Med* 2001; 1: 633-653)。これまでに我々は、LDL(ネイティブ LDL)と歯周病原細菌由来 LPS がマクロファージ内への取り込みと泡沫化に与える影響を検討した。その結果、ネイティブ LDL 刺激により泡沫細胞が形成され、LPS により泡沫細胞形成が増強されることが明らかになった。さらに、LDL 受容体の発現を解析したところ、LPS で刺激した細胞では時間依存的に有意に発現が増加することを明らかにした。ネイティブ LDL 刺激においても泡沫細胞の形成が誘導され、歯周病原細菌由来の LPS によってさらに増加することから、歯周病が動脈硬化症の促進に何らかの関連性を持つことが示唆される(Morishita M *et al.*, *J Dent Res* 2013)。

以上の学術的背景から、歯周病患者では、歯周病原細菌由来の LPS が誘導するマクロファージ細胞凝集塊が血管壁に結合するだけでなく、心臓内膜・弁膜まで循環する可能性が示唆された。特に、感染性心内膜炎患者において、細菌感染細胞凝集塊は、その病状を憎悪する危険性をはらんでいる。また、最近、*S. sanguinis* 感染マクロファージが泡

沫化することが報告されているが (Okahashi N *et al.*, *FEMS Microbiol Lett* 2011; 323(2): 164-170)、マクロファージと *S. sanguinis* の結合能について詳細な研究はほとんどない。さらに、その結合メカニズムや歯周病原細菌 LPS の影響についても不明である。

そこで、我々は微小流路を用いた実験系において、歯周病原細菌由来 LPS と細胞凝集塊の形成の関連について検証すること。さらに *S. sanguinis* の線毛と細胞凝集塊の結合についても検討すること、また、*S. sanguinis* の線毛と結合能を持つ可能性のある細胞接着分子を網羅的に解析することが必要であると考へた。

## 2. 研究の目的

感染性心内膜炎は心臓内膜や弁膜の内皮面に血栓が形成され、そこで細菌が増殖することによって炎症が生じる。

本研究では我々の開発した微小流路チップを用いて感染性心内膜炎の起炎菌の一つである *S. sanguinis*(口腔内細菌)とマクロファージの結合能、並びにその結合メカニズムについて解析する。

さらに、歯周病原細菌感染も踏まえて、細菌由来 LPS(リポ多糖)を用いて、*S. sanguinis* とマクロファージの結合能への影響を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 微小流路チップ中で形成される細胞凝集塊に対する細菌の付着の検討

歯周病原細菌 *A. actinomycetemcomitans* 由来 LPS で刺激したマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を微小流路チップ中に流通させて、細胞凝集塊を形成させる。また、細胞凝集塊と *S. sanguinis* との結合について、pili をもつ *S. sanguinis* SK36 株と pili を欠損する *S. sanguinis* SK36

pili-deficient-mutant ( $\Delta$ pili)株の2つの菌株をさらに流通させて、細胞凝集塊と *S. sanguinis* との結合を検討する。

感染性心内膜炎に歯周病が与える影響について検討するため、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を歯周病原細菌 *A. actinomycetemcomitans* 由来の LPS で刺激し、我々の開発した微小流路チップへ流通させ、マイクロピラー上に細胞凝集塊を形成させる。また、LPS で刺激しない RAW264.7 を用いてマイクロピラー上に細胞凝集塊を形成させ、比較・検討する。

細胞凝集塊と *S. sanguinis* との結合について pili が関与するかを検討するため、pili をもつ *S. sanguinis* SK36 株と pili を欠損した *S. sanguinis* SK36  $\Delta$ pili 株の両者を用いて細胞凝集塊への結合を評価する。なお、*S. sanguinis* SK36 及び SK36  $\Delta$ pili に Green Fluorescence Protein(緑色蛍光タンパク質)を導入して用いる。

### (2) 細胞接着分子の発現の検討・解析

*S. sanguinis* が持つ pili の接着メカニズムを明らかにするため、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いて、細胞表面に発現する細胞接着分子について検討する。また、pili を有する *S. sanguinis* SK36 株及び pili を欠損する *S. sanguinis* SK36  $\Delta$ pili 株の両者を用いて、発現が確認された細胞接着分子との結合能を評価・検討する。

マウスマクロファージ細胞株においては、歯周病原細菌 *A. actinomycetemcomitans* 由来 LPS は、ICAM-1 発現の増加を誘導した (Tsutsumi T *et al.*, *J Periodont Res* 2010; 45(4): 550-556)ことから、LPS がマクロファージを活性化し、細胞接着分子の発現を増加させることは明らかである。そこで本研究においても、マウスマクロファージ様細胞株

RAW264.7 を歯周病原細菌 *A. actinomycetemcomitans* 由来の LPS で刺激し、細胞表面上に発現する細胞接着分子を評価・検討する。

### (3) 発現が確認された細胞接着分子と pili との結合の検討・解析

*S. sanguinis* の pili と細胞接着分子との結合能の評価に、Quartz Crystal Microbalance(QCM)装置を用いる。水晶発振子のセンサーチップ(400 mm × 120 mm)のガラス面に対象となるタンパク質を塗布・乾燥により固定化する。25 Phosphate Buffered Saline (PBS) 10 ml に浸漬し、結合を確認したい細菌を添加する。固定化されたタンパク質と添加した細菌との結合による水晶発振子の振動の微小変化を周波数の変化としてパソコン上のソフトウェアで捉えるものである。この QCM 測定システムを用いて、先に発現を確認した細胞接着分子と pili を有する *S. sanguinis* SK36 及び pili を欠損した *S. sanguinis* SK36 Δpili の 2 種類の細菌を用いて結合能を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 微小流路チップ中で形成される細胞凝集塊に対する細菌の付着

歯周病原細菌 *A. actinomycetemcomitans* 由来の LPS で刺激したマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 は、我々の開発した微小流路チップのマイクロピラー上に細胞凝集塊を形成した(図 1A)。また、緑色蛍光タンパク質を導入した pili を有する *S. sanguinis* SK36 が細胞凝集塊へ付着することを蛍光顕微鏡で確認した(図 1B)。

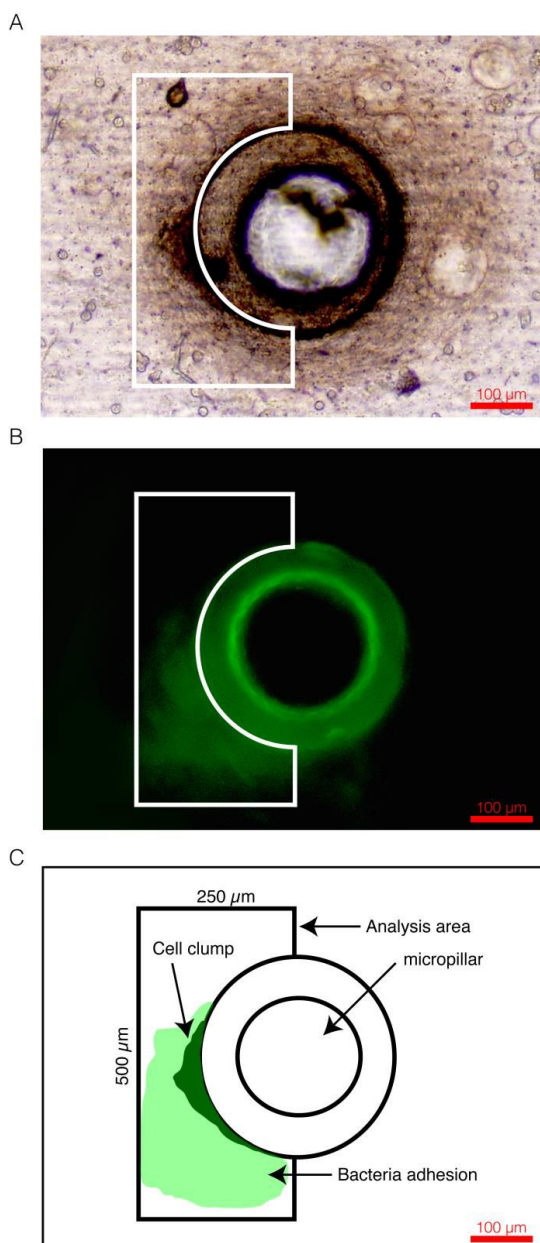


図 1

- (A) 微小流路チップ上の細胞凝集塊への細菌の付着の様子(代表例)
- (B) 蛍光顕微鏡で(A)を観察した様子(代表例)
- (C) マイクロピラー上に細胞凝集塊が付着した側を分析範囲(250 μm × 500μm)と設定した

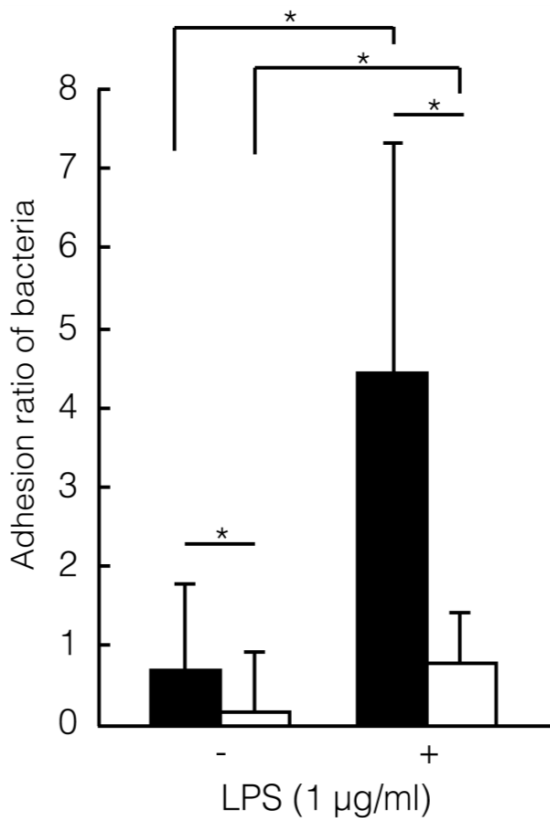


図2 細胞凝集塊へ *S. sanguinis* SK36 及び SK36 Δpili の付着の比較

黒: *S. sanguinis* SK36

白: *S. sanguinis* SK36 Δpili

Tukey-Kramer HSD 検定(\* $p < 0.05$ )

*S. sanguinis* SK36 及び SK36 Δpili の両者を用いて、細胞凝集塊との結合を評価したところ、細胞凝集塊へ *S. sanguinis* SK36 が SK36 Δpili と比べ、約 5.6 倍ほど有意に付着したことを確認した(図 2)。

## (2) 細胞接着分子の発現について

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を歯周病原細菌 *A. actinomycetemcomitans* 由来の LPS で刺激したところ、細胞表面上に ICAM-1 が発現することを確認した。

## (3) 発現が確認された細胞接着分子と pili との結合について

(2)で確認した細胞接着分子である ICAM-1 と pili の結合能の評価に、Quartz

Crystal Microbalance(QCM)装置を用いて評価した。その結果、*S. sanguinis* SK36 と SK36 Δpili を比較したところ、SK36 Δpili よりも SK36 の方が周波数の減少が大きく、SK36 が持つ pili と ICAM-1 が結合していることが示された(図 3)。

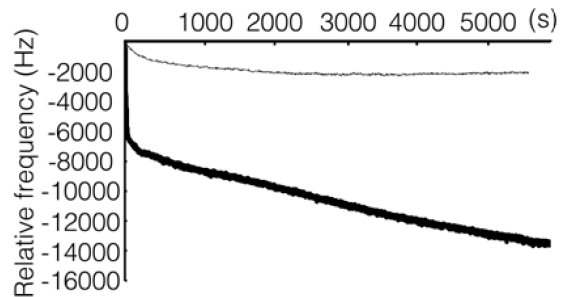


図3 *S. sanguinis* と ICAM-1 との結合

細線: *S. sanguinis* SK36 Δpili

太線: *S. sanguinis* SK36

上記の結果から下記の4項目が明らかになった。

- ・ *A. actinomycetemcomitans* LPS により、RAW264.7 はマイクロピラー上で細胞凝集塊を形成する。
- ・ 細胞凝集塊に pili を持つ *S. sanguinis* SK36 が付着する。
- ・ *A. actinomycetemcomitans* LPS により、RAW264.7 は細胞表面上に ICAM-1 を発現する。
- ・ ICAM-1 と pili を持つ *S. sanguinis* SK36 は結合する。

以上から、LPS により、マクロファージとマクロファージの結合のみならず、マクロファージと口腔内細菌との結合が、マクロファージ表面上に発現する ICAM-1 を介して起こることが明らかになった。また、pili と ICAM-1 との結合が感染性心内膜炎に与す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 1 件 )

Masaki Morishita, Ryosuke Saeki,  
Toshinori Okinaga, Wataru Ariyoshi,  
Nobuo Okahashi, Michihiko Usui, Keisuke  
Nakashima and Tatsuji Nishihara, New  
system for detection of oral bacterial  
adhesion to macrophages *in vitro*, WebPub  
Journal of Scientific Research, 査読有), Vol.  
2(7), 2014, pp 82-86,  
<http://www.researchwebpub.org/wjsr/pdf/2014/February/Masaki%20et%20al.pdf>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

守下 昌輝 (Morishita Masaki )  
九州歯科大学 口腔機能学講座 歯  
周病学分野・助教  
研究者番号 : 60710522