

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

口腔感染を誘因とする 難治性全身疾患発症機序の解明と 疫学調査拠点形成

平成24年度 第1回 研究成果報告会



開催日:平成 24 年 6 月 23 日(土)

会場:日本大学歯学部 4号館3階 第3講堂

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「口腔感染を誘因とする難治性全身疾患発症機序の解明と疫学調査拠点形成」

研究組織代表: 落合邦康(日本大学歯学部 細菌学)

【研究目的】

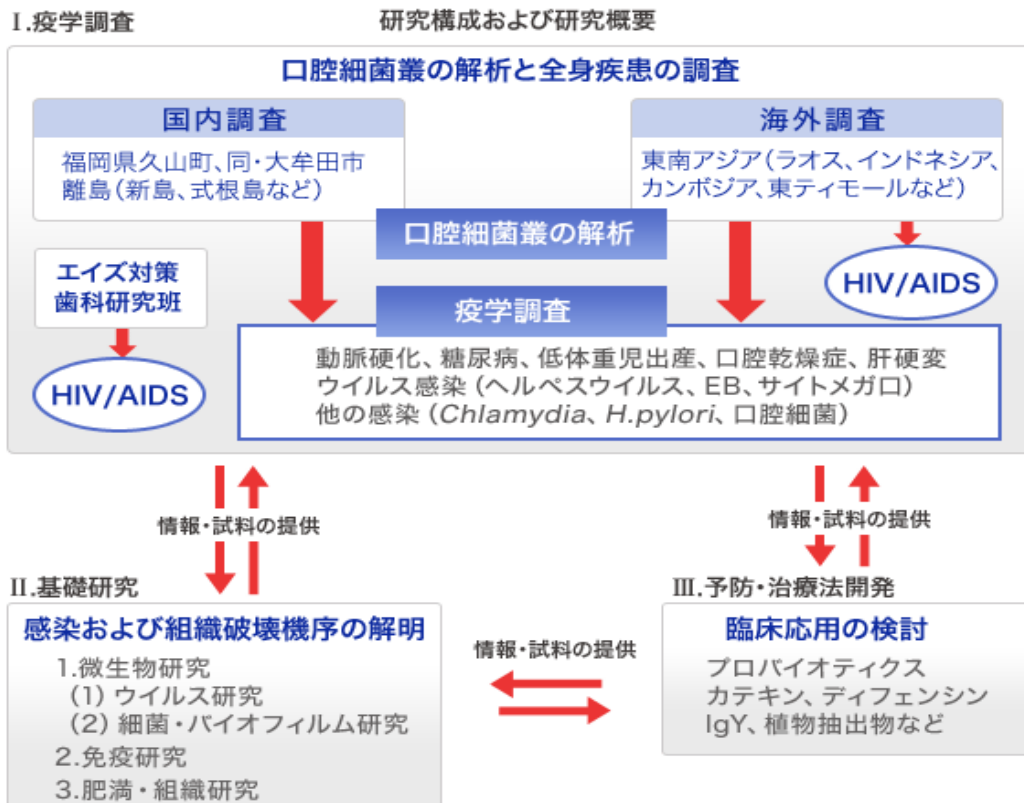
近年、高齢者の急増により歯周病の罹患者が増加し、歯の喪失のみならず、直接の死因となる呼吸器疾患、糖尿病や動脈硬化など全身疾患の誘因となることが明確となった。最近、歯周病患者はガンの発症率が高いとの疫学調査が報告された。しかし、歯周病の詳細な発症機序のみならず、全身疾患の誘発機序はほとんど解明されていない。私たちは、新たな視点から、歯周病原因菌により潜伏感染 HIV や EB ウイルスが再活性化する事を見出し、歯周病がウイルス感染症の発症と進行にも広く関わっている可能性を示した。

本プロジェクトは、疫学調査研究班、歯周病と難治性全身疾患発症機序を解析する基礎研究班及び臨床応用を目的とする予防・治療法開発班の 3 つの研究班から構成される。慢性炎症性疾患・歯周病の発症機序とそれを誘因とする難治性全身疾患の発症機序を分子生物及び免疫学的手法を用いて解明するとともに、本邦及び東南アジアにおいて疫学調査を実施する。これらの結果を基に、歯周病及び全身疾患の予防と治療法開発を目指し、真の translational research 確立と医科学技術による国際貢献を目的とする。

【研究概要】

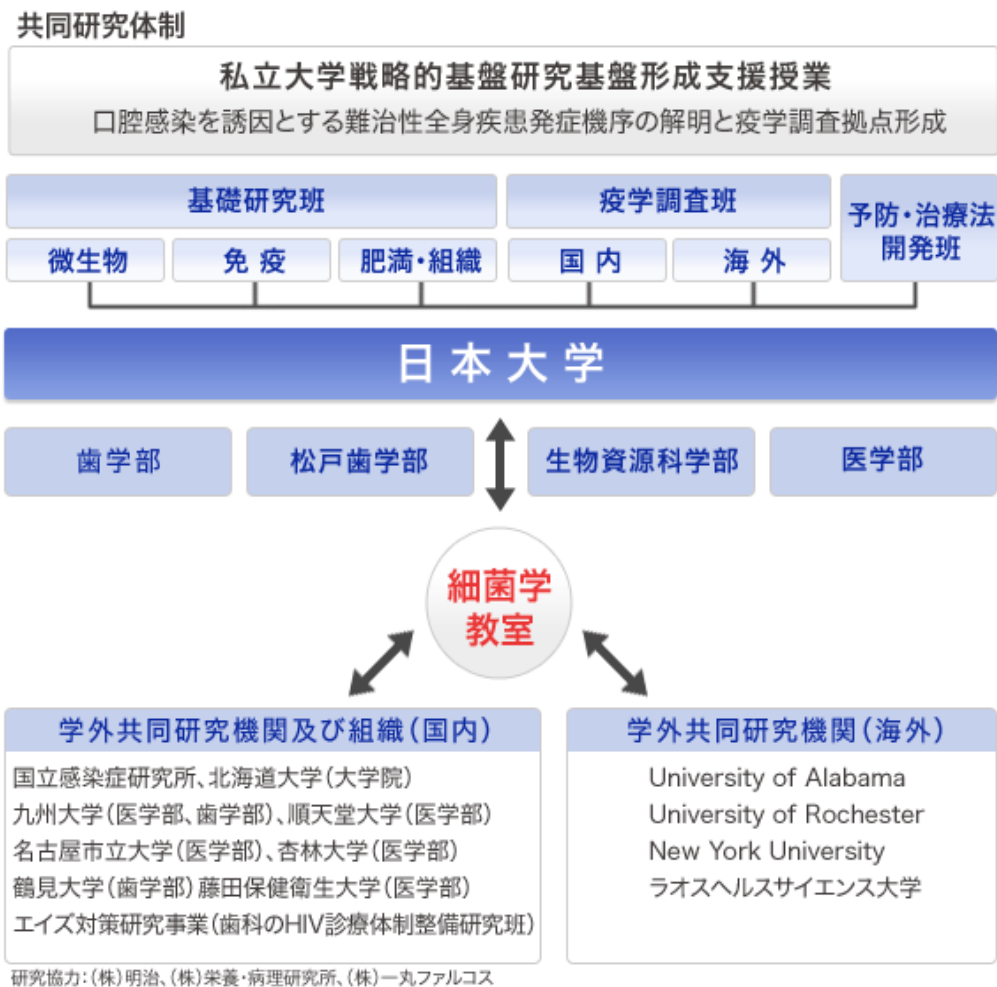
- ① 歯周病を誘因とする感染症及び難治性全身疾患の発症機序の解明
- ② 歯周病を誘因とする感染症及び全身疾患の疫学調査研究
- ③ 免疫学および分子生物学的手法を用いた予防および治療法の研究

大きく、ウイルス研究グループ、バイオフィーム研究グループ、免疫研究グループ、肥満・組織研究グループの4つのグループに分かれ研究を進めている。



【研究組織】

総合大学としての日本大学の特色を生かし、歯学部を中心に、医学部、松戸歯学部及び生物資源科学部の4学部からなる共同研究体制を構築するとともに、他大学の歯学部、医学部、および獣医学部とも連携し研究を進めている。細菌学、ウイルス学、免疫学また、感染症内科学などの専門家が関与し、文字通り医歯両分野、更に獣医学が連携して実験を行っている。また、本邦での疫学調査は、厚生労働省科学研究費補助金エイズ対策研究事業、歯科研究 HIV 診療体制整備研究班の協力を得て実施している。更に、国際的視野をより推進するため、本領域の代表的研究機関として米国 Alabama 大学や New York 大学やラオスヘルスサイエンス大学と共同研究も進めている。



私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
口腔感染を誘因とする難治性全身疾患発症機序の解明と疫学調査拠点形成
平成24年度 第1回 研究成果報告会

開催日:平成 24 年 6 月 23 日(土)
会場:日本大学歯学部 4号館3階 第3講堂

- 13:00 はじめに 研究組織代表 落合邦康
- 13:10 酪酸は骨芽細胞のシクロオキシゲナーゼとプロスタグランジン E₂ 産生を増加させる
川戸貴行^{1,4)}、飯田隆文¹⁾、両角 旦¹⁾、田邊奈津子^{1,4)}、鈴木直人^{2,4)}、
落合邦康^{3,5)}、前野正夫^{1,4)}
日本大学歯学部 衛生学¹⁾・生化学²⁾・細菌学³⁾、
日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態部門⁴⁾・生体防御部門⁵⁾
- 13:30 L-17 による骨・軟骨破壊の分子機構について
前野正夫^{1,3)}、北見 聡¹⁾、田中秀樹¹⁾、川戸貴行^{1,3)}、
田邊奈津子^{1,3)}、落合邦康^{2,4)}
日本大学歯学部 衛生学¹⁾・細菌学²⁾
日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態部門³⁾・生体防御部門⁴⁾
- 13:50 破骨細胞の分化誘導抑制に関与する因子
—マクロファージ遊走阻止因子(MIF)と抗酸化物質—
白川哲夫
日本大学歯学部 小児歯科学講座、日本大学総合歯学研究所 顎口腔機能研究部門
- 14:10 抗菌ジェル of 口腔微生物に対する抗菌効果
田村宗明、落合邦康
日本大学歯学部 細菌学教室、総合歯学研究所 生体防御部門
- 14:30 感覚ニューロンの配線特性とその分子制御機構
(味覚神経回路と摂食行動をモデルとして)
近藤真啓
日本大学歯学部 生理学、日本大学総合歯学研究所 機能形態部門
- 14:50 腸管上皮細胞におけるロタウイルス感染と type III インターフェロン
浅野正岳
日本大学歯学部 病理学、日本大学総合歯学研究所 生体防御部門
- 15:10 休憩

15:20 腸内共生菌による腸管免疫系のIgA 産生誘導機構の解析

細野 朗

日本大学生物資源科学部 食品生命学科 食品生命機能学研究室

15:40 エピジェネティック制御による HIV 潜伏感染維持と破綻機構の解明

今井健一、落合邦康

日本大学歯学部 細菌学教室、総合歯学研究所 生体防御部門

16:00 メカニカルストレスが骨芽細胞のIL-11 産生を介して骨リモデリングに関連するタンパク成分の発現に及ぼす影響

川戸貴行^{1,4)}、塩野目智恵子²⁾、清水典佳^{2,5)}、田邊奈津子^{1,4)}、
鈴木直人^{3,4)}、前野正夫^{1,4)}

日本大学歯学部 衛生学¹⁾・歯科矯正学²⁾・生化学³⁾、

日本大学総合歯学研究所 機能形態部門⁴⁾・生体防御部門⁵⁾

16:20 *Helicobacter pylori*の口腔内での生態に関する検討
—細菌学的エコロジー解析—

神谷 茂、米澤 英雄、大崎 敬子
杏林大学医学部 感染症学

16:40 歯周病細菌による妊娠異常の誘発機構
胎盤絨毛細胞と血管内非細胞の傷害機序について

早川 智¹⁾、相澤(小峯)志保子¹⁾、松岡 俊²⁾、泉 泰之¹⁾、地家豊治³⁾、
廣畑直子¹⁾、村井一郎³⁾

日本大学医学部 病態病理学系微生物学分野¹⁾

日本大学 学生 n-CME Nihon Universitas Collegium Medicum Experimentum²⁾

日本大学医学部 研究支援部門³⁾

17:00 口腔レンサ球菌による自己免疫疾患発症機構

菊池 賢

順天堂大学医学部 感染制御科学・細菌学・総合診療科学

17:20 閉会の辞

懇親会 歯学部 3号館地下1階 『いこい』にて

—誌面発表—

歯周組織における外来刺激応答性の検討

清水典佳

日本大学歯学部 歯科矯正学 日本大学総合歯学研究所臨床研究部門

抗ジンジパイン鶏卵抗体含有タブレットの歯周治療への応用

菅野直之^{1,2)}, 伊藤公一^{1,2)}

日本大学歯学部 歯周病学講座¹⁾,

日本大学歯学部 総合歯学研究所高度先端医療研究部門²⁾

骨シアロタンパク質の転写に対する歯周病原菌由来リポポリサッカライドの効果

小方頼昌、周黎明、李新月

日本大学松戸歯学部 歯周治療学講座 口腔科学研究所

HIV感染症における微生物間相互作用 —酪酸産生常在菌による潜伏感染HIVの再活性化—

名古屋市立大学大学院医学研究科 細胞分子生物 岡本 尚

歯周病原性細菌による動脈硬化誘発機序の解明

落合智子

日本大学松戸歯学部 口腔免疫学

顆粒球の活性化に関する比較免疫学的研究

伊藤琢也

日本大学生物資源科学部 動物医科学研究センター

歯周組織および唾液腺における炎症発症と修復機序

杉谷博士

日本大学生物資源科学部 獣医生化学研究室

パネト細胞が分泌する α ディフェンシンによる自然免疫と腸内環境

綾部時芳、中村公則

北海道大学大学院先端生命科学研究院 細胞生物科学分野

歯周病の EBV 感染促進と唾液腺障害

斎藤一郎

鶴見大学歯学部 病理学講座

菌代謝産物存在下における口腔常在細菌の生残とバイオフィルム形成

泉福英信

国立感染症研究所 細菌第一部

高齢者の口腔細菌叢と全身の健康に関する研究

山下喜久

九州大学大学院歯学研究院 口腔保健推進学講座口腔予防医学分野

酪酸は骨芽細胞のシクロオキシゲナーゼとプロスタグランジン E₂ 産生を増加させる

川戸貴行^{1,4)}、飯田隆文¹⁾、両角 旦¹⁾、田邊奈津子^{1,4)}、鈴木直人^{2,4)}、
落合邦康^{3,5)}、前野正夫^{1,4)}

日本大学歯学部 衛生学¹⁾・生化学²⁾・細菌学³⁾
日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態部門⁴⁾
日本大学歯学部総合歯学研究所 生体防御部門⁵⁾

【目的】

歯肉縁下 plaque 中に棲息する *Porphyromonus*, *Prevotella* および *Fusobacterium* などのグラム陰性嫌気性菌の代謝産物である酢酸, プロピオン酸および酪酸などの短鎖脂肪酸は, ヒト歯周ポケットの滲出液中に存在し, 組織破壊に深く関与している。特に酪酸は, 歯肉線維芽細胞の増殖阻害, T 細胞のアポトーシス促進および骨芽細胞の成熟促進などへの関与が報告されている。

Prostaglandin (PG) E₂ は, 局所の骨代謝調節因子として重要な役割を演じている。PGE₂ は, 骨芽細胞の receptor activator of NF-κB (RANK) ligand (RANKL) 産生増加を介して多核の破骨細胞様細胞の形成を促進する。一方, PGE₂ は骨芽細胞による細胞外基質タンパクの合成と石灰化 nodule 形成を促進する。PGE₂ は, 細胞膜を構成するリン脂質由来のアラキドン酸に cyclooxygenase (COX) が作用して産生される。しかし, 酪酸が骨芽細胞の PGE₂ 産生に及ぼす影響については調べられていない。

そこで, 酪酸が歯肉上皮を通過して歯槽骨表面の骨芽細胞に直接作用することを想定して本研究を企図した。骨芽細胞には ROS17/2.8 細胞, 酪酸には酪酸ナトリウムを用いて, 酪酸が細胞増殖, アリカリホスファターゼ (ALPase) 活性, PGE₂ 産生, COX-1, COX-2, PG 受容体 (EP1-4), I 型 collagen および osteopontin 発現に及ぼす影響について調べた。また, COX の作用を阻害する indomethacin が, 酪酸刺激によって誘導される ROS 17/2.8 細胞の PGE₂ 産生, COX-1, COX-2, EP2, I 型 collagen および osteopontin 発現増加に及ぼす影響も併せて検討した。

骨芽細胞の分化は, そのプロセスにおいて, 複数の転写調節因子によってコントロールされている。Runx2 と Osterix は膜性骨化と軟骨内骨化において不可欠であり, Msx2 と Dlx5 も骨芽細胞分化に関与している。一方, AJ18 は骨芽細胞分化の抑制因子として知られている。しかし, これらの転写調節因子発現を介して骨芽細胞の分化に及ぼす酪酸の影響については調べられていない。そこで, ROS17/2.8 細胞の Runx2, Osterix, Msx2, Dlx5 および AJ18 発現に及ぼす酪酸の影響を検討した。また, ROS17/2.8 細胞の石灰化物形成, ALPase 活性, bone sialoprotein (BSP) および osteocalcin (OCN) 発現に及ぼす酪酸の影響も併せて検討した。

【結果および考察】

酪酸は ROS 17/2.8 細胞の PGE₂ 産生と COX-1 および COX-2 発現を誘導した。さらに, 酪

酸によって誘導された PGE₂ 産生と COX-1 および COX-2 発現は、酪酸と indomethacin の同時刺激で抑制された。これらの結果から、酪酸は COX 発現増加を介して、骨芽細胞の PGE₂ 産生を誘導することが示唆された。

ROS 17/2.8 細胞には、4 種の PG 受容体のうち EP1 と EP2 発現が認められた。酪酸添加によって EP2 発現は増加したが、EP1 発現にはその影響が認められなかった。Indomethacin は、酪酸による EP2 発現誘導を抑制しなかった。ROS 17/2.8 細胞の ALPase 活性は高濃度の酪酸添加によって低下したが、I 型 collagen および osteopontin 発現は酪酸添加によって顕著に増加した。また、酪酸添加で増加した I 型 collagen 発現は酪酸と indomethacin との同時添加で約 50% 低下したが、osteopontin 発現には同時添加の影響が認められなかった。これらの結果から、I 型 collagen の発現には酪酸によって誘導された PGE₂ の関与が示唆された。一方、osteopontin 発現は、酪酸の直接刺激あるいは PGE₂ 以外の因子を介して誘導されると考えられた。以上のことから、酪酸は骨芽細胞の COX 発現増加を介して PGE₂ 産生を誘導し、また、酪酸が誘導した PGE₂ は、EP1 あるいは EP2 受容体を介して autocrine に作用して骨芽細胞の I 型 collagen 発現を増加させると考えられた (Iida et al., Arch Oral Biol 56, 678-686, 2011)。

次に、ROS17/2.8 細胞の転写調節因子発現に及ぼす酪酸の影響を調べた。その結果、Runx2, Osterix, Msx2 および Dlx5 発現は、酪酸添加によって低下したが、AJ18 発現は増加した。また、ROS17/2.8 細胞の ALPase 活性、BSP と OCN 発現および石灰化物形成能は、酪酸添加によって低下した。以上のことから、酪酸は Runx2, Osterix, Msx2 および Dlx5 発現低下と AJ18 発現増加を介して骨芽細胞への分化を抑制すること、また、ALPase 活性、BSP と OCN 発現低下を介して骨芽細胞による骨形成を抑制することが示唆された (Morozumi et al., J Oral Sci 53, 509-516, 2011)。

【発表論文】

- 1) Iida T, Kawato T, Tanaka H, Tanabe N, Nakai K, Zhao N, Suzuki N, Ochiai K, Maeno M (2011) Sodium butyrate induces the production of cyclooxygenases and prostaglandin E₂ in ROS 17/2.8 osteoblastic cells. Arch Oral Biol 56 (7), 678-686.
- 2) Morozumi A (2011) High concentration of sodium butyrate suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation. J Oral Sci 53 (4), 509-516

IL-17による骨・軟骨破壊の分子機構について

前野正夫^{1,3)}、北見 聡¹⁾、田中秀樹¹⁾、川戸貴行^{1,3)}、
田邊奈津子^{1,3)}、落合邦康^{2,4)}

日本大学歯学部 衛生学¹⁾・細菌学²⁾

日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態部門³⁾

日本大学歯学部総合歯学研究所 生体防御部門⁴⁾

【目的】

近年、関節リウマチなどの自己免疫疾患における骨破壊と炎症に深く関与しているサイトカインとして IL-17 が注目されている。IL-17 は、IL-23 刺激を受けたヘルパーT細胞 (Th17 細胞) によって産生され、好中球や免疫担当細胞を炎症部位に集めるなど、局所の生体防御機構において重要な役割を担っている。口腔領域では、歯周病の発症や進行に関連した感染性病原微生物の刺激から歯槽骨を保護するために、IL-17 が骨吸収を促進することや Th17 細胞が破骨細胞誘導性サブセットとして骨破壊に直接関与することが報告されている。Th17 細胞は、局所に炎症を惹起して周囲の間葉細胞に receptor activator of NF- κ B (RANK) ligand (RANKL) の発現を強く誘導するだけでなく、自身も RANKL を発現する。これらの報告から推測されることは、IL-17 が間葉細胞や Th17 細胞の RANKL 発現を誘導して破骨細胞の分化と機能発現を促し、骨吸収を促進するのではないかという仮説である。しかし、この仮説を説明するための証拠となる報告は極めて少なく、その分子機構には不明な点が数多く残されている。

そこで、IL-17 が破骨細胞分化、成熟破骨細胞の機能および軟骨細胞による軟骨基質タンパク代謝に及ぼす分子機構を細胞生物学的に明らかにするために、本研究を企図した。

本研究の目的を遂行するために、まず予備実験として、骨破壊に直接関与する破骨細胞に着目し、破骨細胞前駆細胞を IL-17A で直接刺激後、破骨細胞分化と成熟破骨細胞の機能発現とくに骨吸収関連酵素の発現に及ぼす IL-17A の影響を調べた。その結果、IL-17A は、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制し、破骨細胞の骨吸収に関連するプロテアーゼ発現を低下させて、骨基質タンパクの加水分解を抑制することが示唆された。

そこで、平成 22 年度は、RANKL-RANK signaling system による骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との細胞間相互作用に着目し、骨芽細胞を IL-17A で刺激後、IL-17A が骨芽細胞を介して破骨細胞分化と成熟破骨細胞の機能発現とくに骨吸収関連酵素の発現に及ぼす影響を調べた。また、IL-17A が骨芽細胞の炎症性サ

イトカイン産生に及ぼす影響も併せて検討した。平成 23 年度は、軟骨細胞の機能発現に着目し、軟骨細胞による細胞外基質タンパクの合成と分解に及ぼす IL-17F の影響を調べた。

【結果および考察】

予備実験では、破骨細胞前駆細胞 (RAW264.7 細胞) は type A と type C の IL-17 receptor (IL-17R) を発現しており、type A の IL-17R 発現は IL-17A 刺激により増加した。IL-17A は RAW264.7 細胞の TRAP 染色性を低下させ、TRAP 陽性の多核の破骨細胞様細胞数を減少させた。IL-17A 刺激によって matrix metalloproteinase (MMP)-9 とカテプシン K 発現は有意に低下したが、炭酸脱水酵素 II 型発現にはその影響が認められなかった。なお、IL-17A 刺激によるこれらの変化は、IL-17 中和抗体の存在下で完全にブロックされた。IL-17A 刺激によって c-fms 発現は低下したが、RANK 発現にはその影響が認められなかった。以上ことから、IL-17A の破骨細胞前駆細胞への直接作用では、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制し、破骨細胞の骨吸収に関連するプロテアーゼ発現を低下させて、骨基質タンパクの加水分解を抑制することが示唆された (**Biochimie 92, 398-404, 2010**)。

そこで、まず骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との細胞間相互作用に着目して実験を遂行した。IL-17A は破骨細胞前駆細胞 (RAW264.7 細胞) の破骨細胞への分化を骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) を介して間接的に促進し、破骨細胞のカテプシン K と MMP-9 発現を間接的に増加させたが、炭酸脱水酵素 II 型発現には影響を及ぼさなかった。象牙質片上に形成される吸収窩の数には IL-17A 刺激の影響を認めなかったが、吸収窩の形態には違いを認めた。Cyclooxygenase (COX)-2 選択阻害剤のセレコキシブは、RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化、カテプシン K および MMP-9 発現の誘導を抑制した。siRNA で MC3T3-E1 細胞の COX-2 発現を抑制すると、RAW264.7 細胞のカテプシン K および MMP-9 発現誘導が抑制された。これらの結果から、IL-17A は、骨芽細胞の PGE₂ 産生増加を介して、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化と成熟破骨細胞の機能発現を促進することが示唆された。また、セレコキシブは、PGE₂ を介した IL-17A による骨基質タンパクの加水分解を抑制することが示唆された (**Biochimie 93, 296-305, 2011**)。また、IL-17A は prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生を増加させ、その autocrine 機構によって骨吸収に関連する炎症性サイトカイン産生を促進することが明らかになった (**Arch Oral Biol 55, 679-688, 2010**)。

自己免疫疾患や炎症性疾患において IL-17A が骨芽細胞に作用することを想定し、IL-17A が骨芽細胞 (ROS17/2.8 細胞) の細胞外基質タンパク (ECMP) 発現と石灰化 nodule 形成に及ぼす影響を調べた。その結果、IL-17A は ROS17/2.8 細

胞の ECMP 発現を誘導するが、骨の石灰化には影響しないことが明らかになった (**J Hard Tissue Biol** 20, 251-262, 2011)。

次に、軟骨基質タンパク代謝に着目して実験を遂行した。IL-17F は、ヒト軟骨細胞の MMP-1, -3, -13, COX-2 発現と PGE₂ 産生を増加させ、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2, -4, II 型 collagen, aggrecan, link protein, COX-1 発現を減少させたが、MMP-2, -14, TIMP-1, -3 発現には変化を認めなかった。COX-2 選択阻害剤である NS-398 は、IL-17F による TIMP-4, aggrecan, link protein 発現の減少効果をブロックした (**Cytokine** 56, 376-386, 2011)。IL-17F は、軟骨細胞の plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, COX-2 発現と PGE₂ 産生を増加させ、urokinase-type plasminogen activator (uPA) と COX-1 発現を減少させたが、tissue-type plasminogen activator 発現には影響を及ぼさなかった。NS-398 は、IL-17F による uPA の減少効果と PAI-1 発現の増加効果をブロックした (**J Hard Tissue Biol** 20, 193-200, 2011)。以上の結果から、IL-17F は、軟骨細胞による軟骨基質タンパク合成を抑制し、MMP-1, -3, -13 発現増加と TIMP-2, -4 発現低下により軟骨基質タンパク代謝を分解系に傾けること、軟骨細胞の PAI-1 発現増加と uPA 発現減少により plasminogen/plasmin 経路による軟骨基質の分解を抑制することが示唆された。また、軟骨基質タンパク代謝に関わる分子の発現には、PGE₂ の autocrine 機構の関与が示唆された。

【発表論文】

- 1) Kitami S, Tanaka H, Kawato T, Tanabe N, Katono-Tani T, Zhang F, Suzuki N, Yonehara Y, Maeno M (2010) IL-17A suppresses the expression of bone resorption-related proteinases and osteoclast differentiation via IL-17RA or IL-17RC receptors in RAW264.7 cells. *Biochimie* 92 (4), 398-404. 「無」
- 2) Zhang F, Koyama Y, Sanuki R, Mitsui N, Suzuki N, Kimura A, Nakajima A, Shimizu N, Maeno M (2010) IL-17A stimulates the expression of inflammatory cytokines via celecoxib-blocked prostaglandin in MC3T3-E1 cells. *Arch Oral Biol* 55 (9), 679-688.
- 3) Zhang F, Tanaka H, Kawato T, Kitami S, Nakai K, Motohashi M, Suzuki N, Wang C, Ochiai K, Isokawa K, Maeno M (2011) Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E₂ in osteoblasts. *Biochimie* 93 (2), 296-305.
- 4) Tanigawa S, Aida Y, Kawato T, Honda K, Nakayama G, Motohashi M, Suzuki N, Ochiai K, Matsumura H, Maeno M (2011) Interleukin-17F affects cartilage matrix turnover by increasing the expression of collagenases and stromelysin-1 and by decreasing the expression of their inhibitors and extracellular matrix components in chondrocytes. *Cytokine* 56 (2), 376-386.

- 5) Tanigawa M, Kawato T, Aida Y, Suzuki N, Ochiai K, Matsumura H, Maeno M (2011) Interleukin-17F down-regulates plasminogen/plasmin pathway in chondrocytes. *J Hard Tissue Biol* 20 (3), 193- 200.
- 6) Kuwabara A, Tanabe N, Kawato T, Tanaka H, Nakai K, Iinuma T, Oki H, Motohashi M, Maeno M (2011) Interleukin-17A induces extracellular matrix protein expression in osteoblastic ROS- 17/2.8 cells. *J Hard Tissue Biol* 20 (3), 251-262.

破骨細胞の分化誘導抑制に関与する因子 —マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) と抗酸化物質—

白川 哲夫

日本大学歯学部 小児歯科学講座 日本大学総合歯学研究所顎口腔機能研究部門

【目的】

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は、炎症性疾患などにおいて病態の増悪や改善に重要な役割を果たしているサイトカインである。感染などによって顎骨内に炎症が起きると、Tリンパ球やマクロファージが活性化するが、現在のところ、歯周組織の炎症について MIF がどのように関与しているかは明確になっておらず、破骨細胞による歯や骨の吸収に対する MIF の作用も不明である。そこで本研究では、マウス骨髄細胞を用い、多核の破骨細胞へと分化誘導する過程での MIF の影響を明らかにした。また強い抗酸化力を有するアスタキサンチンの破骨細胞誘導への影響についても調べた。

【結果】

骨髄細胞からの破骨細胞 (TRAP 陽性多核巨細胞) の誘導について、骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞と骨髄細胞との共培養下で MIF を作用させて調べたところ、6 日間の培養で MIF (>0.1 $\mu\text{g/ml}$) は破骨細胞の誘導を著明に抑制した。MIF を 2 日単位で培養前期、中期、後期に分けて作用させたところ、中期 (培養 3-4 日目) に作用させた場合に MIF の破骨細胞誘導抑制効果が最も高かった。一方、MIF は単核の TRAP 陽性細胞の数や、MC3T3-E1 細胞での RANKL あるいは osteoprotegerin 産生には影響しなかった。M-CSF および RANKL 存在下での dentin スライス上での骨髄細胞単独培養条件下では、MIF は破骨細胞による吸収窩の形成を抑制することが判明した¹⁾。またアスタキサンチンは破骨細胞誘導に抑制的に作用した。

【考察】

MIF は骨髄細胞から TRAP 陽性細胞への分化には影響しないが、TRAP 陽性細胞どうしが癒合して多核の破骨細胞へと成熟するプロセスを阻害することが明らかになった。また、MIF 存在下で骨髄細胞を培養した場合、破骨細胞による吸収窩の形成についても、抑制的に作用することが分かった。アスタキサンチンによる破骨細胞への作用も同様であったが、メカニズムについてはさらなる検討が必要である。

【発表論文】

- 1) Kikuri T, Yoshimura Y, Tabata F, Hasegawa T, Nishihira J, Shirakawa T (2012) Stage-dependent suppression of the formation of dentin-resorbing multinuclear cells with migration inhibitory factor in vitro. *Exp Ther Med*, 3, 37-43.
- 2) Kuroki Y, Honda K, Kijima N, Wada T, Arai Y, Matsumoto N, Iwata K, Shirakawa T (2011) In vivo morphometric analysis of inflammatory condylar changes in rat temporomandibular joint. *Oral Dis*, 17, 499-507.

抗菌ジェルの口腔微生物に対する抗菌効果

田村宗明, 落合邦康

日本大学歯学部 細菌学教室, 総合歯学研究所 生体防御部門

【目的と意義】

口腔細菌叢は 700 種を超える極めて多くの細菌種によって構成され, 複雑な相互作用でバランスを保ちながら, 外来微生物の定着・増殖を阻止する重要な役割を担っている。しかし, 日常的な口腔ケアの欠如でバランスが崩れた場合, う蝕や歯周病などの口腔内感染症のみならず, 糖尿病, 感染性心内膜炎, 心筋梗塞, 肺炎, 早産や低体重児出産などの全身性疾患の誘因となることが報告されている。近年, 高齢者の増加と共に, 高齢者の口腔感染症予防および口腔衛生の向上は極めて重要な問題となっている。特に要介護高齢者は, 自立高齢者に比べ口腔内微生物数が著しく増加し, 誤嚥性肺炎などを発症する可能性が高い。従って, 短時間で効率よく病原微生物を除去できる口腔ケア法の開発が急務である。今回, 要介護者の口腔ケアを目的に開発された保湿用ジェルに特殊加工カテキンを添加したカテキンジェルを用い, 口腔細菌に対する抗菌活性および作用機序を解明するとともに, 臨床応用の可能性について検討した。

【結果と考察】

共凝集能が高く, 歯垢蓄積に重要な *Actinomyces* および *Fusobacterium* に対してカテキンジェルは顕著な発育阻止効果を示した。う蝕原因菌の *S. mutans*, 歯周病原菌, *Candida* 症原因菌, MRSA を含む *Staphylococcus* に対する抗菌活性も認められた。一方, 対照として用いた市販口腔湿潤ジェルは, 正常な口腔環境維持に重要な一群のレンサ球菌にも発育阻止作用を示したが, カテキンジェルでは認められなかった。*S. mutans* ならびに *A. naeslundii* に対するカテキンジェル抗菌活性には, 過酸化水素産生量と oxidoreductase 活性が関与しているものと考えられた。カテキンジェル処理により *C. albicans* の ATP 産生量が低下し, 菌糸形変換が抑制されたことから *C. albicans* の病原性を抑える可能性が強く示唆された。

これらの結果から, カテキンジェルは病原細菌に対して良好な抗菌活性を有するものの, 口腔環境維持に重要な常在細菌叢に影響が少ないことから, 長期臨床応用が可能であると思われる。カテキンジェルによる口腔ケアは, 簡便であるにもかかわらず高齢者の口腔細菌数コントロール効果, 局所ならびに全身

疾患の予防，さらに QOL の向上に大きく貢献することが期待できる。
現在，臨床治験を実施中である。

【発表論文】

- 1) 田村宗明，山田 潔，菊地邦好，勝田公雄，落合邦康．アルコール系殺菌剤の改良とその抗菌効果について．日大歯学 84, 75-79, 2010 「有」
- 2) 田村宗明，齋藤秀雄，阿部和正，石上友彦，清水典佳，落合邦康．Hydroxyapatite 不織布を用いたラット歯周病実験モデルの開発．日大歯学 85, 125-128, 2011 「有」
- 3) Tamura M, Saito H, Kikuchi K, Ishigami T, Toyama Y, Takami M, Ochiai K. Antimicrobial activity of gel-entrapped catechins toward oral microorganisms. *Biol Pharm Bull* 34, 638-643, 2011 「有」

感覚ニューロンの配線特性とその分子制御機構 (味覚神経回路と摂食行動をモデルとして)

近藤 真啓

日本大学歯学部 生理学, 日本大学総合歯学研究所 機能形態部門

【目的】

ヒト脳はおよそ 10^{12} 個の神経細胞からなり, 10^{15} 個におよぶシナプス結合を介して精密なネットワークを形成している。この神経細胞間にみられるシナプス結合 (神経配線) の特異性は, 正常な精神発達や生得的行動のための機能基盤である。ショウジョウバエ *Dscam* は, 細胞外領域 (Ig 2, 3, 7 ドメイン) を規定する 3 つのエキソンと膜貫通領域を規定する 1 つのエキシソンの計 4 つの可変エキソンが複数存在し, それぞれが選択的スプライシングを受けることで, 理論上 38,016 種類の異なった神経受容体を作り出される (Schmucker et al., 2000)。これまでに我々は, この *Dscam* の分子的多様性が機械感覚神経細胞の配線特異性の決定に関与していることを明らかにしてきた (Chen et al., 2006; Hughes et al., 2007)。そこで今回, *Dscam* が神経回路形成の制御を介して行動を規定しうるか否かについて明らかにすることを目的とし, 味覚神経回路と摂食行動に焦点をあて解析をおこなった。

【結果】

野生型動物において, 甘味および苦味受容細胞はいずれも脳内の食道下神経節へ直接軸索を投射していたが, それぞれ神経節内の異なる部位に終止 (シナプスを形成) していた。次に, 甘味受容細胞で特異的に *Dscam* の発現を抑制したところ, 味受容細胞は野生型と同様, 食道下神経節へと軸索を伸長したが, 背腹方向における適切な部位への投射 (シナプス形成) が障害された。また, このトランスジェニック動物では, 野生型と比較して味嗜好性に有意な変化は認められなかったが, 摂食量が減少する傾向を示した。一方, 苦味受容細胞で特異的に *Dscam* の発現を減少させると味受容細胞と 2 次神経細胞の間のシナプス結合の数が減少し, 苦味物質に対する忌避性が低下した。これに対して, *Dscam* の分子多様性を野生型の約 60% にまで減少させた復帰突然変異体では, 摂食行動に異常は認められなかった。

【考察】

機械感覚を受容する神経細胞に加えて, 味覚受容細胞においてもまた, 軸索

投射およびシナプス形成に *Dscam* 発現が必要であることが明らかになった。この結果は、*Dscam* は発達期における感覚神経全般の神経回路形成の制御に参与していることを示している。また今回、*Dscam* が神経回路形成を通じて生得的な摂食行動および味覚嗜好性を決定していることが明らかになった。但し、*Dscam* の分子多様性については、少なくとも感覚神経細胞の精密な神経配線のためにはフルセット（38,000 種類）の存在が必要と考えられるが、摂食行動や味覚嗜好性など、行動学的制御の観点からみれば、少なくとも 20,000 種類程度の多様性があればよいことが示唆された。

【発表論文】

- 1) Nakajima A, Tsuboi Y, Suzuki I, Honda K, Shinoda M, Kondo M, Matsuura S, Shibuta K, Yasuda M, Shimizu N, Iwata K. PKC γ in Vc and C1/C2 is Involved in Trigeminal Neuropathic Pain. *J Dent Res*. 2011; 90(6): 777-781.
- 2) Miyamoto M, Tsuboi Y, Takamiya K, Haganir RL, Kondo M, Shinoda M, Oi Y, Iwata K. Involvement of GluR2 and GluR3 subunit C-termini in the trigeminal spinal subnucleus caudalis and C1-C2 neurons in trigeminal neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2011; 491(1): 8-12.
- 3) Iwata K, Miyachi S, Imanishi M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Teramoto K, Hitomi S, Shinoda M, Kondo M, Takada M. Ascending multisynaptic pathways from the trigeminal ganglion to the anterior cingulate cortex. *Exp Neurol*. 2011; 227(1): 69-78.
- 4) Kondo M, Iwata K. Regulation of complex brain wiring via diverse Ig receptor arising from a single gene. *J Oral Biosci*. 2010; 52(4): 378-387.
- 5) Nakagawa K, Takeda M, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Matsumoto S, Kobayashi A, Sessle BJ, Shinoda M, Iwata K. Alteration of primary afferent activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Mol Pain*. 2010; 6: 9.

腸管上皮細胞におけるロタウイルス感染と type III インターフェロン

浅野正岳

日本大学歯学部 病理学、日本大学総合歯学研究所 生体防御部門

【目的】

ロタウイルスは乳幼児ウイルス性腸炎の主な原因ウイルスである。その標的感染細胞は腸管上皮細胞であるが、ロタウイルス感染に伴う type III インターフェロン産生に関する分子メカニズムは不明である。そこで本研究では、ロタウイルス感染に伴う type III インターフェロン産生の分子機構について検索することを目的とした。

【結果】

ヒト大腸癌由来培養細胞にロタウイルスを感染させ type III インターフェロンの産生の有無を確認したところ、遺伝子発現、タンパク質産生共に増強されていた。ロタウイルスの感染を認識する上皮細胞のレセプターについて siRNA を用いて検討したところ、主に RIG-I が機能していることが分かった。type III インターフェロンの産生が一過性であったことから、宿主の免疫機構を破壊するロタウイルス由来の non-structural protein1 (NSP1) が type III インターフェロン産生を調節している可能性が考えられこれについて検索した結果、type III インターフェロン産生が NSP1 機能に全く関係しないことが判明した。

【考察】

ヒト大腸癌由来培養細胞における type III インターフェロンの一過性発現がロタウイルス由来の NSP1 による免疫機構破壊には全く関係しないことが明らかとなった。これは、ロタウイルスが宿主の免疫監視機構を逃れるために今まで知られていない機構を有する可能性を示唆するものであった。また、mouse embryonic fibroblast (MEF) を用いた実験から、ロタウイルス感染に伴うインターフェロンの産生がマウスとヒトの系では全く異なっている可能性が示唆された。

【発表論文】

- 1) Nakamura Y, Terahara M, Iwamoto T, Yamada K, Asano M, Kakuta S, Iwakura Y, Totsuka M (2012) Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor expression by the heat-inactivated potential probiotic *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 in a

mouse intestinal explant model. *Scand J Immunol.*, 75, 176-183

- 2) Shinoda M, Asano M, Omagari D, Honda K, Hitomi S, Katagiri A, Iwata K (2011) Nerve Growth Factor Contribution via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 to Ectopic Orofacial Pain. *J Neurosci.*, 31, 7145-7155
- 3) Omagari D, Takenouchi-Ohkubo M, Endo S, Sawada A, Moro I, Asano M, Komiyama K (2011) NF- κ B plays pivotal role in poly I:C-induced expression of human α -defensin-2 in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol.*, 165, 85-93
- 4) Suguro H, Mikami Y, Koshi R, Ogiso B, Watanabe E, Watanabe N, Honda MJ, Asano M, Komiyama K (2011) Novel Approach for Transient Protein Expression in Primary Cultures of Human Dental Pulp-Derived Cells. *Pro Expr Purif.*, 78, 143-148
- 5) Mikami Y, Asano M, Honda MJ, Takagi M (2010) Bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone synergistically increase alkaline phosphatase levels through JAK/STAT signaling in C3H10T1/2 cells. *J Cell Physiol* 223, 123-133

腸内共生菌による腸管免疫系の IgA 産生誘導機構の解析

細野 朗

日本大学生物資源科学部 食品生命学科 食品生命機能学研究室

【目的】

腸内には空腸・回腸といった小腸部位に比べて盲腸・結腸・直腸といった大腸部位に多くの嫌気性細菌が存在し、完全に排除されることなく腸内に共生している。この腸内共生菌の定着は、腸管免疫系の発達にも大きな影響を与えている。特に、腸管免疫系において重要な感染防御反応である免疫グロブリン A (IgA) 産生は無菌マウスにおいてきわめて低応答性であるが、セグメント細菌 (segmented filamentous bacteria; SFB) を無菌マウスに定着させると小腸の IgA 産生細胞を増加させるなど、SFB が腸管免疫系の形成・維持に重要であること (*Microbiol. Immunol.*, 1995) や、常在の腸内共生菌が腸上皮細胞分化にとって重要な刺激となりうる可能性が示唆されている。我々はこれまでに、マウス腸内の優勢菌である *Bacteroides* が *Lactobacillus* よりもパイエル板 B 細胞の IgM から IgA 形質細胞への分化を促進し、IgA 産生応答を増強する特徴があることを既に見出している (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2009)。しかし、腸内共生細菌のどのような分子刺激が腸管免疫系の形成や IgA 産生に必須な情報となりうるのかは、ほとんど明らかになっていなかった。そこで、本研究は、腸内共生菌が腸管関連リンパ組織 (GALT) において IgA 産生に関与する B 細胞の活性化にどのような分子反応が誘導されるのか、さらに、無菌マウスにおいては、腸内共生菌を有する通常マウスに比べて GALT の組織形成や IgA 産生応答が未発達であることから、*Bacteroides* や *Lactobacillus* をはじめとする腸内共生菌がそれぞれどのように関与しているのかを個体レベルで明らかにすることをめざした。

【結果】

無菌マウスにマウス腸内共生細菌の分離株で *Bacteroides acidifaciens* type A43 (BA) または *Lactobacillus johnsonii* 129 (LJ) を経口投与することによって定着させたノトバイオートマウスを作製し、腸管部位の免疫組織学的な検討を行った。その結果、BA マウスおよび LJ マウスにおける腸管組織中の IgA 産生量、IgA 産生細胞の割合を解析したところ、菌体接種 2 週間後、大腸部位における IgA 産生量は BA マウスの方が LJ マウスに比べて有意に高く、大腸粘膜固有層中の IgA⁺細胞数の発現も BA マウスの方が高かった。このとき、大腸および小腸のリンパ節における組織観察をしたところ、無菌マウスでは小腸パイエル板、盲腸

リンパ節において胚中心の形成がほとんどみられず、LJ マウスでは小腸パイエル板では胚中心がみられたが、盲腸リンパ節においては観察することができなかった。一方、BJ マウス、および通常マウスでは小腸パイエル板、盲腸リンパ節とも胚中心の形成が観察された。さらに、大腸部位および小腸部位におけるIgA 陽性細胞の割合を免疫組織学的な解析により行ったところ、無菌マウスやLJ マウスには大腸部位にはほとんどIgA 陽性細胞が検出されなかったが、BA マウスや通常マウスにはIgA 陽性細胞が顕著に観察することができた。

【考察】

腸管への腸内共生菌の定着が腸粘膜におけるIgA 産生において重要な刺激となっていることが改めて明らかになった。特に、腸内共生菌の中でも偏性嫌気性菌である *Bacteroides* の腸内への定着は、大腸部位において顕著に細菌数が増加し、腸管関連リンパ組織においてB 細胞の分化の場である胚中心の形成を促し、IgA 産生細胞を増加させていることが示唆された。一方で、*Lactobacillus* は小腸部位においてIgA 産生の誘導に寄与している特徴が明らかになり、腸内共生菌によっても菌種によって腸管部位ごとのIgA 産生における特徴が異なっている。

【発表論文】

- 1) Hiramatsu Y, Hosono A, Konno T, Nakanishi Y, Muto M, Suyama A, Hachimura S, Sato R, Takahashi K, Kaminogawa S. (2011) Orally administered *Bifidobacterium* triggers immune responses following capture by CD11c⁺ cells in Peyer's patches and cecal patches. *Cytotechnology*, 63: 307-317.
- 2) Kunii J, Takahashi K, Kasakura K, Tsuda M, Nakano K, Hosono A, Kaminogawa S. (2011) Commensal bacteria promote migration of mast cells into the intestine. *Immunobiol.*, 216: 692-697.
- 3) Sugi Y, Takahashi K, Nakano K, Hosono A, Kaminogawa S. (2011) Transcription of the Tollip gene is elevated in intestinal epithelial cells through impaired O-GlcNAcylation-dependent nuclear translocation of the negative regulator Elf-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 412: 704-709.
- 4) Takahashi K, Sugi Y, Nakano K, Tsuda M, Kurihara K, Hosono A, Kaminogawa S. (2011) Epigenetic control of the host gene by commensal bacteria in large intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 286: 35755-35762.
- 5) Tsuda M, Hosono A, Yanagibashi T, Kihara-Fujioka M, Hachimura S, Itoh K, Hirayama K, Takahashi K, Kaminogawa S. (2010) Intestinal commensal bacteria promote T cell hyporesponsiveness and down-regulate the serum antibody responses induced by dietary antigen. *Immunol. Lett.*, 132, 45-52.

エピジェネティック制御による HIV 潜伏感染維持と破綻機構の解明

日本大学歯学部細菌学 日本大学総合歯学研究所生体防御部門

今井 健一, 落合 邦康

【目的】

難治性感染症の代表的疾患 AIDS の克服において、耐性ウイルスの出現やワクチン開発など現在も多くの問題が残されている。世界の HIV 感染者数は 3300 万人にのぼり、年間 210 万人もの犠牲者が報告されているが、特にアジアにおける感染は拡大の一途をたどり、本邦においても感染者増加に対する対策は急務となっている。HIV の化学療法は、潜伏感染 HIV には無効なため AIDS 治療を困難なものにしており、感染者は潜伏 HIV の再活性化により感染症増悪や死に至る。従い、潜伏感染期の HIV 複製をコントロールできるか否かが感染者の予後を作用するといっても過言ではない。近年、HIV の潜伏感染の成立と破綻にヒストンのアセチル化と脱アセチル化が深く関与していることが明らかとなるに従い、それらを制御する薬剤で人為的にウイルスの複製をコントロールしようとする治療が試みられている。これまでに私達は、転写因子 AP-4 が LTR 周辺に HDAC を呼び込み近傍のヒストンを脱アセチル化することにより潜伏感染の成立に関与していること、他方、ヒトに常在する嫌気性細菌の代謝産物・酪酸が HDAC を阻害することにより潜伏 HIV を再活性化することを報告した。しかしながら、長期間にわたる安定な遺伝子発現の抑制には Histone H3 Lysine 9(H3K9)のメチル化が重要であることが知られているものの、HIV の潜伏感染におけるアセチル化以外のヒストン修飾の関与はよくわかっていない。本研究では、HIV 潜伏感染細胞における H3K9 のメチル化、特にその責任酵素である H3K9 ジメチル化酵素 G9a の役割とその分子機構を解析した。また新規 HDAC 阻害剤 NCH-51 を開発し、潜伏感染 HIV の再活性化を誘導する事を見出したのであわせて報告する。

【結果】

CEM T 細胞に G9a を強発現させると、HIV LTR からの基礎転写および TNF α や Tat による転写誘導が全般的に抑制された。G9a の欠失変異体を用いた実験より、ヒストンのメチル化を担う G9a 上の SET ドメインが必須であることがわかった。また、G9a siRNA の導入によって LTR の遺伝子発現とウイルスの産生が上昇した。従って、G9a はヒストンのメチル化を介して HIV の発現を負に制御していることが示唆された。さらに、G9a の特異的阻害剤である BIX01294 は、HIV 潜伏感染細胞株 Ach2 と U1 細胞の H3K9 ジメチル化を抑制することで潜伏 HIV の複製を促進した。しかも、BIX01294 の潜伏 HIV 活性化に対する作用と HDAC 阻害剤である SAHA

や DNA メチル化酵素(DNMT)阻害剤である 5-aza-dC との作用は相乗的に認められた。上記の実験事実から、G9a は HIV LTR の H3K9 ジメチル化を介して HIV の発現を負に制御することで、HIV の潜伏感染の成立に関与していることが示唆された。

また、新規 HDAC 阻害剤 NCH-51 は潜伏感染 HIV の再活性化を強く誘導した。詳細な解析な結果、HIV LTR 中の Sp1 結合サイトが NCH-51 による HIV 複製に必須であることが分かった。

【考察】

HIV の潜伏感染維持にはヒストンの脱アセチル化のみならず、メチル化も重要であり、両者は相乗的に作用していることが示唆された。G9a は DNA メチル化酵素 DNMT をリクルートすることで DNA のメチル化に深く関与していることが知られているので、G9a がヒストンと DNA の両メチル化を介して HIV の潜伏感染の成立と維持に重要な役割をはたしていると推察される。また BIX01294 および NCH-51 は、エピジェネティック制御を介して潜伏 HIV を再活性化することが明らかとなった。遺伝子転写制御のエピジェネティック制御機構と HIV 潜伏感染機構の解明を通して、AIDS 発症を人為的に制御する方法の開発につながることを期待される。

【発表論文】

- 1) Imai K, Inoue, H, Tamura M, Cueno ME, Inoue H, Takeichi O, Kusama K, Saito I, Ochiai K (2012) The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr Virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie* Vol. 94(3), 839-846. 「有」
- 2) Imai, k, Victriano, AF, Ochiai, K, Okamoto, T (2012) Microbial Interaction of Periodontopathic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* and HIV -Possible Causal Link of Periodontal Diseases to AIDS Progression- *Current HIV Research*, Vol.10, 238-244. 「有」
- 3) Ochiai K, Imai K, Tamura M, Ochiai-kurita T. (2011) Butyric acid effects in the development of periodontitis and systemic diseases. *J. Oral Biosci.*, 53(3), 213-220. 「有」
- 4) Imai K, Ochiai K. (2011) Role of histone modification on the transcriptional regulation and HIV-1 gene expression –Possible mechanisms of periodontal diseases in AIDS progression– *J. Oral science*, 53(1), 1-13. 「有」
- 5) Victoriano AF, Imai K, Togami H, Ueno T, Asamitsu K, Suzuki T, Miyata N, Ochiai K, Okamoto T. Novel histone deacetylase inhibitor NCH-51 activates latent HIV-1 gene expression. *FEBS Lett.* 585:1103-11. 2011. 「無」
- 6) Imai K, Okamoto T, Ochiai K. (2010) Molecular mechanisms of HIV-1 latency and its breakdown by Periodontal diseases. *J. Oral Biosci.*, 52 (3), 260-267. 「有」
- 7) Imai K, Togami H, Okamoto T. Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. *J Biol Chem.* 285:16538-16545. 2010. 「無」

メカニカルストレスが骨芽細胞の IL-11 産生を介して骨リモデリングに関連するタンパク成分の発現に及ぼす影響

川戸貴行^{1,4)}、塩野目智恵子²⁾、清水典佳^{2,5)}、田邊奈津子^{1,4)}、
鈴木直人^{3,4)}、前野正夫^{1,4)}

日本大学歯学部 衛生学¹⁾・歯科矯正学²⁾・生化学³⁾

日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態部門⁴⁾

日本大学歯学部総合歯学研究所 臨床研究部門⁵⁾

【目的】

歯科矯正治療による歯の移動は、歯槽骨リモデリングにおける骨形成と骨吸収のバランス変化によって起こり、その過程には骨芽細胞、骨細胞および破骨細胞の機能が密接に関与している。歯槽骨に加わる矯正力は、メカニカルストレスとして局所に炎症反応を引き起こし、種々のサイトカインやprostaglandin (PG) 産生を誘導する。

骨芽細胞が産生するRunx2およびbone morphogenetic protein (BMP)-2は、骨芽細胞分化に不可欠な因子である。一方、骨芽細胞が産生するreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) は、破骨細胞前駆細胞の細胞膜に発現する受容体と結合し、破骨細胞への分化を促進する。また、骨芽細胞はRANKLのおとりの受容体osteoprotegerin (OPG) を産生し、破骨細胞分化を抑制する。

近年、ヒト骨芽細胞 (Saos-2細胞) に圧迫力 (compressive force; CF) を負荷すると、interleukin (IL)-11のautocrine作用を介して、IL-11産生が増加することが報告された。しかし、CFによって間接的に誘導されたIL-11が骨代謝に及ぼす影響の詳細については、明らかにされていない。

そこで、骨芽細胞 (MC3T3-E1細胞) にCF (1.0 または 2.0 g/cm²) を負荷後、骨リモデリングの調節に関わる種々のタンパク成分の発現に及ぼす影響を調べた。また、これらのタンパク成分の発現へのCF誘導性のIL-11あるいはPGE₂によるautocrine作用の関与の有無を、IL-11アンタゴニストおよびcyclooxygenase (COX)-2選択阻害剤NS398を用いて検討した。

【結果および考察】

MC3T3-E1 細胞の IL-11 受容体 (IL-11r) および IL-11 発現は、CF の強さ依存的に有意に増加した。MC3T3-E1 細胞の Runx2 および BMP-2 発現は、2.0 g/cm² CF よりも 1.0 g/cm² CF の負荷で顕著に増加した。一方、IL-11 アンタゴニストの存在下で MC3T3-E1 細胞に 1.0 g/cm² CF を負荷すると、Runx2 および BMP-2 発

現は 1.0 g/cm² CF 負荷時とコントロールの中間程度のレベルまで低下した。IL-11r と IL-11 発現には、IL-11 アンタゴニスト添加の影響は認められなかった。これらの結果から、MC3T3-E1 細胞に 1.0 g/cm² CF を負荷後に増加した Runx2 および BMP-2 発現には、IL-11 の autocrine 作用の関与が示唆された。一方、IL-11r と IL-11 発現には、IL-11 の autocrine 作用が関与しないことが明らかになった。

RANKL と M-CSF 発現は 1.0 g/cm² CF よりも 2.0 g/cm² CF の負荷で顕著に増加し、OPG 発現は同条件で顕著に減少した。また、IL-11 アンタゴニストの存在下で MC3T3-E1 細胞に 2.0 g/cm² CF を負荷すると、RANKL と M-CSF 発現は 2.0 g/cm² CF 負荷時とコントロールの中間程度のレベルまで低下したが、OPG 発現には IL-11 アンタゴニスト添加の影響が認められなかった。これらの結果から、MC3T3-E1 細胞に 2.0 g/cm² CF を負荷後に増加した RANKL および M-CSF 発現には、IL-11 の autocrine 作用の関与が示唆された。一方、OPG 発現低下には、IL-11 の autocrine 作用は関わっていないことが明らかになった。

そこで、OPG 発現低下への PGE₂ の関与を想定し、MC3T3-E1 細胞に 2.0 g/cm² CF を負荷後、PGE₂ 産生を調べた。次いで、NS398 存在下で MC3T3-E1 細胞に 2.0 g/cm² CF を負荷後、OPG 発現に及ぼす影響を調べた。その結果、2.0 g/cm² CF の負荷により、MC3T3-E1 細胞の PGE₂ 産生は顕著に増加した。また、NS398 は、2.0 g/cm² CF の負荷による OPG 発現低下を完全にブロックした。これらの結果から、OPG 発現は、CF によって誘導された PGE₂ の autocrine 作用を介して低下することが示唆された。

以上のことから、骨芽細胞への 1.0 g/cm² CF の負荷によって誘導される IL-11 は、その autocrine 作用によって Runx2 および BMP-2 など骨形成を促進する成分の産生を増加させ、2.0 g/cm² CF の負荷によって誘導される IL-11 は、その autocrine 作用によって RANKL および M-CSF など破骨細胞分化を促進する成分の産生を増加させることが示唆された。また、骨芽細胞への 2.0 g/cm² CF 負荷によって誘導される PGE₂ は、その autocrine 作用によって破骨細胞分化を抑制する OPG 産生を低下させることが明らかになった。すなわち、歯槽骨に矯正力が加えられるときの骨リモデリングに伴う骨吸収と骨形成のバランスは、骨芽細胞に加わる CF の強さに影響されることが明らかになった。

【発表論文】

- 1) Shionome C, Kawato T, Tanabe N, Kariya T, Sanuki R, Koyama Y, Suzuki N, Shimizu N, Maeno M (2012) Compressive force induces the expression of bone remodeling-related proteins via interleukin-11 production in MC3T3-E1 cells. *J Hard Tissue Biol* 21 (1), 65-74.

Helicobacter pylori の口腔内での生態に関する検討 —細菌学的エコロジー解析—

神谷 茂、米澤 英雄、大崎 敬子

杏林大学医学部 感染症学

【目的】

Helicobacter pylori は経口感染によりヒトに侵入、胃内でバイオフィルムを形成して定着し、胃炎を発症する(1, 2)。世界中の約半数のヒトが本菌に感染しており、これら感染者は除菌をしない限りは一生、本菌を胃内に持ち続ける。このような細菌の感染・定着に関する研究は数多く行われてはいるものの、そのすべてが解明できているわけではない。*H. pylori* の主要な感染時期は2歳から5歳であり、乳歯萌出の時期と重なっている。歯牙萌出は口腔内環境を劇的に変化させ、口腔内細菌叢にも変化をもたらす。口腔細菌叢の変化と *H. pylori* の感染が同時期であること、そして口腔特に歯周病患者のデンタルプラーク中に *H. pylori* が高頻度で検出されることは、口腔内細菌より *H. pylori* 定着に影響を受けている可能性を示唆している。そこで本研究は、*H. pylori* と口腔内細菌の相互作用を解明することを目的とし、口腔内における *H. pylori* の動態に関する解析を行った。併せて *H. pylori* 感染により胃内細菌叢に与える口腔細菌の影響について解析を行った。

【結果】

H. pylori を歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の培養上清で処理すると、菌体表層が破裂した形状をとり、菌体外に放出される DNA 量も有意に増加した。上清処理後、*H. pylori* の生菌数を測定すると有意に減少していた。*P. gingivalis* は短鎖脂肪酸である酪酸を産生することから、酪酸に注目した。酪酸溶液で処理した *H. pylori* は、*P. gingivalis* 培養上清で処理した時と同様に表層構造の破裂が認められ、菌体外放出 DNA 量も増加した。以上より、*P. gingivalis* 培養上清には *H. pylori* に対する抗菌物質を含み、その抗菌物質の1つは酪酸であることが示唆された(3)。

H. pylori を接種し、一年後胃内に *H. pylori* が認められた（感染）スナネズミおよび検出出来なかった（感染不成立）スナネズミの胃内細菌叢の解析を行った。Prevotella 属菌は *H. pylori* を摂取していないスナネズミ（コントロール）および感染群のスナネズミ胃内には検出限界以下であったのに対して、感染不成立群ではすべてのスナネズミ胃内で検出された。Prevotella 属菌の菌数は胃 1g 当たり 10^5 レベルであった(4)。

【考察】

H. pylori は *P. gingivalis* が産生する酪酸により、菌体破壊を起こすことが明らかとなった。*H. pylori* の菌体破壊は 12.5mM の酪酸で処理することで顕著に認められ、生菌数も有意に減少した。歯周病患者のプラーク中には約 14-20mM の酪酸が存在することが報告されていることから、歯周病患者プラーク中は *H. pylori* が生存するには非常に厳しい環境であることが示唆された。一方で歯周病患者のデンタルプラーク中で *H. pylori* は検出されやすいことが報告されている。歯周病原細菌である *P. gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* が *H. pylori* と凝集しやすい性質を持つことから、口腔内に入り込んだ *H. pylori* はこうした菌と共凝集することで、歯周病デンタルプラークに入り込む。しかしデンタルプラーク中の酪酸などにより殺菌され、死菌より DNA が放出され、DNA はこれら細菌のバイオフィルムの細胞外マトリックスとして利用されている。この結果は *H. pylori* は口腔サンプルより PCR では検出されるものの、生菌としては検出できないことを示唆している。

H. pylori の感染・定着は、胃内細菌叢に影響を受けていることが示唆された。口腔内にも存在する *Prevotella* 属菌が、感染不成立群スナネズミ胃内だけで検出されることは *Prevotella* 属菌が *H. pylori* 定着に抑制的な働きをしている可能性を示唆している。口腔内細菌は唾液とともに胃内に流入していることから、他の細菌種に関しても解析する必要がある。さらに *H. pylori* と口腔内細菌の相互作用について解析を進める予定である。

【発表論文】

- 1) Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kamiya S (2010) Assessment of in vitro biofilm formation by *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol Hepatol. 25 Suppl 1, S90-94.
- 2) Yonezawa H, Osaki T, Woo T, Kurata S, Zaman C, Hojo F, Hanawa T, Kato S, Kamiya S (2011) Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. Anaerobe. 17 (6), 388-390.
- 3) Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Zaman C, Woo TD, Takahashi M, Matsubara S, Kawakami H, Ochiai K, Kamiya S (2012) The destructive effects of butyrate on the cell envelope of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol. 61 (Pt 4), 582-589.
- 4) Takako Osaki, Takahiro Matsuki, Takashi Asahara, Cynthia Zaman, Tomoko Hanawa, Hideo Yonezawa, Satoshi Kurata, Timothy Derg-hoong Woo, Koji Nomoto, Shigeru Kamiya (2012) Comparative analysis of gastric bacterial microbiota in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. Microb. Pathog. 53, 12-18.

歯周病細菌による妊娠異常の誘発機構 胎盤絨毛細胞と血管内非細胞の傷害機序について

早川 智¹⁾、相澤（小峯）志保子¹⁾、松岡 俊²⁾、泉 泰之¹⁾、地家豊治³⁾、
廣畑直子¹⁾、村井一郎³⁾

日本大学医学部 病態病理学系微生物学分野¹⁾

日本大学 学生 n-CME Nihon Universitas Collegium Medicum Experimentum²⁾

日本大学医学部 研究支援部門³⁾

【目的とバックグラウンド】

妊娠では半非自己である胎児に対し、免疫学的拒絶を来さず特異な共生が成立する。生殖器外の慢性感染症は病原微生物の直接毒性以外に、炎症性サイトカインの産生を介して胎児胎盤を傷害する。臨床的にも、母体のコントロール不良の歯周病は、早産や胎児発育遅延（IUGR）、さらに妊娠高血圧症候群の重要なリスク因子として注目されている。その機序として、歯周病起因菌 *Porphyromonas gingivalis* などによる胎盤の直接的傷害のほか、母体免疫系の活性化による寛容の破綻が想定されている。歯周病患者ではスケーリングなど歯科的処置によっても菌血症を来すことが知られるが、血中に入った菌体成分が直接に接触するのは血管内皮であるが、妊婦では胎盤における栄養膜細胞がこれに加わる。菌血症が血管内皮におよぼす直接毒性を観察するため、*P. gingivalis* を正常ヒト血管内皮細胞、不死化絨毛細胞に負荷し、超微形態学的変化を観察した。

【対象と方法】

1) 正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC（タカラバイオ）、不死化初期浸潤絨毛細胞株 HTR8 を各々10%FCS 加 EGM-2、RPMI 1640 培地により培養した。2) 種々の濃度の *P. gingivalis* LPS（PGLPS）（InvivoGen）を添加し、細胞増殖の変化とアポトーシスを観察した。3) 走査型電子顕微鏡 HITACHI S-4000 SEM を用い、真空下で蒸発しない Choline lactate を基質としたイオン液体に含浸して観察を行った。4) *P. gingivalis* 生菌を添加し同様の検討を行った。

【結果】

1) HUVEC，HTR8 はともに 0.01–10 μ g/ml の PGLPS による増殖抑制を受けなかった。2) PGLPS 10 μ g/ml 添加 24 時間の時点で、HUVEC には核の扁平化とジッパー様の細胞間隙の開大がみられた。一方、HTR8 ではこのような変化は認められなかった。3) 生菌でも HUVEC には同様の変化が認められた。4) この変化は、アクチノマイシン D によって誘発されるアポトーシスとは異なった変化であった。

【考察】

従来法の SEM は、固定し金属コートした検体を高度の真空状態において観察していたが、イオン液体法により細胞の変化を動的に観察できる。我々は初めて、細胞を傷害しない濃度の PGLPS による血管内皮細胞間隙の拡大を観察した。妊娠高血圧症候群の標的臓器は胎盤よりも全身の血管内皮と考えられるが、一般に知られている炎症性サイトカインや血液凝固亢進に加えて、血管内皮細胞間結合の異常が病態に関与する可能性が示唆された。しかし、栄養膜細胞ではこのような変化は見られず、我々が先に報告したように *P. gingivalis* や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* が脱落膜 NK 細胞を活性化し、絨毛に対する Foaming 誘導による細胞傷害の原因になると考えられた。

【発表論文】

- 1) Komine-Aizawa S, Yamazaki T, Yamazaki T, Hattori S, Miyamoto Y, Yamamoto N, Haga S, Sugitani M, Honda M, Hayakawa S, Yamamoto S. Influence of advanced age on Mycobacterium bovis BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with Mycobacterium tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2010 Oct;17(10):1500-6
- 2) Shinojima Y, Terui T, Hara H, Kimura M, Igarashi J, Wang X, Kawashima H, Kobayashi Y, Muroi S, Hayakawa S, Esumi M, Fujiwara K, Ghosh S, Yamamoto T, Held W, Nagase H. Identification and analysis of an early diagnostic marker for malignant melanoma: ZAR1 intra-genic differential methylation. J Dermatol Sci. 2010 Aug;59(2):98-106.
- 3) Negishi M, Izumi Y, Aleemuzzaman S, Inaba N, Hayakawa S. Lipopolysaccharide (LPS)-induced Interferon (IFN)-gamma production by decidual mononuclear cells (DMNC) is interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent. Am J Reprod Immunol. 2011 Jan;65(1):20-7.
- 4) Uenogawa K, Hatta Y, Arima N, Hayakawa S, Sawada U, Aizawa S, Yamamoto T, Takeuchi J. Azacitidine induces demethylation of p16INK4a and inhibits growth in adult T-cell leukemia/lymphoma. Int J Mol Med. 2011 Nov;28(5):835-9.
- 5) Suzaki A, Hayashi K, Kosuge K, Soma M, Hayakawa S. Disseminated gonococcal infection in Japan: a case report and literature review. Intern Med. 2011;50(18):2039-43
- 6) Komine-Aizawa S, Izumi Y, Imai S, Fujita K, Hayakawa S. The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune-mediated pregnancy loss. J Reprod Immunol. 2011 Dec;92(1-2):21-6
- 7) Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hidaka S, Kongkaew S, Kongkaew A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Sequence analysis of

porcine kobuvirus VP1 region detected in pigs in Japan and Thailand. *Virus Genes*. 2012 Apr;44(2):253-7.

- 8) Khamrin P, Thongprachum A, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H Detection of human bocavirus 1 and 2 from children with acute gastroenteritis in Japan. *J Med Virol*. 2012 Jun;84(6):901-5
- 9) Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Phylogenetic analysis of rubella viruses in Vietnam during 2009-2010. *J Med Virol*. 2012 Apr;84(4):705-10
- 10) Khamrin P, Malasao R, Chaimongkol N, Ukarapol N, Kongsricharoern T, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Circulating of human bocavirus 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol*. 2012 Apr;12(3):565-9.
- 11) Trinh QD, Pham NT, Le Nguyen NT, Lam BQ, Le Phan KT, Truong KH, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Mizuguchi M, Ushijima H, Hayakawa S. Drug Resistance Mutations in the HIV Type 1 Protease and Reverse Transcriptase Genes in Antiretroviral-Naive Vietnamese Children. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 Mar 6. [Epub ahead of print]

口腔レンサ球菌による自己免疫疾患発症機構

菊池 賢

順天堂大学医学部 感染制御科学・細菌学・総合診療科学

【目的】

多くの自己免疫疾患は molecular mimic と称される細菌などの微生物交叉抗原が発症の引き金となると考えられているが、実際に原因微生物が特定された例は極めて少ない。原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は主に中年以降の女性に発症する肝臓の小葉間胆管周囲の慢性非化膿性炎症を主体とする原因不明の自己免疫疾患で、進行すると肝硬変に至り、肝移植しか治療手段がない難病である。我が国には 4000 名程の患者がおり、毎年、300 名程の新規患者が発症している。我々は PBC 患者の胆管周囲の慢性非化膿性炎症部位にレンサ球菌由来のリポテイコ酸が証明されること、患者の血清中の抗リポテイコ酸抗体が高値を示すことから、何らかのレンサ球菌の関与を疑い、スクリーニングをしたところ、*Streptococcus intermedius* (SI) に対する抗体が最も高いことを見いだした (Autoimmunity 39:129-135, 2006)。更に患者血清では対照患者 (HCV) 血清に比べ、有意に SI 特異ヒストン様タンパク (HLP) 抗体が高く、PBC 病変部位に抗 HLP 抗体で検出されるタンパクが認められることから、これまで原因が不明であった PBC の分子模倣の原因微生物として SI が強く疑われ (Clin Immunol 127:245-251, 2008)、SI をマウスに投与すると PBC 同様の病変が再現できるモデルも確立した (Lab Invest 90: 577-588, 2010)。本研究では研究代表者が実施した SI ゲノム解析から得られた情報を元に分子模倣 epitope の特定、PBC を引き起こす特定の遺伝背景を持った SI クローンが存在するかどうか、深部膿瘍等の感染症株との病原因子、遺伝的背景の違いがあるかどうか、を明らかにする。

【結果】

PBC 患者 5 名、他の疾患のない対照者 19 名などの歯周部位の SI 検出率を調べたところ、PBC 患者では 5 名中 4 名 (80%) から SI が分離されたのに対し、コントロールでは 3/19 (16%)、自己免疫性膵炎 0/4、シェーグレン 0/2、その他の自己免疫疾患、慢性炎症疾患では 4/11 (36%) と陽性率が低かった。これらの SI 株と深部膿瘍、感染性心内膜炎、敗血症など臨床的に明らかな感染症を起こした株でゲノム解析から病原因子・定着因子と想定されるタンパクをコードする 100 遺伝子を選び、特異 PCR を設計し、その分布状況を調査したが、PBC 患者由来株、健常者由来株、各感染症病巣

由来株に特有の病原・定着因子のパターンは得られなかった。また、それぞれの SI 株について *sodA*, *hlp*, *rpoB*, *ddl*, *srtA*, *dnaJ*, *groEL*, *eno*, *gyrB*, *recN*, *tuf* の 11 house keeping gene について、全塩基配列解析を行い、遺伝的背景を調べたが、PBC やそれぞれの感染症に特有のクローンは証明できなかった。

【考察】

今回の検討の結果から、SI の持続感染あるいは保菌による慢性の SI 代謝産物、抗原供給が PBC 発症・進行の一因となっている可能性は示唆されたが、PBC 発症にかかわる特有の SI クローンが存在する訳ではなく、むしろ慢性炎症を許容する宿主側の因子が PBC 発症には重要であると思われた。SI は口腔、腸管、皮膚、外陰部などの他の常在菌叢からはほとんど検出されない一方で、SI は歯周病の原因菌の一つとしてよく知られている。今回の検討でも歯周部位からは比較的高頻度に検出されていることから、SI の持続感染・定着の場として、歯周病は SI のヒトでの主要な存在部位ではないかと考えられた。本研究の成果は、PBC 患者の歯周病を治療・コントロールすることで PBC 発症や PBC の病期進行を防ぐことができるのではないかと期待される。

【発表論文】

- 1) Yanagisawa N, Haruta I, Kikuchi K, Shibata N, Yagi J. Are dysregulated inflammatory responses to commensal bacteria involved in the pathogenesis of hepato-biliary-pancreatic autoimmune disease? an analysis using mice models of primary biliary cirrhosis and autoimmune pancreatitis. ISRN Gastroenterol. 2011 e-published.
- 2) Haruta I, Kikuchi K, Nakamura M, Miyakawa H, Hirota K, Kato H, Miyakawa H, Shibata N, Miyake Y, Hashimoto E, Shiratori K, Yagi J. Involvement of commensal bacteria may lead to dysregulated inflammatory and autoimmune responses in a mouse model for chronic nonsuppurative destructive cholangitis. J. Clin. Immunol. In press, 2012.

「歯周組織における外来刺激応答性の検討」

清水 典佳

日本大学歯学部 歯科矯正学教室、日本大学総合歯学研究所 臨床研究部門

【目的】

歯科矯正治療による歯の移動は、矯正力という物理的刺激（メカニカルストレス）が歯根膜や骨に伝達され骨吸収、骨添加による骨のリモデリングが促進されることにより起こると考えられている(Bone Miner Res, 1993)。これまでに歯根膜細胞や骨芽細胞にメカニカルストレスを負荷すると強力な起炎物質である PGE₂ が産生され、破骨細胞形成に関与する RANKL の発現を誘導することが報告されている。近年 Interleukin-17 (IL-17) もまた RANKL の発現を介し強力な破骨細胞形成促進作用を有することが明らかにされた。しかしメカニカルストレス負荷と IL-17 発現の関連性については明らかにされていない。そこで本研究ではメカニカルストレス負荷による IL-17 発現について検討を行い、さらに IL-17 発現が破骨細胞形成関連因子 (RANKL, M-CSF, OPG) や破骨細胞形成に関与する PGE₂ や炎症性サイトカインに与える影響について明らかにすることを目的とする。

一方、低出力レーザーは抗炎症作用、疼痛緩和作用があるとされ、本教室でもヒト歯根膜細胞にメカニカルストレスを加えた時に産生される PGE₂ がレーザー照射により顕著な減少することを報告している (J Dent Res, 1995)。そこで、本研究ではさまざまな年齢の培養ヒト歯根膜細胞を用い、メカニカルストレスを負荷するとともに、低出力レーザー照射を行い、レーザー照射による PGE₂ 産生の抑制メカニズムについても検討することとする。

【結果】

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞(MC3T3-E1)にメカニカルストレス (1.0g/cm² または 2.0g/cm²) を 1, 3, 6, 12, 24 時間負荷し IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F の発現について検討した。メカニカルストレス負荷により IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E そして IL-17F の発現が有意に増加しその増加は負荷後 6 時間まで時間依存的であった。また IL-17A の発現が IL-17 s の中では最も有意に増加していた。そこで IL-17A を添加後 (0.1, 1.0, 10ng/ml) 72 時間培養し RANKL, M-CSF, OPG の発現について検討した。IL-17A 添加により RANKL, M-CSF の発現は有意に増加し OPG の発現は有意に減少した。次に、IL-17 インヒビターである cyclohexamide の存在または非存在下で、IL-17A を MC3T3-E1

に添加し72時間培養後 COX-1, COX-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, TNF- α 発現と PGE₂ 産生量について検討した。IL-17A 添加により COX-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, TNF- α 発現および PGE₂ 産生量は濃度依存的増加し cyclohexamide の存在により有意に抑制された。さらに PGE₂ のインヒビターである celecoxib の存在下非存在下で上記同様の実験を行ったところ、celecoxib 存在下では、IL17A 添加により増加した IL-1 α , IL-6, IL-11, IL-8 発現は control レベルまで抑制された^{1,2)}。

一方、培養ヒト歯根膜細胞にメカニカルストレス(2.0g/cm²)を 3, 6, 12, 24, 48 間負荷するとともに Ga-Al-As 低出力レーザー (LLL) を照射し PGE₂ の律速酵素である COX-2, 細胞膜からアラキドン酸の加水分解に係る cPLA₂- α の発現について検討した。メカニカルストレス負荷による COX-2, cPLA₂- α の発現は有意に増加し、LLL 照射により有意に抑制された。さらにメカニカルストレス負荷直後の LLL 照射により最もメカニカルストレス負荷による COX-2, PLA2- α 発現を抑制した³⁾。

【考察】

メカニカルストレス負荷により IL-17s の発現が増加し、また IL-17A は破骨細胞形成関連因子 (RANKL, M-CSF, OPG) の発現を誘導することが明らかになった。さらに IL-17A は破骨細胞形成に関与する COX-2, IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-11, TNF- α 発現を誘導し、また celecoxib 添加により、IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-11 の発現が抑制されたことよりメカニカルストレス負荷により産生される IL-17A は主に PGE₂ の産生を介して骨吸収に関連する炎症性サイトカイン IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-11 の発現を誘導すると考えられる。

LLL 照射による抗炎症作用はメカニカルストレス負荷により増加した PGE₂ 律速酵素である COX-2 およびアラキドン酸の加水分解酵素 cPLA₂- α の発現を抑制することによるということが明らかになった。また LLL 照射は矯正力負荷直後に照射することで効果的に炎症を抑制することができると考えられる。

【発表論文】

- 1) Zhang F, Koyama Y, Sanuki R, Mitsui N, Suzuki N, Kimura A, Nakajima A, Shimizu N, Maeno M (2010) IL-17A stimulates the expression of inflammatory cytokines via celecoxib-blocked prostaglandin in MC3T3-E1 cells. Arch Oral Biol 55, 679-88
- 2) Zhang F, Wang C, Koyama Y, Mitsui N, Shionome C, Sanuki R, Suzuki N, Mayahara K, Shimizu N, Maeno M (2010) Compressive force stimulates the gene expression of IL-17s and their receptors in MC3T3-E1 cells. Connect Tissue Res 51, 359-369
- 3) Mayahara K, Yamaguchi A, Sakaguchi M, Igarashi Y, Shimizu N (2010) Effect of

Ga-Al-As laser irradiation on COX-2 and cPLA2- α expression in compressed human periodontal ligament cells. *Lasers Surg Med* 42, 489-493

- 4) Sanuki R, Shionome C, Kuwabara A, Mitsui N, Koyama Y, Suzuki N, Zhang F, Shimizu N, Maeno M, (2010) Compressive force induces osteoclast differentiation via prostaglandin E2 production in MC3T3-E1 cells. *Connect Tissue Res* 51, 150-158
- 5) Fujimoto K, Kiyosaki T, Mitsui N, Mayahara K, Omasa S, Suzuki N, Shimizu N (2010) Low-intensity Laser Irradiation Stimulates Mineralization via Increased BMPs in MC3T3-E1 Cells. *Lasers Surg Med* 42, 519-526
- 6) Kiyosaki T, Mitsui N, Suzuki N, Shimizu N (2010) Low-level laser treatment stimulates mineralization via increased Runx2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. *Photomed Laser Surg* 28, S167-S172

抗ジンジパイン鶏卵抗体含有タブレットの歯周治療への応用

日本大学歯学部 歯周病学講座¹, 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門²,

菅野 直之^{1,2}, 伊藤 公一^{1,2}

【目的】

グラム陰性の偏性嫌気性菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は、歯周病の最も有力な原因菌であると考えられており、全身への影響も示唆されている。*P. gingivalis* の産生するジンジパインは、発育増殖に不可欠な因子であると同時に、宿主タンパクを広範に分解し宿主免疫機構の破綻をきたす重要な病原因子である。本研究では、ジンジパインを標的とした受動免疫による歯周病治療の可能性について検討した。

【材料および方法】

総数 34 名の被験者を対象に、全顎のスクレーリング・ルートプレーニングを行った後、鶏卵抗体含有タブレットを毎食後（朝、昼、晩）を目安に 1 回に 1 個を 12 週間使用した。テスト群のタブレットは抗ジンジパイン鶏卵抗体を ? mg 含み、プラセボ群は免疫をしていない鶏卵抗体を同量含むタブレットとした。タブレット使用前後の歯肉縁下プラークを採取し、*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) 菌数を real-time PCR 法で測定した。また、臨床パラメータとして 6 歯を対象に歯周ポケット深さ (PD)、プロービング時の出血 (BOP) およびプラークコントロールレコード (PCR) を記録した。

【結果】

鶏卵抗体含有タブレットを使用することにより歯肉縁下プラーク中の *P.g* 菌数およびその割合は有意に減少した。また、テスト群で、平均 PD が有意に減少した。

【考察および結論】

これまでの研究で、タブレット単独では、歯肉縁下プラーク中の *P.g* 菌数に影響を与えることは無かったが、スクレーリング・ルートプレーニングと組み合わせることにより *P.g* 菌数の有意な減少が見られた。歯周治療において受動免疫療法は、機械的プラークコントロールと組み合わせることによってその効果を発揮するものと考えられた。

【発表論文】

- 1) Sugano, N. (2012) Biological plaque control: novel therapeutic approach to periodontal disease. *J Oral Sci.* 54(1), 1-5.
- 2) Kawamoto A, Sugano N, Motohashi M, Matsumoto S, Ito K. (2012) Relationship between salivary antioxidant capacity and phases of the menstrual cycle. *J Periodontal Res.* in press.
- 3) Takano M, Sugano N, Mochizuki S, Koshi RN, Narukawa TS, Sawamoto Y, Ito K. (2012)
- 4) Hepatocytes produce tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in response to *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 47, 89-94.
- 5) Nakao R, Takigawa S, Sugano N, Koshi R, Ito K, Watanabe H, Senpuku H. (2011) Impact of minocycline ointment for periodontal treatment of oral bacteria. *Jpn J Infect Dis.* 64, 156-60.
- 6) Kawamoto A, Sugano N, Motohashi M, Matsumoto S, Ito K. (2010) Relationship between oral malodor and the menstrual cycle. *J Periodontal Res.* 45, 681-7.
- 7) Iwano Y, Sugano N, Matsumoto K, Nishihara R, Iizuka T, Yoshinuma N, Ito K. (2010) Salivary microbial levels in relation to periodontal status and caries development. *J Periodontal Res.* 45, 165-9.

骨シアロタンパク質の転写に対する歯周病原菌由来リポポリサッカライドの効果

小方頼昌、周黎明、李新月

日本大学松戸歯学部 歯周治療学講座、口腔科学研究所

【目的】

骨シアロタンパク質 (Bone Sialoprotein ; BSP) は、石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現し、アパタイト結晶形成能を有することから、初期の石灰化において重要な役割を果たすと考えられる。BSP は、リン酸化および硫酸化を受けた糖タンパク質で、その配列中に RGD 細胞接着配列およびグルタミン酸連続配列を有し、RGD 配列で細胞に接着し、グルタミン酸連続配列でアパタイト結晶に結合する。さらに、骨に転移する乳ガン、前立腺ガン、肺ガン病巣で発現し、ガン局所での異所性石灰化およびガンの骨転移に関与することが報告されている。

BSP の遺伝子プロモーター領域には、転写因子結合配列が多数存在し、その配列中には逆方向の TATA 配列 (-20 塩基対上流) と重複したビタミン D 受容体結合配列 (VDRE)、逆方向の CCAAT 配列 (-50 塩基対上流)、cAMP 応答配列 (CRE; -70 塩基対上流)、FGF2 応答配列 (FRE; -90 塩基対上流)、下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit1; -108 塩基対上流)、ホメオボックス応答配列 (HOX; -190 塩基対上流)、TGF- β 応答配列 (-500 塩基対上流)、グルココルチコイド応答配列 (GRE; -930 塩基対上流) および同配列に重複したアクチベータープロテイン 1 (AP1) 結合配列等が存在する。

Lipopolysaccharide (LPS) は、グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり、多彩な生物活性を発現する。LPS の生理作用発現は、宿主細胞の細胞膜表面に存在する Toll-like Receptor (TLR) を介して行われる。TLR に LPS が結合すると、アダプタータンパク質であるミエロイド系分化因子 88 (Myeloid Differentiation Protein-88、MyD88) を介してセリン/スレオニンキナーゼである IL-1 Receptor Associating Kinase (IRAK) を活性化する。さらに IRAK の下流にあるアダプタータンパク質である TNF Receptor-associated Factor-6 (TRAF-6) を介して炎症反応に関与する NF κ B や MAP キナーゼファミリー等の活性化を引き起こす。

そこで今回我々は、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) から精製した LPS を使用して BSP の遺伝子発現に対する効果を検索した。

【結果】

ROS17/2.8 骨芽細胞様細胞を、0.01 または 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の *P. gingivalis* LPS または *A. actinomycetemcomitans* LPS で刺激後、BSP mRNA 量の変化をノーザンブロットで検索した。0.01 $\mu\text{g/ml}$ の *P. g.* LPS と *A. a.* LPS は、BSP mRNA 量を経時的に増加させ、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の *P. g.* LPS と *A. a.* LPS は、BSP mRNA 量を経時的に減少させた。さらに、0.01 $\mu\text{g/ml}$ の *P. g.* LPS と *A. a.* LPS は、BSP タンパク質量を経時的に増加させ、12 時間後に最大になった。

ルシフェラーゼアッセイの結果、0.01 $\mu\text{g/ml}$ の *P. g.* LPS は、pLUC3 (-116~+60) ルシフェラーゼコンストラクトの転写活性を上昇させたが、それよりも長いコンストラクトの活性は上昇させなかった。一方、0.01 $\mu\text{g/ml}$ の *A. a.* LPS は、pLUC3 (-116~+60)、pLUC4 (-424~+60) および pLUC5 (-801~+60 塩基対) の転写活性を上昇させた。0.1 $\mu\text{g/ml}$ の *P. g.* LPS と *A. a.* LPS は、pLUC3 (-116~+60)、pLUC4 (-424~+60) および pLUC5 (-801~+60 塩基対) の転写活性を減少させた。0.01 および 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の *A. a.* LPS による pLUC3 コンストラクトの転写活性の上昇および減少は、チロシンリン酸化、ERK1/2、PI3 キナーゼおよび活性酸素阻害剤で抑制された。0.01 および 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の *P. g.* LPS による pLUC3 コンストラクトの転写活性の上昇および減少は、チロシンリン酸化、ERK1/2 および活性酸素阻害剤で抑制され、PI3 キナーゼおよび PKA 阻害剤により、0.01 $\mu\text{g/ml}$ の *P. g.* LPS による pLUC3 の転写活性の上昇のみが抑制された。2 塩基対の変異を導入した pLUC3 (-116~+60) および pLUC4 (-424~+60) に対する *P. g.* LPS の効果は、cAMP 応答配列 (CRE) および FGF2 応答配列 (FRE) に変異を導入すると抑制された。一方、*A. a.* LPS の効果は、CRE、FRE およびホメオボックス応答配列 (HOX) 変異を導入すると抑制された。

ゲルシフトアッセイの結果、0.01 または 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の *P. g.* LPS は、CRE および FRE 配列に対する核内タンパク質の結合を経時的に増加または減少させた。一方、0.01 または 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の *A. a.* LPS は、CRE、FRE および HOX 配列に対する核内タンパク質の結合を経時的に増加または減少させた。

【考察】

0.01 $\mu\text{g/ml}$ の *P. g.* LPS または *A. a.* LPS は、BSP の遺伝子発現を増加させ、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の *P. gingivalis* LPS または *A. a.* LPS は、BSP の遺伝子発現を減少させた。また、*P. g.* LPS と *A. a.* LPS の効果は同一ではなく、異なる細胞内情報伝達系を介して BSP の遺伝子発現を調節すると考えられた。

【発表論文】

- 1) Y. Sasaki, S. Wang, Y. Ogata. Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene by CO₂ laser irradiation. J Oral Sci. 53, 51-59, 2011.

- 2) S. Wang, Y. Sasaki, Y. Ogata. Calcium hydroxide regulates bone sialoprotein gene transcription in human osteoblast-like Saos2 cells. *J Oral Sci* 53, 77-86, 2011.
- 3) S. Wang, Y. Sasaki, L. Zhou, H. Matsumura, S. Araki, M. Mezawa, H. Takai, Z. Chen, Y. Ogata. Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene by interleukin-11. *Gene* 476, 46-55, 2011.
- 4) Y. Ogata, H. Takai, Y. Nakayama, M. Fukae. Function of Amelogenins in Periodontal Regeneration Induced by Enamel Matrix Derivative. *J Oral Biosci* 53, 267-274, 2011.
- 5) X. Li , L. Zhou, H. Takai, Y. Sasaki, M. Mezawa, Z. Li, Z. Wang, L. Yang, S. Wang, H. Matsumura, T. Kaneko, A. Yoshimura, Y. Ogata. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates bone sialoprotein gene transcription. *J Cell Biochem* in press

HIV感染症における微生物間相互作用 —酪酸産生常在菌による潜伏感染HIVの再活性化—

名古屋市立大学大学院医学研究科 細胞分子生物

岡本 尚

【目的と意義】

現行の抗 HIV 化学療法は潜伏感染 HIV には無効であるため、潜伏 HIV の複製をコントロールできるか否かが感染者の予後を作用する。近年、クロマチンレベルでの潜伏感染機構が明らかになった。転写抑制因子により HIV-LTR に呼び込まれたヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)は、近傍のヒストンを脱アセチル化することにより抑制型のクロマチンを形成し、HIV の転写を積極的に抑制し潜伏感染を維持する。しかし、感染者体内の潜伏感染がどのような状態で破綻し、HIV 複製が開始されるか不明であった。我々は、多くの成人が罹患している歯周病の原因菌 *Porphyromonas gingivalis* の代謝産物・酪酸が HIV プロモーターのクロマチン構造を変換し潜伏感染 HIV を再活性化することで、歯周病が AIDS 進展の危険因子となる可能性を示した(*J. Immunol.* 2009)。酪酸は腸内細菌の主な代謝産物の一つであることから、本研究では再活性化における腸内細菌の影響、併せて腔内細菌についても検討した。

【結果】

腸内細菌では *Clostridium* 属、*Eubacterium* 属、*Fusobacterium* 属菌株において顕著な HIV 複製と転写活性化が認められた。腔内細菌の *Anaerococcus tetradius* や *Anaerococcus vaginalis*, *Peptoniphilus asaccharolyticus* なども再活性化を誘導した。活性化の認められた細菌の培養上清からは高濃度の酪酸が検出され、その量は HIV 複製能と相関していた。酪酸には HDAC 阻害作用があること知られているので詳細な分子機構を検討した。その結果、酪酸産生菌の上清はヒストンのアセチル化を促進することにより LTR を転写レベルで活性化した。また、ChIP assay の結果、上清処理により HDAC と転写抑制因子の LTR からの遊離と、ヒストンのアセチル化や PolIII の LTR へのリクルートなどが認められた。HIV の活性化とヒストンのアセチル化は、酪酸を除去した培養上清においては認められなかった。以上の結果、酪酸産生菌は HIV LTR のヒストンアセチル化を促進する事で区以上の結果、酪酸産生菌は HIV LTR のヒストンアセチル化を促進

することでクロマチン構造を「不活性化型」から「活性化型」に変換し、HIVの転写と複製を促進することがわかった(*Cell. Mol. Life Sci.* 2012)。

【考察】

腸管や膣などHIV感染症において重要な器官内の常在菌が潜伏感染HIVを再活性化することが明らかとなった。酪酸が直接HIVゲノムに作用している点は、「微生物間相互作用」の観点から興味深い。HIV感染の初期段階において、腸管粘膜下でのウイルスの爆発的な増殖に腸内細菌が関与することが報告されている。また、*Anaerococcus vaginalis* 等による膣炎がAIDS進展に関わっている事も知られており、これらの菌がHIV伝播と感染定着に大きな影響を及ぼしている可能性が示唆される。これまでの報告とわれわれの研究成果を考え合わせると、細菌感染症が日和見感染の病原体であると同時にHIVの増殖を促すという負の連鎖をつくり、AIDSの病態を更に悪化させていくことが考えられる。その分子機構を解明し制御することは、新しい治療と予防法の開発に直接つながるものと考えられる。このようなヒト体内における「微生物間相互作用」の中に新たな研究の芽が潜んでいる可能性がある。

【発表論文】

- 1) Tan Gana NH, Victoriano AF, Okamoto T. Evaluation of online miRNA resources for biomedical applications. *Genes Cells.* 17(1):11-27. 2011.
- 2) Victoriano AF, Okamoto T. Transcriptional control of HIV replication by multiple modulators and their implication for a novel anti-viral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 28(2):125-38. 2011.
- 3) Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Victoriano AF, Kurimoto E, Kato K, Okamoto T. Functional characterization of human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation. *J Mol Biol.* 410:887-895. 2011.
- 4) Gao N, Hibi Y, Cueno M, Asamitsu K, Okamoto T. A-kinase-interacting protein 1 (AKIP1) acts as a molecular determinant of PKA in NF-kappaB signaling. *J Biol Chem.* 285:28097-104. 2010.
- 5) Tanaka K, Asamitsu K, Uranishi H, Iddamalgoda A, Ito K, Kojima H, Okamoto T. Protecting skin photoaging by NF-kappaB inhibitor. *Curr Drug Metab.* 11:431-435. Review. 2010.

- 6) Zineldeen DH, Uranishi H, Okamoto T. NF-kappa B signature on the aging wall. *Curr Drug Metab.* 11:266-75. Review. 2010.
- 7) Cueno ME, Hibi Y, Imai K, Laurena AC, Okamoto T. Impaired plant growth and development caused by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *Transgenic Res.* 19:903-913. 2010.
- 8) Tsuchiya A, Imai K, Asamitsu K, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T, Okamoto T. Inhibition of inflammatory cytokine production from rheumatoid synovial fibroblasts by a novel IkappaB kinase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 333:236-243. 2010

歯周病原性細菌による動脈硬化誘発機序の解明

落合 智子

日本大学松戸歯学部 口腔免疫学

【目的】

慢性炎症性感染症である歯周病は、*Porphyromonas gingivalis*(P. g.)などの特定の細菌が増殖し、炎症が進行することにより歯の支持組織が破壊される疾患である。近年の疫学的研究によりアテローム性動脈硬化の進展に歯周病原菌感染の関与が指摘されている。また、ヒトの動脈硬化プラークから歯周病原性細菌の存在が確認されており、歯周病もリスクファクターであることが示唆されている。今回本研究グループは、P. g. や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a.)等の歯周病原性細菌がどのような機序で動脈硬化の発症・進展に関わっているかを ApoE ノックアウトマウスを用いて検討した。また歯周病原菌感染が血管内皮細胞の機能不全にどのような影響を与えているかをヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討した。

【方法及び結果】

自然発症 ApoE 欠損(SHL: Spontaneously hyperlipidemic)マウス (8-10 週令) に A. a. HK1651 株生菌、A. a. LPS 及びコントロールとして PBS を週 3 回、経静脈投与した。大動脈組織からの定量 PCR により Toll like receptor(TLR) や Nod like receptor (NLR)発現の比較を行うと共に、動脈硬化病巣形成を Oil red O 染色により計測した。更に、A. a. 感染における血中酸化 LDL 量測定、大動脈起始部の 4HNE 染色、ox-LDL 染色、TUNEL 染色を行った。更に大動脈組織からの定量 PCR により Toll like receptor (TLR)、炎症マーカー並びに酸化ストレス関連遺伝子の発現解析を行った。A. a. 生菌、死菌、LPS 接種群ではコントロール群に比較して大動脈起始部の病変部面積の増大が認められた。更に TLR2 発現は A. a.生菌接種群で、TLR4 及び NOD1 発現は全ての感染群で増加した。また、A. a.感染群においては血中酸化 LDL や組織の酸化ストレスの増加、LOX-1, NAD(P)H oxidase の発現増加が認められた。更に In vitro 実験から P. g. 感染により HUVEC のアポトーシス誘導機構が示唆された。

【考察】

A. a. 等の歯周病原性細菌及びその代謝産物は、TLR や NLR の発現増加を介して動脈硬化の進展に寄与しているものと推測された。更に LOX-1 や

NAD(P)H oxidase 発現の増強を介して LDL の酸化を促進しているものと示唆された。In vitro の結果から P. g. や A. a. は単球からの ROS 産生を介して血管内皮細胞にアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

【発表論文】

- 1) Zhang, T., Kurita-Ochiai, T., Hashizume, T., Oguchi, S., Abiko, Y., Yamamoto, M. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in spontaneously hyperlipidemic mice. *Int.J.Oral-Med.Sci.* 8(3):132-141,2010.
- 2) Tanaka, H., Hashizume, T., Abiko, Y., Sewaki, T., Nozaki, C., Kurita-Ochiai, T., Makimura, M., Yamamoto, M. T helper cytokine responses elicited by nasal immunization with heat-killed recombinant lactobacillus casai expressing outer membrane protein of porphyromonas gingivalis. *Int.J.Oral-Med.Sci.*9(1):11-16, 2010.
- 3) Hashizume, T., Tanaka, S., Kaminogawa, S., Hosono, A., Kataoka, K., Shinozaki-Kuwahara, N., Kweon, M. N., Kurita-Ochiai, T., Yamamoto, M. Mucosal Immunity in CD4-Deficient mice: Direct evidence for mucosal IgA antibody responses. *Int. J. Oral-Med. Sci.* 8(3):151-156, 2010.
- 4) Hashizume, T., Kurita-Ochiai, T., Mikuni, D., Kawanabe, K., Kanamaru, S., Yamamoto, M. Effect of Porphyromonas gingivalis on human umbilical vein endothelial cells. *Int. J. Oral-Med. Sci.* 8(3):157-161, 2010.
- 5) Liu C., Hashizume T., Kurita-Ochiai T., Fujihashi K., Yamamoto M. Oral immunization with Porphyromonas gingivalis outer membrane protein and CpG oligodeoxynucleotides elicits T helper 1 and 2 cytokines for enhanced protective immunity. *Mol. Oral Microbiol.* 25(3):178-189, 2010.
- 6) Zhang T., Kurita-Ochiai T., Hashizume T., Du Y., Oguchi S., Yamamoto M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59(2):143-151, 2010.
- 7) Watanabe K., Hashizume T., Kurita-Ochiai T., Akimoto Y. and Yamamoto M. Nasal administration of glucosyltransferase-I of streptococcus sobrinus without adjuvant induces protective immunity. *Journal of Vaccines & Vaccination* 1:doi:10.4172/2157-7560.1000109, 2010.
- 8) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. Butyric acid induces apoptosis via oxidative stress in Jurkat T-cells. *J. Dent. Res.* 89(7):689-694, 2010.
- 9) Du, Y., Hashizume, T., Kurita-Ochiai, T., Yuzawa, S., Abiko, Y., and Yamamoto, M. Nasal immunization with a fusion protein consisting of the hemagglutinin a

antigenic region and the maltose-binding protein elicits CD11c+ CD8+ dendritic cells for induced long-term protective immunity. *Infect. Immun.* 79(2):895-904, 2011.

- 10) Hashizume, T., Kurita-Ochiai, T., Yamamoto, M. Porphyromonas gingivalis stimulates monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbio.* 62(1):57-65, 2011.
- 11) Ochiai, K., Imai, K., Tamura, M. and Kurita-Ochiai ,T. Butyric acid effects in the development of periodontitis and systemic diseases. *J. Oral. Biosci.* inpress,2011.
- 12) Watanabe, K., Hashizume, T., Kurita-Ochiai, T., Akimoto, Y. and Yamamoto, M. T helper cytokine responses induced by nasal immunization with glucosyltransferase-I of streptococcus sobrinus. *Int. J. Oral-Med. Sci.* 9(3):227-233, 2011.
- 13) Du, Y., Hashizume, T., Kurita-Ochia, T., Yuzawa, S., Abiko, Y. and Yamamoto, M. A fusion protein of the hemagglutinin A antigenic region of Porphyromonas gingivalis and maltose-binding protein induces antibody responses in the oral cavity. *Int. J. Oral-Med. Sci.* 9(3):182-189, 2011.

顆粒球の活性化に関する比較免疫学的研究

伊藤 琢也

日本大学生物資源科学部 動物医科学研究センター

【目的】

ヒトの好中球をはじめとする貪食細胞の細胞膜表面には、G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の一種である N-ホルミルペプチド受容体 (FPR) が存在している。FPR およびその類縁受容体は、各種疾患や感染症で生じる同ペプチドや各種の生体内リガンドを感知し、白血球集族のための走化性およびそれに続く炎症反応を惹起する初期感染防御の主要因子である。演者らは、これまでに FPR の発現様相が動物種によって大きく異なることを示唆する結果を得ている。すなわち、ヒトに比べてマウス好中球の FPR と N-ホルミルペプチド (fMLF) の結合性は弱く (*Clin. Vaccine Immunol.* 2006)、また fMLF をリガンドとして認識できない好中球や顆粒球を有する動物種も報告されている (*J. Vet. Med. Sci.* 2002)。このようにヒトにおける初期感染防御に不可欠と考えられている FPR は、他の哺乳類では生体防御に関与していないか、あるいは全く別の受容体として機能している可能性がある。そこで本研究は、インフルエンザや狂犬病等、ヒトの致死性感染症のモデル動物となっているフェレット、水棲環境に適応進化した特異な哺乳動物であるイルカ、および独特な FPR の発現動態を有するウマについて、それぞれの好中球を含む顆粒球における FPR 介在性の細胞活性化および FPR の発現について比較免疫学的に検討した。

【結果】

末梢血から密度勾配遠心法によって分離した各種動物の好中球または顆粒球は、細菌由来ペプチドである fMLF およびその誘導體、オプソニン化ザイモザン (OZ)、リコンビナント IL-8、または protein kinase C の特異的アクチベーターである PMA 等の様々な因子によって刺激し、分離した細胞の活性化は細胞膜上の NADPH oxidase 活性を反映する活性酸素産生量、またはリガンド等の走化性因子に対する遊走能の測定によって評価した。

フェレットの好中球はヒト好中球と同様に PMA および OZ によって活発に活性酸素を産生したが、ヒト好中球の強力な刺激誘導剤である fMLF はいずれの濃度でもフェレット好中球の活性酸素産生を誘導しなかった。走化性についても演者らが作製したフェレット IL-8 およびザイモザン処理血清 (ZAS) はフェレット好中球の走化性を強力に誘導したが、fMLF は遊走を惹起できなかった。フ

ローサイトメトリーによる蛍光標識ホルミルペプチドとフェレット好中球との結合は確認できなかったことから、フェレット好中球には FPR が存在しないことが示唆された^{1),5)}。

ハンドウイルカの顆粒球は ZAS に対して強い走化性を示し、遊走細胞のほぼ 100% が好中球であった。さらに、イルカ IL-8 はハンドウイルカ好中球の走化性を強く誘導した。一方、ハンドウイルカ好中球はフェレットと同様に fMLF およびその誘導体のいずれに対しても走化性を示さなかった。結合試験によってハンドウイルカ好中球も FPR を欠くことが確認され、その結果は LPS によるプライミング後も変わらなかった。

ウマの顆粒球は LPS との前培養によって細胞表面に FPR を発現することが知られている。そこでウマ顆粒球における FPR の遺伝子発現を調べたところ、LPS によるプライミング後にその発現が確認できた。ウマ顆粒球 FPR の遺伝子発現は、LPS と同様に高強度運動によって血中および筋肉内に大量に蓄積する乳酸によっても強く誘導されたことから、乳酸はウマ顆粒球の活性化に重要な役割を果たすことが示唆された。また LPS または乳酸によるプライミング後に fMLF が誘導するウマ顆粒球の活性酸素産生は増強された¹³⁾。

【考察】

ヒトにおいて重要な炎症発動機序とされる白血球膜上の GPCR である FPR の発現および各種リガンドとの結合は、動物種によっては全く確認できない例やプライミングによって厳密に制御されている場合があることが判明した。炎症は口腔をはじめとする各種疾患や様々な原因で生じる感染症における共通病態である。ヒト疾患における炎症病態を実証する場合には疾患モデルとなる実験動物の利用が不可欠であるが、ヒトとモデル動物の生体防御機構の共通性と独自性については整理されないまま動物実験のデータをそのままヒトに外挿する場合がある。本研究を発展させることは、各種哺乳動物における精確な生体防御機構の理解、およびヒトにおける炎症病態を適確に反映する動物モデルの提供に貢献すると考えられる。

【発表論文】

- 1) Nakata M, Otsubo K, Kikuchi T, Itou T, Sakai T. (2010) Chemotactic properties and absence of the formyl peptide receptor in ferret (*Mustela putorius furo*) neutrophils. *Res Vet Sci.*, 88(1), 56-60. 無
- 2) Itou T, Koie H, Segawa T, Kato M, Yanagisawa M, Ueda K, Kuwano R, Suzuki M, Moritomo T, Sakai T. (2010) Bone marrow biopsy from the flipper of a dolphin. *Vet J.*, 185(2), 216-217. 無

- 3) Hirano S, Itou T, Carvalho AA, Ito FH, Sakai T. (2010) Epidemiology of vampire bat-transmitted rabies virus in Goiás, central Brazil: re-evaluation based on G-L intergenic region. *BMC Res Notes*, 3:288. 無
- 4) Cunha EM, Nassar AF, Lara MC, Villalobos EC, Sato G, Kobayashi Y, Shoji Y, Itou T, Sakai T, Ito FH. (2010) Pathogenicity of different rabies virus isolates and protection test in vaccinated mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 52(5), 231-236. 無
- 5) Nakata M, Kozue Y, Itou T, Sakai T. Expression of biologically active recombinant ferret (*Mustela putorius furo*) interleukin-8 from *Escherichia coli*. (2010) *Vet Immunol Immunopathol.*, 138(1-2), 114-117. 無
- 6) Hirano S, Sato G, Kobayashi Y, Itou T, Rong Luo T, Liu Q, Jin NY, Xuan X, Sakai T. (2010) Analysis of Chinese rabies virus isolates from 2003-2007 based on P and M protein genes. *Acta Virol.*, 54(2), 91-98. 無
- 7) Saitou Y, Kobayashi Y, Hirano S, Mochizuki N, Itou T, Ito FH, Sakai T. (2010) A method for simultaneous detection and identification of Brazilian dog- and vampire bat-related rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods*, 168(1-2), 13-17. 無
- 8) Kobayashi Y, Suzuki Y, Itou T, Carvalho AA, Cunha EM, Ito FH, Gojobori T, Sakai T. (2010) Low genetic diversities of rabies virus populations within different hosts in Brazil. *Infect Genet Evol.*, 10(2), 278-283. 無
- 9) Kobayashi Y, Suzuki Y, Itou T, Ito FH, Sakai T, Gojobori T. (2010) Evolutionary history of dog rabies in Brazil. *J Gen Virol.*, 92(Pt 1), 85-90. 無
- 10) Hirano S, Itou T, Shibuya H, Kashiwazaki Y, Sakai T. (2010) Molecular epidemiology of rabies virus isolates in Uganda. *Virus Res.*, 147(1), 135-138. 無
- 11) Echigoya Y, Okabe H, Itou T, Endo H, Sakai T. (2011) Molecular characterization of glycogen synthase 1 and its tissue expression profile with type II hexokinase and muscle-type phosphofructokinase in horses. *Mol Biol Rep.*, 38(1), 461-469. 無
- 12) Segawa T, Itou T, Echigoya Y, Suzuki M, Koie H, Sakai T. (2011) Molecular cloning and expression of bottlenose dolphin CD34. *Vet Immunol Immunopathol.*, 139(2-4), 303-307. 無
- 13) Echigoya Y, Morita S, Itou T, Sakai T. Effects of extracellular lactate on production of reactive oxygen species by equine polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. *Am J Vet Res.* (In press)

歯周組織および唾液腺における炎症発症と修復機序

杉谷 博士

日本大学生物資源科学部 獣医生化学研究室

【目的】

口腔は食物を摂取する消化管の入り口として重要な機能を有する器官である。機能としては咀嚼といった運動機能や、味覚などの感覚機能、唾液による消化機能などが統合して口腔機能を維持している。歯やそれを維持する歯周組織の破綻や唾液の機能が損なわれることにより、口腔環境は損なわれ、口腔機能の維持は難しくなる。われわれの研究は、歯周組織および唾液分泌を担う唾液腺における炎症発症とその修復機序を明らかにすることにより、口腔機能維持を図るものである。

Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)は stromelysin-1 と呼ばれ、細胞外基質を幅広く分解するプロテアーゼとして知られている。歯髄の断髄後や窩洞形成後に MMP-3 発現が亢進することや、ラット歯髄の断髄後に MMP-3 で覆髄すると血管新生および硬組織形成が促進され、歯髄の創傷治癒が促進されることが報告されている。今回はヒト歯髄培養細胞において MMP-3 の効果について検討した。

一方、唾液分泌低下の原因として唾液腺細胞のアポトーシスが関与することが考えられている。今回は、ラット唾液腺の1つである耳下腺腺房細胞をアクチン安定化剤で処理をすることによりアポトーシスが認められたことを報告する。

【結果】

ヒト歯髄培養細胞を MMP-3 で刺激すると、細胞の遊走が促進された。創傷治癒や血管新生に関わる因子である CNN ファミリーに属する Connective tissue growth factor/CCN2 (CTGF/CCN2)の特異抗体で処理をすると、MMP-3 の効果は抑制された。CTGF/CCN2 mRNA およびタンパク質の発現と分泌に対する MMP-3 の効果を検討したところ、促進効果が認められた。MMP-3 の活性阻害剤ではこの効果の抑制は認められなかった。MMP-3 による CTGF/CCN2 タンパク質の発現は、dynamin 阻害薬である dynasore により抑制された¹⁾。

ラット耳下腺腺房細胞をアクチン安定化剤である jasplakinolide 処理により細胞の萎縮、水疱形成、膜の断片化、核の断片化など形態的なアポトーシスの特徴が今日商店レーザー顕微鏡および電子顕微鏡観察により観察され、さらに生化学的に DNA ラダーが認められた。jasplakinolide 処理細胞においては、ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激による K⁺分泌およびβアドレナリン受容体刺

激によるアミラーゼ分泌の減少が認められた²⁾。

【考察】

ヒト歯髄培養細胞において、MMP-3がCTGF/CCN2発現を惹起し、それを分泌し、細胞遊走を促進したことから、CTGF/CCN2を介して創傷治癒に関わることが示唆された。また、そのMMP-3の作用は、MMP-3がもつプロテアーゼ活性には非依存的であり、さらに、dynamin依存的なエンドサイトーシスがCTGF/CCN2発現に関わることも示唆された。これらの結果から、MMP-3が歯髄細胞において外部シグナルとして機能することが考えられる。

一方、唾液腺研究においては、アクチン安定化剤がアポトーシスを引き起こしたことから、アクチンの動態が唾液腺細胞のアポトーシス誘発に関わることが示唆された。また、アポトーシスを起こした細胞においては、ムスカリン性および β 受容体を介する調節性の唾液分泌が抑制されることが明らかとなり、唾液分泌機能低下に関わることが考えられる。

【発表論文】

- 1) Muromachi K, Kamio N, Narita T, Annen-Kamio M, Sugiya H, Matsushima K. MMP-3 provokes CTGF/CCN2 production independently of protease activity and dependently on dynamin-related endocytosis, which contributes to human dental pulp cell migration. *J Cell Biochem.* 113(4):1348-1358, 2012.
- 2) Matsuki-Fukushima M, Hashimoto S, Murakami M, Ogata Y, Fujita-Yoshigaki J, Narita T, Sugiya H. The actin-specific reagent jasplakinolide induces apoptosis in primary rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol.* 57(5): 567-576, 2012.(無)
- 3) Nakao S, Moriyama S, Segawa M, Guo MY, Sugiya H. C2-ceramide inhibits the prostaglandin E2-induced accumulation of cAMP in human gingival fibroblasts. *Biomed Res.* 31(2):97-103, 2010. (無)
- 4) Guo M-Y, Satoh K, Qi B, Narita T, Katsumata-Kato O, Matsuki-Fukushima M, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H. Thiol-oxidation reduces the release of amylase induced by β -adrenergic receptor activation in rat parotid acinar cells. *Biomed Res* 31(5):293-299, 2010. (無)
- 5) Qi B, Narita T, Satoh K, Guo MY, Katsumata-Kato O, Murakami M, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H. Characteristics of neurokinin A-induced salivary fluid secretion in perfused rat submandibular gland. *Arch Oral Biol.* 55(10):737-44, 2010. (無)
- 6) Mitsui R, Fujita-Yoshigaki J, Narita T, Matsuki-Fukushima M, Satoh K, Qi B, Guo MY, Katsumata-Kato O, Sugiya H. Maintenance of paracellular barrier function by insulin-like growth factor-I in submandibular gland cells. *Arch Oral Biol.* 55(12):963-969, 2010. (無)

パネト細胞が分泌する α ディフェンシンによる自然免疫と腸内環境

綾部時芳、中村公則

北海道大学大学院先端生命科学研究院 細胞生物科学分野

【目的】

抗菌ペプチドは宿主の自然免疫における主要なエフェクターのひとつである。われわれは、小腸上皮細胞であるパネト細胞（Paneth cell）が産生し分泌する抗菌ペプチドである α ディフェンシンが腸管自然免疫に重要な役割を果たしていることを示してきた。本研究の目的は、口腔と腸管の自然免疫機構のクロストークを解析し、両者のリンクによる口腔内環境及び腸内環境の維持と破綻への関与を解明することである。さらに、それらが関連する難治性全身疾患の予防法や治療法確立の可能性を検討する。

【結果】

マウス小腸から陰窩（crypt）を単離し、 α ディフェンシン（クリプチン；cryptdin）の遺伝子発現定量解析及び抗クリプチン抗体を用いた免疫組織化学的解析を行ったところ、クリプチン遺伝子発現は十二指腸に比べて回腸で有意に高く、またクリプチン抗体反応陽性を示すパネト細胞は十二指腸に比べて回腸で有意にその数が多かった。次に、正常腸内細菌叢を形成する各種細菌とパネト細胞 α ディフェンシンによる共生への関与を検討した。高次構造の異なる酸化型クリプチン及び還元型クリプチンともに病原菌などの非常在菌に対して濃度依存的で強力な *in vitro* 殺菌活性を認めた。これに対して、酸化型クリプチンは一部の常在菌に対してはほとんど殺菌活性を示さなかった³⁾。すなわち、還元型クリプチンは酸化型クリプチンに比べて常在菌に対する殺菌活性が有意に強かった^{3,4)}。

口腔内環境と腸内環境のクロストークを明らかにするために、パネト細胞からの顆粒分泌機構を検討した。マウス単離小腸 crypt に *Salmonella enterica* serovar Typhimurium などの細菌由来物質を 37°C で 30 分暴露した後、上清を採取した。回収した上清を 30% 酢酸で処理した分画を得て、パネト細胞分泌物の殺菌活性をわれわれの既報で解析したところ、病原菌に対する殺菌活性を認めた⁴⁾。さらに、口腔細菌の腸管への影響を解析するために、マウス上皮細胞の初代培養により上皮細胞株の樹立について検討した。胎生 17 日の CD1 マウスから小腸組織を採取し、EGF、R-Spondin 等を添加した DMEM-10%FBS 培養液で培養した。培養 5 日後に、サイトケラチン陽性、E カドヘリン陽性の上皮細胞様の細胞が認

められた。これらの細胞群を限界希釈法にてクローニングして解析中である。

【考察】

パネト細胞は α ディフェンシンを含む顆粒を小腸内腔に分泌して殺菌することによって腸内自然免疫に貢献している。最近、 α ディフェンシンが腸内細菌の組成決定に関与していることがわかってきた。われわれは、クリプチンが病原菌を強く殺菌する一方で、常在菌にはほとんど殺菌活性を示さず、選択的な殺菌活性を持つことを明らかにし、クリプチンのジスルフィド結合の有無が殺菌活性を制御していることを示した。腸内細菌の組成が変わることや、異常な細菌が腸内に出現することは様々な疾病の発症リスクや病態増悪要因となることが知られてきた。クローン病、潰瘍性大腸炎や肥満などで発症や病態に腸内細菌が重要な役割を果たすことが知られている^{1),2),5)}。パネト細胞及び α ディフェンシンの異常によって腸内環境の恒常性破綻が生じる可能性を示した。本研究は、口腔内環境と腸内環境の接点を解析して、当該クロストーク機構の存在を明らかにしようとするものであり、全身性難治疾患の本態を理解する新たなパラダイムに直結することが強く示唆された。寄生体である口腔内細菌及び腸内細菌叢、宿主のパネト細胞が担当する自然免疫、経口摂取される食品や微生物など外来物質の3者による「腸内環境」という新たなパラダイムから、パネト細胞が分泌する α ディフェンシンの重要性をさらに明らかにしたい。

【発表論文】

- 1) Ishikawa C, Tanabe H, Maemoto A, Ito T, Watari J, Kono T, Fujiya M, Ashida T, Ayabe T, Kohgo Y (2010) Precursor processing of human defensin-5 is essential to the multiple functions in vitro and in vivo. *J Innate Immun* 2, 66-76. (無)
- 2) Inaba Y, Ashida T, Ito T, Ishikawa C, Tanabe H, Maemoto A, Watari J, Ayabe T, Mizukami Y, Fujiya M, Kohgo Y (2010) Expression of the antimicrobial peptide α -defensin/cryptdins in intestinal crypts decreases at the initial phase of intestinal inflammation in a model of inflammatory bowel disease, IL-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 16, 1488-1495. (無)
- 3) Masuda K, Sakai N, Nakamura K, Yoshioka S, Ayabe T (2011) Bactericidal activity of mouse α -defensin, cryptdin-4 predominantly affects non-commensal bacteria. *J Innate Immun* 3, 315-326. (無)
- 4) Masuda K, Nakamura K, Yoshioka S, Fukaya R, Sakai N, Ayabe T (2011) Regulation of microbiota by antimicrobial peptides in the gut. *Adv Otorhinolaryngol* 72, 97-99. (無)
- 5) Sato Y, Tomisawa S, Aizawa T, Sakai N, Kamiya M, Kikkawa T, Kumaki Y, Demura M, Ayabe T, Kawano K (2012) Construction of a novel expression system for cryptdin-4 by using inclusion body formation. *Peptide Science* 2011 pp393-394. (無)

歯周病の EBV 感染促進と唾液腺障害

齋藤 一郎

鶴見大学歯学部 病理学講座

【目的】

EB ウイルスは各種のリンパ腫、上咽頭癌、胃癌、乳癌などの癌化への関与も良く知られているが、その活性化との関連が報告されている疾患として、伝染性単核症、慢性活動性 EBV 感染症、シェーグレン症候群 (SS) や全身性エリテマトーデス、関節リウマチなどの自己免疫疾患、さらに慢性疲労症候群などがあげられ、全身疾患との関連が報告されている。

この様に EB ウイルスの再活性化により病態が形成される可能性が示唆されているものの、生体内でその再活性化を誘導する機序は不明である。一方、ブチル酸は培養細胞に対し遺伝子発現や DNA 複製等を制御するほかにウイルス遺伝子発現を直接あるいは間接的に制御する事が知られている。特に、EB ウイルスでは感染 B 細胞をブチル酸で刺激することで溶解感染関連遺伝子の発現が誘導される。

以上のことより、本研究では B 細胞および唾液腺上皮細胞において、*in vitro* で歯周病菌により産生されるブチル酸により EB ウイルスが再活性化される事を検討する。

さらにシェーグレン症候群を始めとする自己免疫疾患は更年期以降の女性に高い発症率を認められ、エストロゲンの関連が推測されていることから、歯周病菌由来のブチル酸による EB ウイルス再活性化へのエストロゲンの影響を検討する。

【結果】

唾液腺上皮細胞における EB ウイルスの再活性化を検討する目的で、ヒト唾液腺上皮細胞株の HSY を用いて検討を行った。平成 22 年度に作成したプロモータープラスミドを HSY 細胞株にリポフェクタミン試薬を用いて遺伝子導入し、ブチル酸によるプロモーター活性を検討した。その結果、唾液腺上皮細胞では B 細胞株に比べてブチル酸により高いプロモーター活性を得る事ができた。また、唾液腺上皮細胞内で EB ウイルスが BZLF1 の転写に伴いウイルス複製が誘導されるか否かを確認するために、唾液腺上皮細胞への EB ウイルス感染を試みた。HSY 細胞に EB ウイルスの受容体として知られる CD21 の発現ベクターを作成し、遺伝子導入することで CD21 発現 HSY 細胞を得た。この細胞と EB 陽性 B 細胞株で

ある Akata 細胞を共培養し、EB ウイルスの感染を試みたが、EB ウイルスゲノムを有する細胞は得られなかった。

【考察】

EB ウイルスは通常唾液を介して、口腔や咽頭の粘膜上皮細胞および唾液腺上皮細胞に感染し潜伏感染状態を維持している。このため、EB ウイルスは口腔内細菌由来の因子に暴露されやすい状況にある。今回の検討により、唾液腺上皮細胞内で EB ウイルスは嗜酒細菌由来のブチル酸に曝露されることで再活性化を起こす可能性が示唆された。EB ウイルスの再活性化は自己免疫疾患の発症との関連が示唆されているが、生体内での再活性化誘導因子は不明であった。我々は最近、本課題で作成したプロモータープラスミドを用いて唾液中に含まれるダイオキシ受容体活性化因子が EB ウイルスの再活性化を誘導し、シェーグレン症候群の発症に関与している可能性を報告した(1)。この報告でシェーグレン症候群患者の唾液中に含まれる EB ウイルス再活性化誘導因子と自己抗体の値に相関が認められることを明らかにし、唾液腺を含む口腔内における EB ウイルス再活性化因子が自己免疫疾患の病態形成に関与していることが示唆された。歯周病とシェーグレン症候群の関与については未だ報告をみないが、今後さらに検討を重ね、歯周病菌由来のブチル酸による EB ウイルス再活性化とシェーグレン症候群病態形成への関与について明らかにしていきたい。

【発表論文】

- 1) Inoue, H., Mishima, K., Yamamoto-Yoshida, S., Ushikoshi-Nakayama, R., Nakagawa, Y., Yamamoto, K., Ryo, K., Ide, F., and Saito, I. 2012. Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of EBV Reactivation as a Risk Factor for Sjogren's Syndrome. *J Immunol* 188:4654-4662.
- 2) Imai, K., Inoue, H., Tamura, M., Cueno, M.E., Takeichi, O., Kusama, K., Saito, I., and Ochiai, K. 2012. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie* 94:839-846.
- 3) Shimozuma, M., Tokuyama, R., Tatehara, S., Umeki, H., Ide, S., Mishima, K., Saito, I., and Satomura, K. 2011. Expression and cellular localization of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. *Histochem Cell Biol* 135:389-396.
- 4) Ryo, K., Ito, A., Takatori, R., Tai, Y., Arikawa, K., Seido, T., Yamada, T., Shinpo, K., Tamaki, Y., Fujii, K., et al. 2011. Effects of coenzyme Q10 on salivary secretion. *Clin Biochem* 44:669-674.
- 5) Okada, N., Kawakita, T., Mishima, K., Saito, I., Miyashita, H., Yoshida, S.,

- Shimmura, S., and Tsubota, K. 2011. Clusterin promotes corneal epithelial cell growth through upregulation of hepatocyte growth factor by mesenchymal cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:2905-2910.
- 6) Inoue, H., Giannakopoulos, S., Parkhurst, C.N., Matsumura, T., Kono, E.A., Furukawa, T., and Tanese, N. 2011. Target genes of the largest human SWI/SNF complex subunit control cell growth. *Biochem J* 434:83-92.
 - 7) Yamada, T., Ryo, K., Tai, Y., Tamaki, Y., Inoue, H., Mishima, K., Tsubota, K., and Saito, I. 2010. Evaluation of therapeutic effects of astaxanthin on impairments in salivary secretion. *J Clin Biochem Nutr* 47:130-137.
 - 8) Miyamoto, S., Cooper, L., Watanabe, K., Yamamoto, S., Inoue, H., Mishima, K., and Saito, I. 2010. Role of retinoic acid-related orphan receptor-alpha in differentiation of human mesenchymal stem cells along with osteoblastic lineage. *Pathobiology* 77:28-37.
 - 9) Kumasaka, S., Shimosuma, M., Kawamoto, T., Mishima, K., Tokuyama, R., Kamiya, Y., Davaadorj, P., Saito, I., and Satomura, K. 2010. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. *Histochem Cell Biol* 133:577-584.

菌代謝産物存在下における口腔常在細菌の生残とバイオフィーム形成

泉福 英信

国立感染症研究所 細菌第一部

【目的】

口腔には 700 種類以上の微生物が住みつき、お互いの微生物が相互作用しながら微生物叢を形成している。中でも主要な菌である Streptococci や Acitinomyces は、口腔にバイオフィームを形成して生き残ろうとしている。口腔は、食事により多量の栄養物が摂取される。それらの栄養物が微生物にとって栄養源となり、長期に生き続けて行く大きな理由となっている。微生物は栄養物を自分たちのエネルギーに変えると同時に代謝産物を外に放出する。乳酸や酪酸、過酸化水素など多くの種類の代謝産物が産生され、その代謝産物に影響を受け、口腔微生物の増殖やバイオフィーム形成に変化をもたらす。本研究では、歯周病性細菌が放出する代謝産物である酪酸に着目し、*Streptococcus mutans* や *Acitinomyces naeslundii* のバイオフィーム形成にどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的とした。

【結果】

この酪酸は口腔の生理的濃度 6.25 mM で、96 穴マイクロタイタープレート上の 0.25% 砂糖を含んだ Tryptic soy broth without dextrose 培地による *Actinomyces naeslundii* のバイオフィーム形成を上昇させた。この効果は、ストレス蛋白質の発現量 (GroEL, GrpE) に影響を与え、それらの発現が直接バイオフィーム形成に作用していることが明らかとなった。*Streptococcus mutans* に対しては、酪酸の特異的効果というよりも酸性効果によるストレス応答によりクオラムセンシングシステム (ComCDE 依存) が動き出し、その結果死菌体の誘導、菌体外へ DNA の放出が起こり、バイオフィーム形成に影響を与えていることが明らかとなった。このバイオフィーム形成の上昇は、DNase により障害されることも明らかとなった。

【考察】

歯周病性細菌が放出する酪酸を含む代謝産物は、歯表面にバイオフィームを形成する菌に対してシグナル応答の活性化の結果、様々な遺伝子や分子の発現を誘導し、口腔バイオフィーム形成の病原性に影響を与えていることが考えられた。このことは、代謝産物を介した微生物の相互作用が口腔における微生物

の病原性発現に重要に関与していることを示唆している。また、近年問題となっている要介護高齢者における口腔の日和見菌の感染増加が、複合微生物による代謝産物の多様性に寄与することになり、これらのことが口腔から全身感染症への橋渡しに関与している可能性が考えられた。

【発表論文】

- 1) Narisawa N, Kawarai T, Suzuki N, Sato Y, Ochiai K, Ohnishi M, Watanabe H, and Senpuku H. (2011) Competence-dependent endogenous DNA rearrangement and uptake of extracellular DNA gives a natural variant of *Streptococcus mutans* without biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 193: 5147-5154.
- 2) Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, and Senpuku H. (2011) Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. *PloS ONE*. 6: e26163.
- 3) Ito T, Maeda T, Senpuku H. (2012) Roles of salivary components in *Streptococcus mutans* colonization in a new animal model using NOD/SCID.*e2f1*⁻ mice. *PLoS ONE*. 7: e32063.

高齢者の口腔細菌叢と全身の健康に関する研究

山下 喜久

九州大学大学院歯学研究院 口腔保健推進学講座口腔予防医学分野

【目的】

嚥下・咳反射の低下によって誤嚥を繰り返す高齢者では、口からの摂食を止めて胃瘻等の経管栄養法を施行する例が近年急増している。一方で、咀嚼・嚥下等の生理作用が失われた口腔では、唾液や食物による物理的な自浄作用や唾液に含まれる抗菌物質の作用が低下することで、口腔常在細菌種の構成が大きく変化すると考えられる。しかし、経管栄養が口腔フローラに及ぼす影響に着目した研究はこれまでのところ見あたらない。本研究では経管栄養法施行を受けている高齢者の口腔フローラの特徴を解明し、さらにその全身の健康状態に及ぼす影響の解明を目指した。

【結果】

2つの病院と1つの介護施設に入所中の65歳以上の寝たきりの高齢者を対象に、経管栄養者44名と経口栄養者54名の口腔細菌叢を16S rRNA遺伝子解析によって比較した。対象者は男性12名、女性86名で、平均年齢は86.4歳（±6.9歳）であった。経管栄養者の内訳は、経皮的胃瘻造設術(PEG)が31名であり、経鼻胃管(NG)は13名であった。経管栄養群では男性が多く、重度の認知症が多かったが、その他の条件に差はなかった。口腔内の環境については、経管栄養者で舌苔がより厚く、入れ歯使用がないという特徴があった。

まず、末端標識制限酵素断片長多型(T-RFLP)解析のピークパターンデータを用いて細菌叢の特徴を比較した結果、経管栄養者ではパターンが経口栄養者と大きく異なっており、この違いは多変量分散分析(MANOVA)において有意であった($P < 0.001$)が、PEGとNGの間に有意な違いは認められなかった。

主成分分析を用いて全被験者のピークパターンデータの解析を行ったところ、系統発生的情報が得られた。第1主成分で負の方向に因子負荷量の高い末端標識制限酵素断片(TRF)には、そのフラグメントサイズからコリネバクテリウム属あるいはプロピオニバクテリウム属が、逆に正の方向に負荷量の高いTRFにはプレボテラ属、ベイヨネラ属などが該当した。一方、第2主成分では負の方向に負荷量の高いTRFストレプトコッカス属、バチリス属が、正の方向にはフゾバクテリウム属とペプトストレプトコッカシアエ科の菌が該当した。

経管栄養者は第1主成分が負の方向、第2主成分が正の方向に局在していたことから、口腔常在菌として一般的に優勢なストレプトコッカス属やベイヨネラ属、プレボテラ属の割合が低く、逆にコリネバクテリウム属やフゾバクテリウム属の割合が異常に高い可能性が示唆された。

さらに詳細な細菌構成を調べるため、PEG経管栄養者15人と経口栄養者16人について、パイロシーケンスを用いた解析を行い、10万3,391のバクテリア16S rRNA遺伝子シーケンスを同定。その構成は、やはり経管栄養者と経口栄養者で明らかに異なっていた。細菌叢は、両群ともに主にアクチノバクテリア門、バクテロイデス門、フゾバクテリア門、ファーミキューテス門、プロテオバクテリア門から構成されていた。経管栄養者は、ファーミキューテス門の割合が少なく、アクチノバクテリア門やシネルギステス門やテネリキューテス門、SR1の割合が有意に多かった。

また、菌属レベルでは、T-RFLP解析で予測された通り、口腔常在菌として一般的なベイヨネラ属、ストレプトコッカス属が少ない一方、マイナーなバクテリアであるコリネバクテリウム属、ペプトストレプトコッカス属、フゾバクテリウム属など22菌属が有意に高率で検出された。また、経管栄養者のみで、シュードモナス属（1人）やアシネトバクター属（3人）が認められた。さらに詳細に調べると、通常ヒトの口腔では検出されることが少ない好気性グラム陽性桿菌であるコリネバクテリウム・ストリアツムやB群β溶血性連鎖球菌のストレプトコッカス・アガラクチアが検出された。

【考察】

今回の研究では一般的な呼吸器系の病原菌である緑膿菌は見つからなかったが、脆弱な高齢者では今回見つかった日和見病原菌が命取りになる恐れもあるという。コリネバクテリウム属は院内感染し、呼吸器へのコロナイゼーションを引き起こすとの報告があり、嫌気性のフゾバクテリウム属やペプトストレプトコッカス属は肺炎、肺膿瘍などの肺感染症と関連し、ストレプトコッカス・アガラクチア、B群ストレプトコッカスは侵襲的疾患の原因となるともいわれている。実際、経管栄養者の肺炎発症率と死亡率は同じ寝たきりの経口栄養者に比較して有意に高かった。ベースラインの健康状況を両群で完全にマッチングすることは不可能であり、この結果を口腔細菌叢の影響と単純に結論付けることはできないが、少なくとも経管栄養によって肺炎や死亡の発症が抑えられたとは考えにくい。本研究の結果から食事に使わなくなった口腔内では唾液の流れの減少、唾液の質の変化が起り、細菌バランスが崩れることで、経管栄養の使用が高齢者の健康を障害するバクテリアの繁殖を引き起こすことが考えられる。

【発表論文】

- 1) Takeshita, T., M. Tomioka, Y. Shimazaki, M. Matsuyama, K. Koyano, Y. Yamashita (2010) Microfloral characterization of tongue coating and associated risk for pneumonia-related health problems in institutionalized older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 58(6), 1050-1057. 無
- 2) Yamashita, Y. and T. Takeshita (2011) Oral flora composition and its connection to oral health. *J. Oral Biosciences*, 53(3), 206-212.
- 3) Takeshita, T., M. Yasui, M. Tomioka, Y. Nakano, Y. Shimazaki, Y. Yamashita (2011) Enteral Tube Feeding Alters the Oral Indigenous Microbiota in Elderly Adults. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(19), 6739-6745.
- 4) 山下喜久、柴田幸江、竹下徹 (2011) 口腔細菌叢と高齢者の感染症、化学療法領域, 27(1), 74-83. 無
- 5) Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Yasui M, Yoneda M, Shimazaki Y, Hirofuji T, Yamashita Y (2012) Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. *Sci. Rep.*, 2, 215. 無