

第3回「口腔環境制御研究」カテゴリー集會

期日：平成23年2月4日（水）

場所：長崎大学医学部良順會館2階ボードインホール

第3回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会

日時：平成23年2月4日（金）13:30-17:35

場所：長崎大学医学部良順会館2階ボードインホール

時間	座長	演者	演題
13:30-13:35			イントロダクション
13:35-13:55	西村英紀教授 (広島大)	大谷誠 (北海道大)	TLR 2 と DC-SIGN シグナルのクロストーク における SOCS-1 の役割
13:55-14:15	西村英紀教授 (広島大)	中條和子 (東北大)	フッ化物局所応用によるプラーク齲蝕原 性制御効果を再考する-プラーク細菌の酸 産生抑制機構と二価金属イオンの影響-
14:15-14:35	西村英紀教授 (広島大)	青山典生 (東京医歯大)	歯周病原細菌感染による循環器疾患への 影響
14:35-14:55	柴田健一郎教授 (北海道大)	青木由香莉 (新潟大学)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> 感染マウスモ デルにおいてNKT細胞は歯槽骨吸収を促進 する
14:55-15:15	柴田健一郎教授 (北海道大)	山口 雅也 (大阪大)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> の自然免疫回避 におけるPfbAの役割
15:15-15:35	柴田健一郎教授 (北海道大)	藤田佑貴 (岡山大)	歯周病原細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> による宿主細胞応答の分子基盤
15:35-15:50		休憩	
15:50-16:10	和泉雄一教授 (東京医歯大)	石丸直澄 (徳島大)	シェーグレン症候群における制御性T細胞 の役割
16:10-16:30	和泉雄一教授 (東京医歯大)	岩下未咲 (広島大)	マクロファージ浸潤脂肪組織における LPS 誘導性インスリン抵抗性に対する ARB の改 善効果作用機序の検討
16:30-16:50	川端重忠教授 (大阪大)	原口晃 (九州大)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> による <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> のバイオフィルム剥離に関する研究
16:50-17:10	川端重忠教授 (大阪大)	成田由香 (長崎大)	<i>Tannerella forsythia</i> の PorSS 関連遺伝子 欠損株の性状解析
17:10-17:30	川端重忠教授 (大阪大)	松田悠祐 (鹿児島大)	<i>S. mutans</i> バイオフィルムにおける抗菌性 ペプチド感受性評価
17:30-17:35			まとめ

TLR 2 と DC-SIGN シグナルのクロストークにおける SOCS-1 の役割

大谷 誠, 柴田 健一郎

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座

口腔顎顔面外科学教室・口腔分子微生物学教室

【目的】樹状細胞 (DC) に発現する C-type レクチンである Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule 3 (ICAM 3)-Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN) は微生物の認識や貪食, また, 抗原提示の際の T 細胞と抗原提示細胞の接着等において重要な役割を果たしている。本研究では, Toll-like receptor 2 (TLR2) を介した微生物認識を及ぼす DC-SIGN の役割を検討した。

【材料および方法】HEK293 細胞に TLR2 および DC-SIGN を遺伝子導入し、免疫沈降法で TLR2 と DC-SIGN の会合を調べた。TLR2 リガンドとして FSL-1 を, DC-SIGN ならびに DC-SIGN のマウスホモログである SIGNR1 のリガンドとして Man9(GlcNAc)2 (Man9) および mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM) を用いた。マウスの DC として A/J mouse 由来の XS106 細胞を, また, ヒト由来 DC として IL-4 と GM-CSF で分化誘導した monocyte-derived DC (MDDC) を用いた。TLR2, DC-SIGN ならびに SIGNR1 の発現はリアルタイム PCR ならびにフローサイトメトリー法で調べた。サイトカイン (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10) の産生はリアルタイム PCR 法および ELISA 法で評価した。

【結果ならびに考察】XS106 細胞には TLR2 および SIGNR1 が発現しており、FSL-1 の刺激で炎症性サイトカインの産生が増強されたが、その増強活性は Man9 および ManLAM によって有意に抑制された。また、HEK293 細胞に TLR2 と DC-SIGN を遺伝子導入したところ、DC-SIGN のオリゴマーと TLR2 は複合体を形成し、また、XS106 細胞ならびにヒト MDDC でも SIGNR1 ならびに DC-SIGN は TLR2 と会合していた。そこで、我々はこの抑制活性の分子機構を明らかにしようと考え、まず、TLR4 シグナルを負に制御する因子 SOCS-1 (Suppressor of cytokine signaling 1) に注目した。その結果、この抑制活性は SOCS-1 の knockdown で解除され、また、SOCS-1 と SIGNR1 が会合していることがわかった。SOCS-1 は TLR4 下流のアダプター分子である Mal をユビキチン化し、プロテアソームで分解することが明らかにされている。そこで、SIGNR1 による TLR2 シグナルの抑制にも同様なことが起こっているのではないかと推測した。そして、FSL-1 と ManLAM の共刺激で TLR2 下流シグナル Mal の分解を確認した。

すなわち、TLR2 シグナルの DC-SIGN シグナルによる抑制活性では、SOCS-1 による TLR2 下流のアダプター分子である Mal の分解が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

フッ化物局所応用によるプラーク齲蝕原性制御効果を再考する

-プラーク細菌の酸産生抑制機構と二価金属イオンの影響-

中條和子 高橋信博

東北大学 大学院歯学研究科 口腔生物学講座 口腔生化学分野

プラークの主な齲蝕原性は「プラーク細菌が糖代謝の結果として産生した有機酸によって歯質を脱灰すること」と考えられている。一方、フッ化物は歯質の再石灰化を促進するとともに、プラーク細菌の糖代謝を抑制する物質であることが報告されている。しかし、現在のフッ化物局所応用の目的は、歯質の再石灰化促進に代表される宿主側への効果が強調されており、プラーク細菌への効果はあまり知られていない上、不明な点も多い。近年、フッ化物洗口において、唾液等による洗い流しの後もプラーク中にフッ素が残存すること、さらに二価金属イオンが共存するとフッ化物残存が促進することが報告されており、フッ化物洗口のプラーク細菌への効果が示唆されている。

このような背景の中、我々は、プラーク細菌の増殖や酸産生に係わる代謝系をコントロールする、より効果的なフッ化物局所応用法の開発とその生化学的抑制機序の解明を目的に、*in vitro* と *in vivo* の両方向から研究を進めてきた。

本口演では、(1) 実際のフッ化物洗口を模し、代表的プラーク細菌にフッ化物を短時間曝露した場合のプラーク細菌の糖代謝活性 (*in vitro* 系) (2) 実際にフッ化物洗口を行った被験者から経時的に採取したプラークの糖代謝活性 (*in vivo* 系) を、それぞれに対する二価金属イオンの影響とともに示しながら、フッ化物を用いたプラーク細菌の糖代謝コントロールによる齲蝕予防の可能性について再考したい。

歯周病原細菌感染による循環器疾患への影響

青山典生 小林奈穂 花谷智哉 芦垣紀彦 吉田明日香 和泉雄一

東京医科歯科大学

目的：近年、歯周病と循環器疾患の関連が指摘されてきている。歯周病患者では心血管疾患の発症リスクが上昇していることが報告されている。また、歯周病原細菌による菌血症が認められ、血管病変から複数の歯周病原細菌が検出されている。そこで本研究では、各種循環器疾患の進行に関わる歯周病原細菌感染の影響を解析した。

方法：野生型(WT)マウス、Toll 様受容体(TLR)-2 ノックアウト(KO)マウスの背部皮下にチャンバーを埋入し、チャンバー内のスペースを感染巣として用いた。大動脈瘤を作製する群では、腹部大動脈に CaCl_2 を塗布することにより実験的に大動脈瘤を形成した。血管傷害群では、大腿動脈を 0.38mm のコイルスプリングワイヤーで傷害した。また、心筋虚血群では、マウスの冠動脈左前下行枝を結紮することで心筋梗塞を誘導した。感染させる群ではマウスの背部チャンバー内に、 10^8CFU/mL の *P. gingivalis* あるいは *A. actinomycetemcomitans* の懸濁液 0.1ml を注入した。

結果：*P. gingivalis* 感染により WT マウスでは術後の腹部大動脈瘤形成が促進したが、TLR-2KO マウスでは術後の動脈拡張が抑えられた。*P. gingivalis* 感染により WT マウスでは血管傷害後の新生内膜形成の促進が認められたが、TLR-2KO マウスでは新生内膜形成が抑制された。WT マウスでの *A. actinomycetemcomitans* 感染により、心筋虚血後の線維化が亢進していることが観察された。

結論：本研究より、歯周病原細菌感染が腹部大動脈瘤、血管傷害、心筋虚血後の線維化形成など、循環器疾患病変を悪化させる可能性があることが示唆された。

Porphyromonas gingivalis 感染マウスモデルにおいて NKT 細胞は歯槽骨吸収を促進する

青木 由香莉

新潟大学

NKT 細胞は、CD1d 分子に結合した糖脂質リガンドを認識するユニークなリンパ球であり、活性化に際して多くのサイトカインを短時間で大量に産生する。Th1 タイプのサイトカインである IFN- γ と Th2 タイプのサイトカインである IL-4 の両方を産生することから、その免疫調節機能が注目されている。我々はこれまでに、ヒト歯周炎組織において NKT 細胞の浸潤が上昇していることを報告している。しかしながら、歯周炎病因論における NKT 細胞の役割は明らかではない。そこで、今回我々は、*P. gingivalis* を経口感染させたマウスモデルにおける NKT 細胞の役割について検討することとした。

C57BL/6 マウス、および CD1d^{-/-} マウスに 3 日ごとに計 10 回、*P. gingivalis* W83 株を経口感染させ、解析を行った。*P. gingivalis* 感染により、野生型では歯槽骨吸収が有意に認められるのに対し、CD1d^{-/-} マウスでは歯槽骨吸収が起こらないことが示された。血清中の IL-6 レベルを比較すると、ともに感染による上昇が認められた。また、感染による血清中の抗体価上昇の程度は、野生型と CD1d^{-/-} マウスにおいて同程度であった。脾細胞を *P. gingivalis* にて再刺激し、上清中のサイトカインレベルを ELISA にて測定したところ、IL-6, IL-4, IL-10 産生が、CD1d^{-/-} マウス感染群において有意に上昇し、IFN- γ レベルは野生型と同程度であった。以上より、*P. gingivalis* 感染マウスモデルにおいて NKT 細胞はサイトカインバランスを調整し、歯槽骨吸収を促進する作用を持つことが示された。

*Streptococcus pneumoniae*の自然免疫回避におけるPfbAの役割

山口 雅也¹, 寺尾 豊², 西野 邦彦^{3, 4}, 山口 明人^{1, 5}, 浜田 茂幸⁶, 川端 重忠²

(阪大・産研・生態情報¹, 阪大院・歯・口腔細菌², 阪大・産研・感染制御³, 科技振・さきがけ⁴, 阪大・薬・細胞生物⁵, 阪大・微研⁶)

【目的】*Streptococcus pneumoniae* は市中肺炎の主たる原因菌であり，敗血症患者より最も高頻度に分離されるグラム陽性菌である．本研究では，*S. pneumoniae* の付着因子 PfbA が，菌の自然免疫回避において果たす役割を解析した．

【方法】*S. pneumoniae* R6 株（莢膜無し）とその *pfbA* 欠失株をヒト末梢血中でそれぞれ培養後，血液寒天培地に播種して，生育コロニー数を計測することで抗貪食能を算定した．次に，タイムラプス顕微鏡により，好中球が *S. pneumoniae* を貪食する過程を経時的に観察した．さらに，組換え PfbA を蛍光マイクロビーズ表層に固相化し，好中球ならびに単球がビーズを取り込む割合の変化をフローサイトメーターにて計測した．

【結果と考察】抗貪食能試験における *pfbA* 欠失株の生存率は，野生株に比して 43%低下した．さらに，タイムラプス顕微鏡による経時的観察の結果，好中球と接触した *pfbA* 欠失株は，1 分以内に捕獲され，ファゴソームに取り込まれる過程が観察された．一方，野生株では好中球による捕獲像は認められなかった．また，PfbA を固相化したビーズは，好中球ならびに単球に取り込まれにくいことが示された．以上の結果から，*S. pneumoniae* の付着因子 PfbA は，好中球の貪食に対する抵抗性も示す多機能タンパクであることが示唆された．

歯周病原細菌による宿主細胞応答の分子基盤

藤田佑貴

岡山大学

我々は歯周病原細菌感染により惹起される歯周組織の変化を細胞・分子レベルで解析し、歯周疾患の予防や治療へ繋げることを目的として、*Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) 感染による宿主細胞内情報伝達系の解析を行なっている。具体的には *P. g.* 感染の歯肉上皮細胞への影響と、*P. g.* が破骨細胞分化初期に感染した時の分化抑制メカニズムを解析している。

第1に *P. g.* 感染による歯周組織傷害性の分子解析を行なうため、*P. g.* 由来物質による宿主応答性を調べた。*P. g.* のヘモグロビン結合タンパク質(HbR)が、歯肉上皮細胞の MAP キナーゼ (Erk1/2、p38) の活性化を引き起こすことが示された。

第2に破骨細胞分化抑制は免疫系と骨細胞分化系のシグナル伝達経路がクロストークした結果と考え、Toll-like receptor (TLR) アダプター分子 MyD88、TRIF、MyD88/TRIF ノックアウト (KO) マウスのマクロファージを用い、*P. g.* 感染による破骨細胞の分化を調べた。その結果、MyD88 および MyD88/TRIF KO マウス由来細胞で *P. g.* 感染による破骨細胞の形成が認められた。従って *P. g.* 感染による破骨細胞分化抑制は、MyD88 依存性の免疫伝達経路が関与していることが考えられた。

シェーグレン症候群における制御性 T 細胞の役割

石丸直澄

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子病態学分野

ドライアイ、ドライマウスを主徴とするシェーグレン症候群は難治性の自己免疫疾患であり、その病態発症機序に関しては不明な点が多い。自己免疫疾患、アレルギー疾患、感染症など様々な免疫疾患あるいは腫瘍免疫にも制御性 T(Treg)細胞の役割が大きくクローズアップされている。しかし、シェーグレン症候群の発症機序と Treg 細胞との詳細な関連性に関する報告は無い。本研究では、シェーグレン症候群の疾患モデルの一つである C-C chemokine receptor 7 (CCR7)遺伝子欠損(KO)マウスの Treg 細胞の *in vivo* における動態を観察することで、シェーグレン症候群の病態発症機序の一端を解き明かすことを試みた。

CCR7KO マウスのリンパ節では、対照マウスに比較にして Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺Treg 細胞が有意に高い割合で存在していることが明らかとなった。CCR7KO マウスの Treg 細胞は *in vitro* での抑制性機能は有しているものの、*in vivo* では抑制性機能を発揮することができなく、リンパ節に集積してしまうことも判明した。また、CCR7KO マウスの標的臓器における Treg 細胞はほとんど観察されないこと、正常唾液腺には炎症病変が無くてもわずかながら Treg 細胞がパトロールしていることを見出した。ヒトの正常唾液腺組織においても CCR7 陽性の Treg 細胞が存在しているのに対し、シェーグレン症候群患者の唾液腺組織には Treg 細胞の浸潤がほとんど観察されなかった。さらに、Treg 細胞における CCR7 シグナル経路についても紹介したい。

(参考文献) *Immunity* 24:165, 2006 *PloS One* 5:8588, 2010

マクロファージ浸潤脂肪組織における LPS 誘導性インスリン抵抗性に対する ARB の改善効果作用機序の検討

岩下 未咲、西村英紀

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座健康増進歯学分野

2 型糖尿病の主要因であるインスリン抵抗性の発現には、脂肪組織に浸潤したマクロファージが重要な役割を果たす。また、歯周病やある種の腸内細菌叢の変化によって、toll-like receptor-4 を介する炎症が惹起され、インスリン抵抗性がもたらされることが示唆されている。一方、降圧剤であるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) にインスリン抵抗性改善作用があることが報告され注目されているが、その作用機序は未だ明らかではない。日本人軽度肥満者はインスリン抵抗性に加え、高血圧症も併発する可能性が高いため、ARB のインスリン抵抗性改善作用機序の解明は日本人を含むメタボリックシンドロームに対する新たな治療戦略として重要である。そこで今回、ARB が脂肪細胞またはマクロファージのいずれかにおける炎症シグナル伝達を阻害することで炎症を軽減し、結果的に脂肪組織におけるインスリン抵抗性を改善するという作業仮説をたて、ARB のインスリン抵抗性改善作用の分子機序について詳細に検討した。その結果、脂肪細胞とマクロファージの共培養系に lipopolysaccharide (LPS) を作用させた肥満脂肪組織モデルにおいて、ARB は脂肪細胞の LPS 誘導性インスリンシグナル伝達の抑制を改善すること、ARB はマクロファージにおける LPS 誘導性の NF- κ B の活性化および炎症性サイトカイン遺伝子発現を抑制すること、ARB はアンジオテンシン II 受容体 (AT1a) ノックアウトマウス由来マクロファージにおいても LPS 誘導性炎症性サイトカイン遺伝子発現を抑制することを明らかにした。以上から、ARB は肥満脂肪組織において、AT1a 非依存的にマクロファージの活性化を抑制することにより、肥満誘導性インスリン抵抗性を改善させる可能性が示された。

*Porphyromonas gingivalis*による*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*のバイオフィルム剥離に関する研究

原口 晃、三浦真由美、藤瀬 修、高崎 敬、濱地貴文、前田勝正

九州大学大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野

目的 ; *Porphyromonas gingivalis*(*P. g*)と*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a*)については多くの研究が報告されているが、両細菌によるバイオフィルム形成時の相互作用についてはほとんど報告されていない。これまでに我々は両細菌を共培養した場合、*P. g* 優勢の複合バイオフィルムが形成されることを明らかにした。そこで、本研究では*P. g* による*A. a*バイオフィルムの剥離について検討した。

材料・方法 ; あらかじめ試験管壁に形成させた*A. a* ATCC29523株の単独バイオフィルムに対し、*P. g* ATCC33277株およびジンジパイン欠損株であるKDP136株の培養上清を加えて1時間反応させた。その後0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色し、乾燥後エタノール抽出により定量を行った。ATCC33277株の培養上清については加熱やプロテアーゼ阻害剤にて前処理を行ったものも使用し、さらにトリプシンや他の歯周病原細菌の培養上清でも同様の剥離試験を行った。

結果 ; ATCC33277 株の培養上清は *A. a* のバイオフィルムを剥離したが KDP136 株の培養上清は剥離しなかった。前処理した ATCC33277 株の培養上清は *A. a* バイオフィルムを剥離しなかった。トリプシンは濃度依存的に *A. a* を剥離したが、ATCC33277 株培養上清の Rgp 活性と同等の活性を示すように濃度調整したトリプシンは培養上清より低い剥離効果を示した。また、*Fusobacterium nucleatum* は *A. a* バイオフィルムを剥離しないが *Prevotella intermedia* は剥離した。

考察 ; *P. g* 培養上清は*A. a*バイオフィルムを剥離し、それにはジンジパイン及びその他のプロテアーゼが関与している可能性が示唆された。

Tannerella forsythia の PorSS 関連遺伝子欠損株の性状解析

成田 由香

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病原微生物学分野

Tannerella forsythia は *Porphyromonas gingivalis* とともに *Bacteroidetes* phylum に属する歯周病細菌である。*P. gingivalis* の外膜タンパク質の多くは C 末端に保存されたドメイン (CTD) を持ち病原性や抗原性に関与している。我々の研究室では *P. gingivalis* において CTD 含有タンパク質の分泌に関与する新規タンパク質分泌機構を発見し Por 分泌機構と命名した。

T. forsythia においても Por 分泌機構に関連するオルソログ遺伝子群が存在し、CTD 含有タンパク質が 20 個以上存在する。Por 分泌機構に関わる遺伝子群のうち *P. gingivalis* の *porK* 遺伝子に着目し、*T. forsythia* において *porK* オルソログ変異株を作製した。*porK* オルソログ変異株と野生株の全菌体タンパク質パターンを比較すると、明瞭に 2 つの高分子タンパク質の分子量に違いが見られた。これらは LC-MS/MS 解析と抗 TfsA 抗体および抗 TfsB 抗体を用いたイムノプロット解析により CTD 含有外膜タンパク質の TfsA および TfsB と同定された。また、二次元ゲル電気泳動で展開したタンパク質スポットの MS 解析を行うと、膜画分では野生株と比較し *porK* 変異株において分子量ならびに pI が異なる複数の CTD 含有タンパク質が検出され、さらに培養上清では *porK* 変異株にて消失するスポットが認められ、これらも CTD 含有タンパク質であった。これらのことから、*T. forsythia* においても *P. gingivalis* と共通の Por 分泌機構が機能していることが示唆される。

Streptococcus mutans バイオフィルムにおける抗菌性ペプチド感受性評価

松田悠佑^{1,2}、松尾美樹¹、宮脇正一²、小松澤均¹

1. 鹿児島大学医歯学総合研究科 口腔微生物学分野
2. 鹿児島大学医歯学総合研究科 歯科矯正学分野

口腔内は飲食・嚥下などの物理的要因や唾液中の免疫性の因子などの様々な要因があり、口腔内細菌はこれらに適応して生存している。細菌はこのような環境に適応するために、菌体表層に二成分制御系（TCS）とよばれる情報伝達系をもつ。

う蝕原因菌の一つである *S. mutans* UA159 は 15 組の TCS を持つ。*S. mutans* の口腔内環境適応機序の解明を目的として、我々は TCS の欠損株を作成し、網羅的に機能解析を行った。その結果、唾液中に含まれる抗菌性物質の一つ、抗菌性ペプチドの感受性の上昇が 2 組の TCS 欠損株において認められた。これらについて、抗菌性ペプチドに耐性を示す因子の一つである Dlt とよばれる膜タンパクの関与を調べたところ、一組の TCS（TCS7）が Dlt の遺伝子発現に関与していることが明らかになった。さらに、バイオフィルム中では TCS7 の発現が上昇することによって、Dlt の発現が促されることが明らかになった。バイオフィルム中の抗菌性ペプチド感受性について共焦点顕微鏡を用いて検討を行ったところ、TCS7 欠損株と親株の間に顕著な差が見られた。我々はこれを数値化するために、画像解析手法を考案し、詳細な検討を行った。その結果、欠損株は野生株に比べ深層まで抗菌性ペプチドによる殺菌が及んでいることなどが示唆された。これらの検証を他の株（臨床分離株・標準株）でも行ったので、今回はこれらについても報告する。

TCS7 は連鎖球菌（streptococci）に広く保存された遺伝子であり、同様の耐性機序が他の口腔内細菌においても認められる可能性がある。本研究は、う蝕原因菌の口腔内における生存機構や口腔内細菌叢の形成の解明に重要な役割を果たすと考えられる。