

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659333

研究課題名（和文）：サイトカインは直接的に細菌に作用するのか？

研究課題名（英文）： Does cytokine directly reacted with bacteria?

研究代表者：小松澤 均 (Hitoshi KOMATSUZAWA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90253088

## 研究成果の概要（和文）：

サイトカインの新しい機能について明らかにすることを目的とした研究であり、サイトカインの細菌への直接的作用として、サイトカインの抗菌作用、細菌への結合能、細菌感染性への影響について検討した。ポジティブチャージの強いMIP3 $\alpha$ およびIL-8について検討した結果、両サイトカインとも細菌結合能、弱い抗菌活性は認められたが、サイトカイン処理した細菌の細胞付着能については著名な変化は認められなかった。本研究結果から、ポジティブチャージのサイトカインは細菌に結合することで、免疫応答に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this research is to demonstrate the new function of cytokines. We investigated the antibacterial activity of cytokines, the cytokine affinity to bacterial cells and the effect of cytokine treatment on bacterial attachment to mammal cells. We found that MIP3 $\alpha$  and IL8, positive charged peptides, were able to bind bacterial cells, and had weak antibacterial effect, while binding of cytokines to bacterial cells had no effect on the bacterial attachment to mammal cells. In conclusion, it is suggested that some cytokines binds to bacteria causing to modulate the immune responses.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：【細菌学】

科研費の分科・細目：【歯学・形態系基礎歯科学】

キーワード：【細菌、歯学、サイトカイン、細菌感染】

## 1. 研究開始当初の背景

細菌が生体に侵襲した際には生体は細菌の侵襲に対して抵抗性（免疫力）を示す。細菌と宿主の相互作用の結果、多くの場合細菌の侵襲部位に炎症がおこる。歯周炎における

歯周組織など炎症部位には種々の免疫担当細胞などが集積しており、各細胞間で相互に影響を及ぼしながら細菌の侵襲に抵抗している。この際、侵襲した組織の細胞あるいは

免疫担当細胞はサイトカイン/ケモカインを産生することで、周辺細胞や自己細胞に対して向上的あるいは抑制的に働くことで炎症反応を制御している。

近年、先天性免疫機構の一因子である抗菌性ペプチドが細菌の侵襲に対して誘導的に産生することが報告されている。抗菌性ペプチドは抗菌力を有するだけでなく、一部の抗菌性ペプチドは好中球の遊走能、T細胞の活性化、マスト細胞の脱顆粒などケミカルメディエーターとしての働きも有することが明らかになってきた (Trends Immunol 23:291-296, 2002)。特に上皮系の産生するβ-ディフェンシン-2はケモカインであるMIP-3αと相同性が強く、両者とも同様に生物活性と抗菌活性を有することが報告されている (J Biol Chem 277:37647-37654, 2002)。申請者もケモカインであるCXCL10およびCXCL16が抗菌力を有することを報告している (Int Immunol 19:1095-1102, 2007)。また、抗菌性ペプチドはグラム陰性菌のリポ多糖やグラム陽性菌のリポタイコ酸へ結合しエンドトキシン活性を中和することも報告されている (Infect Immun 67:6445-6453, 1999)。以上の点より、サイトカイン/ケモカインの中には抗菌活性あるいは表層抗原への中和活性を有する可能性が考えられる。また、反面、細菌側から考えると、サイトカインの細菌体への吸着によりサイトカインの宿主細胞への作用を阻害することが考えられる。さらに、サイトカインの細菌への結合による細菌側の外来性因子認識機構を介した病原性因子発現性の変化も考えられ、新しい宿主抵抗性機序が提唱できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

サイトカインの新しい機能について明らかにすることを目的とする。細菌が生体に侵襲した際には宿主は免疫力を駆使し抵抗性を示す。宿主の免疫力には多様な免疫担当細胞が働くが、これらの細胞の機能を調節する因子として種々のサイトカインがある。これまでサイトカインの直接的な細菌への作用

の報告はほとんどない。しかし、宿主の産生する抗菌性ペプチドがサイトカイン様の働きを有することが近年報告されていることから、同様にサイトカインにも細菌に直接作用する可能性が考えられる。そこで、本研究ではサイトカインの細菌への直接的作用の検討として、サイトカインの抗菌作用、細菌への結合能、細菌感染性への影響について明らかにすることを目的とする。本研究により細菌感染時における免疫応答の新しい一面が提唱できると考える。

## 3. 研究の方法

### (1) 口腔細菌に対するサイトカインの抗菌活性試験

サイトカイン/ケモカイン数種について歯周病原菌の一つでグラム陰性菌の *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa菌)、う蝕原因菌でグラム陽性菌である *Streptococcus mutans* および院内感染菌である黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を検討する。検討方法としては種々の濃度のサイトカイン/ケモカインを10mMのリン酸緩衝液で調整し、被験菌を接種する。種々の時間後、寒天培地に播種し一晚培養後コロニー数をカウントし、サイトカイン非添加時のコロニー数と比較し殺菌率を検証する。また、微量液体希釈法を用いてMIC値が判定できるかの検討を行う。

神経ペプチドであるOrexinBの抗菌活性についても検討を行った。(Forsyth Instituteとの共同研究)

### (2) サイトカイン/ケモカインの細菌結合実験

種々のサイトカイン/ケモカインを用いて細菌(黄色ブドウ球菌、Aa菌)との結合性について検討する。菌の懸濁液にサイトカインを添加後、遠心し上清画分を回収する。また、菌体を生理食塩水で3回洗浄後、2% SDS溶液で懸濁し結合サイトカインを回収する。それぞれの画分を用いてSDS-PAGEを行い、それ

それぞれのケモカインに対する抗体を用いて検出する。

ELISA 法による検討も行った。黄色ブドウ球菌の死菌体を 96 ウェルプレートにコーティング後、種々の濃度のサイトカインを反応させた。洗浄後、抗サイトカイン抗体を用いて比色定量を行った。

### (3) サイトカイン/ケモカイン処理細菌の歯肉上皮細胞への結合能に関する検討

細菌との結合性が強く認められた IL-6 について IL-6 処理黄色ブドウ球菌の歯肉上皮細胞への付着能について検討した。併せて、Aa 菌について MIP3 $\alpha$  作用時の付着能に及ぼす影響について検討した。

細菌とサイトカインを反応後、生理食塩水で 2 回菌体を洗浄後、菌体を細胞に反応させた。2 時間後、細胞用培地を取り除き、生理食塩水で 3 回洗浄後、トリプシン処理を行い菌体を細胞からはがし、生理食塩水で懸濁した。懸濁液を希釈し、寒天培地に播種し、培養後コロニー数を計測し、付着菌数を判定した。

## 4. 研究成果

### (1) 抗菌活性の検討

MIP3 $\alpha$  はヒト抗菌性ペプチドである  $\beta$ -ディフェンシン-2 (hBD2) と同じペプチドである。hBD2 は黄色ブドウ球菌、Aa 菌、*S. mutans* に対して数  $\mu$ g/ml の濃度で強い抗菌活性を示した。しかし、IL-6、IL-8 について抗菌活性は認めるものの、その活性は非常に弱かった。また、ケモカインの一つで陽性にチャージしている CXCL-16 にも弱い抗菌活性を認めた。

また、神経ペプチドである OrexinB および vasoactive intestinal peptide (VIP) についてグラム陰性菌およびグラム陽性菌について検討した結果、これら 2 つのペプチド単独では抗菌効果は弱いものの、特にグラム陰性菌において抗菌性ペプチドとの併用により高い抗菌活性を認めた。

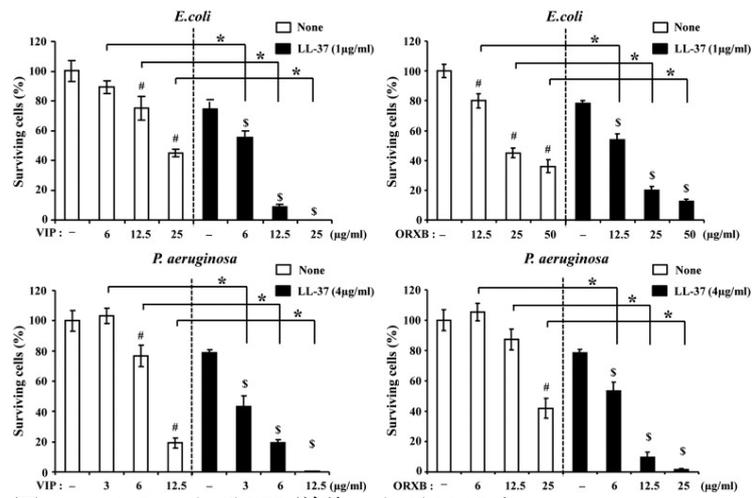
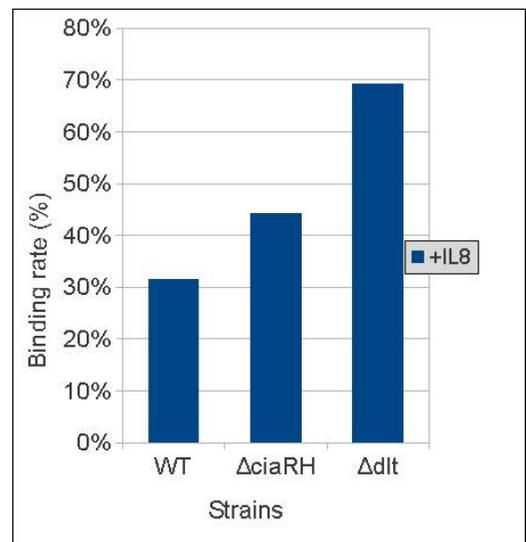


図: orexinB および VIP 単独および LL37 との併用時における大腸菌、緑膿菌に対する抗菌活性の検討

(J Neuroimmunol, 233:37-45, 2011)

### (2) サイトカイン結合能の検討

*S. mutans* への結合実験: *S. mutans* 親株 (WT), 菌体表層の陰性チャージが強くなった変異株 (*ciaRH* 欠損株, *dlt* 欠損株) を用いて IL-8 との結合性を検討した (下図)。WT において反応させた IL-8 のおよそ 30% が菌体に結合していることが認められた。また、表層の陰性チャージが強くなると結合能が増大することが認められた。



黄色ブドウ球菌への結合実験; 黄色ブドウ球菌への IL-8 の結合実験について、ウェスタンブロッティング法を用いて検討した。その

結果、菌体結合画分（2%SDS 溶出画分）に IL-8 を認めた。しかし、黄色ブドウ球菌菌体の陰性チャージが強い変異株においては著名な IL-8 の結合能の増大は認められなかった。

（3）サイトカイン/ケモカイン処理細菌の歯肉上皮細胞への結合能に関する検討

**IL-8 処理黄色ブドウ球菌および Aa 菌**について上皮細胞に対する付着能について検討した結果、付着能については著名な変化は認められなかった。また、細胞への菌体付着によるサイトカインの産生誘導能についても検討を行ったが、顕著な変化は認められなかった。

## 5. 主な発表論文

（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）

①Ohta K, Kajiya M, Zhu T, Nishi H, Mawardi H, Shin J, Elbadawi L, Kamata N, Komatsuzawa H, Kawai T. Additive effects of orexin B and vasoactive intestinal polypeptide on LL-37-mediated antimicrobial activities. J Neuroimmunol. 2011 233(1-2):37-45. (査読有)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21176972>

〔その他〕

ホームページ等

発表論文についてはホームページ上に記載した。

<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Saikin/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小松澤均

鹿児島大学医歯学総合研究科口腔微生物学  
分野

研究者番号：90253088

### (2) 研究分担者

松尾美樹

鹿児島大学医歯学総合研究科口腔微生物学

分野

研究者番号：20527048

大貝悠一

鹿児島大学医歯学総合研究科口腔微生物学  
分野

研究者番号：40511259

神原賢治

鹿児島大学医歯学総合研究科口腔微生物学  
分野

研究者番号：60305041