

令和元年6月13日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11808

研究課題名(和文) P. melaninogenicaの誤嚥性肺炎病原因子の同定と病態発症機序の解明

研究課題名(英文) Identification and analyses of aspiration-pneumonic pathogen in Prevotella melaninogenica.

研究代表者

星野 倫範 (Hoshino, Tomonori)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：00359960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年口腔ケアによって誤嚥性肺炎が予防されることが示唆されているが、細菌学、感染症学的側面からの検証報告は少ない。そこで本研究では、誤嚥性肺炎の起炎菌の一つであるPrevotella melaninogenicaに着目し、本菌種も近縁種である歯周病原細菌が有するプロテアーゼや細菌の細胞表面などの病原因子の分泌に關与するタイプIX分泌システム(T9SS)を有することから、本分泌システムの解析を行って、誤嚥性肺炎の病原因子の一つであることを示唆するとともに、本因子の阻害剤の開発は誤嚥性肺炎の予防につながるものであることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔ケアで誤嚥性肺炎が予防できるという概念は比較的新しく、介入疫学研究によるエビデンスは得られているが、細菌学的な裏付けは得られていない。本研究は誤嚥性肺炎の起炎菌の一つであるP. melaninogenicaの病原因子を同定し、病態発症のメカニズムを明らかにするという側面から、口腔ケアによる誤嚥性肺炎の予防効果の細菌学的エビデンスを得るという点で学術的意義がある。口腔ケアによる誤嚥性肺炎予防の効果が、介入疫学的、細菌学的にエビデンスが得られることは、医療的支援が必要な小児、高齢者、周術期患者における医療的ケアで口腔ケアが認知されることにつながるため社会的意義もあると考える。

研究成果の概要(英文)：Prevotella melaninogenica is a Gram-negative anaerobic commensal bacterium in the human oral cavity and is aspiration-pneumonic pathogen. However, little is known about the pathogenic factors of P. melaninogenica. Porphyromonas gingivalis, periodontal pathogen, secretes virulence factors such as protease and bacterial cell surface proteins via a type IX secretion system (T9SS) that are involved in pathogenicity. P. melaninogenica also possesses the orthologs of T9SS. In this study, a P. melaninogenica deficient mutant in the orthologue of the T9SS-encoding gene, porK, was constructed. It was suggested that the porK mutant decreased the secretion of proteases outside the bacterium. Then, in infection experiments, the mortality rate of mice inoculated with the porK mutant strain was statistically reduced compared with the wild-type. Thus, it was suggested that P. melaninogenica secretes potent virulence factors via the T9SS that contribute to the aspiration-pneumonic pathogenesis.

研究分野：小児歯科学

キーワード：誤嚥性肺炎 P. melaninogenica T9SS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

2000年前後から口腔ケアによって誤嚥性肺炎が予防されるという介入疫学研究が行われ、最近では口腔ケアが誤嚥性肺炎の予防に有効であることが認知されている。2012年の歯科の診療報酬改定でもこの有効性が評価され、口腔ケアは周術期の口腔機能管理として保険導入されている。その一方で、誤嚥性肺炎-起炎菌-口腔ケアの間の病態発症・予防に関する細菌学的なメカニズムはほとんど解明されていないままである。例えば齶蝕であれば、*Streptococcus mutans*などのミュータンスレンサ球菌がその起炎菌であり、スクロースからの酸産生能とグルカン合成能が齶蝕の病原因子で、齶蝕の発症機序はほぼ解明されており、スクロース摂取の制限、歯面の清掃、フッ化物による歯質の強化などの予防法も確立されている。しかし、誤嚥性肺炎に関しては、細菌学的な発症機序があまり解明されておらず、口腔ケアを含む予防的方策としては何を標的とするのかが不明確なままである。

最近我々は、脳性麻痺（CP）のある小児と健常児の唾液中細菌叢の比較を、メタゲノムシーケンセスを用いた群集解析により行った(表1)。その結果、平均検出率に関して、(1)健常群では55.13%であった *Streptococcus* 属が CP 群では34.89%まで減少した、(2)健常群では1.84%、1.10%であった *Prevotella* 属、*Fusobacterium* 属が CP 群では7.00%、7.10%まで増加した、という結果を得た。この結果より、ヒトのデンタルプラーク中に常在する菌属のうち、早期定着細菌が歯面に定着したあとの比較的成熟したプラーク（不潔性プラーク）に定着する晩期定着細菌であり2)、誤嚥性肺炎の起炎菌でもある3) *Prevotella* 属や *Fusobacterium* 属が、CP 群では健常群に比べて増加し、これに伴い誤嚥性肺炎のリスクも高まっていることが示唆された。

その一方で、例えば *Prevotella* 属が誤嚥性肺炎の起炎菌である場合、これによる播種性血管内凝固症候群の発症頻度が極めて低いことなどから、毒性が弱いと考えられ、あまりその病原性などが重要視されてこなかった経緯3)もあり、*Prevotella* 属の誤嚥性肺炎における病原因子の研究はあまり進んでいない。しかし、上記より脳性麻痺の小児や周術期の患児で *Prevotella* 属が誤嚥性肺炎の原因となる可能性があることを鑑みると、改めて *Prevotella* 属の誤嚥性肺炎における病原因子を同定し、病態発症のメカニズムを解明することは、口腔ケアによる誤嚥性肺炎予防の細菌学的エビデンスにもつながる重要な知見といえる。さらに、我々はこれまでに *Prevotella* 属と同じバクテロイデーテス類に属する *Porphyromonas* 属の研究を行ってきたが、その実験手法がそのまま応用できる利点もある。そこで本申請研究では、*Prevotella* 属をまず研究の対象とすることとし、その中でも特に誤嚥性肺炎の起炎菌の一つといわれ、実際に我々の唾液の細菌叢解析でも CP 群で特に検出数が増加(図1)していた *Prevotella melaninogenica* に注目し、誤嚥性肺炎の病原因子を同定して病態発症機序を解明して、その予防のための口腔ケア法を立案あるいは治療法の確立に役立つような知見を得るということで本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

介入疫学研究によって口腔ケアが誤嚥性肺炎の予防に有効であることは、現在広く認知されている。しかし、誤嚥性肺炎は口腔内に常在する細菌によって引き起こされる感染症であるという認識はされているものの、誤嚥性肺炎の原因となる特定の細菌種に関し、どの病原因子が誤嚥性肺炎を誘発し、病態を増悪させるかという細菌学的側面からの研究報告はあまりない。

表 1-1. メタゲノム解析による唾液中口腔細菌の平均検出率(健常児)

Genus	Ave.(%)
1 Streptococcus	55.13
2 Neisseria	11.32
3 Veillonella	4.52
4 Gemella	3.73
5 Rothia	3.70
6 Actinomyces	3.40
7 Abiotrophia	3.08
8 Granulicatella	2.86
9 Lautropia	1.87
10 Prevotella	1.84
11 Haemophilus	1.28
12 Leptotrichia	1.19
13 Fusobacterium	1.10
14 Corynebacterium	0.54
15 Terraheamophilus	0.51
16 Oribacterium	0.49
17 Kingella	0.33
18 Campylobacter	0.30
19 Porphyromonas	0.27
20 Capnocytophaga	0.21
21 Megasphaera	0.17
22 Catonella	0.17
23 Atopobium	0.09
24 Streptobacillus	0.07
25 Selenomonas	0.07
26 Propionibacterium	0.06
27 Peptostreptococcus	0.06
28 Eubacterium	0.05
29 Aggregatibacter	0.05
30 Mogibacterium	0.04

表 1-2. メタゲノム解析による唾液中口腔細菌の平均検出率(CP患者)

Genus	Ave.(%)
1 Streptococcus	34.89
2 Neisseria	12.21
3 Fusobacterium	7.10
4 Prevotella	7.00
5 Gemella	3.85
6 Veillonella	3.25
7 Porphyromonas	2.50
8 Abiotrophia	2.28
9 Actinomyces	2.26
10 Leptotrichia	2.01
11 Campylobacter	1.93
12 Haemophilus	1.91
13 Capnocytophaga	1.79
14 Lautropia	1.58
15 Selenomonas	1.48
16 Granulicatella	1.36
17 Rothia	1.22
18 Eikenella	0.52
19 Aggregatibacter	0.51
20 Bergeyella	0.45
21 Eubacterium	0.42
22 Terraheamophilus	0.39
23 Streptobacillus	0.33
24 Moraxella	0.32
25 Corynebacterium	0.28
26 Peptostreptococcus	0.28
27 Catonella	0.21
28 Atopobium	0.19
29 Kingella	0.19
30 Megasphaera	0.18

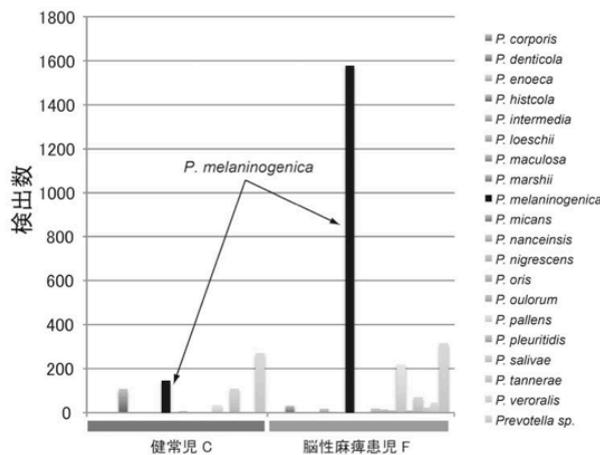


図1. 健常者と脳性麻痺患者の *Prevotella* 属の検出数の違い
メタゲノムシーケンセスの結果で健常群と脳性麻痺群で *Prevotella* 属が最も多く検出された被験児の各菌種の検出数を比較した。

そこで本申請研究は、誤嚥性肺炎の起炎菌の一つとされる *P. melaninogenica* に注目し、その誤嚥性肺炎の病原因子を特定し、その因子の病原性の解析を行い、これにより得られた知見に基づいて、口腔ケア法あるいは治療法の立案に役立つよう検討することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) *P. melaninogenica* における病原因子、タイプ IX 分泌システムの同定とクローニング

P. melaninogenica における誤嚥性肺炎病原遺伝子として、近縁菌種である *Porphyromonas gingivalis* や *Tannerella forsythia* のような歯周病原細菌が有するプロテアーゼや細菌の細胞表面などの病原因子の分泌に関与するタイプ IX 分泌システム (T9SS) に注目し、*P. melaninogenica* ATCC 25845T 株の全ゲノム情報 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP002122>) から、T9SS 遺伝子 (*porK*) を本菌種が持つかどうかを BLAST 検索により同定した。次に同定した *P. melaninogenica* の *porK* 遺伝子をプラスミドにクローニングした。

(2) *P. melaninogenica* の *porK* 遺伝子欠失変異株の作成

クローニングしたプラスミドの挿入した遺伝子配列のほぼ中間を制限酵素で切断し、その切断部位にさらに *Bacteroides fragilis* 由来由来のエリスロマイシン耐性遺伝子 (*ermF*) の挿入組換えを

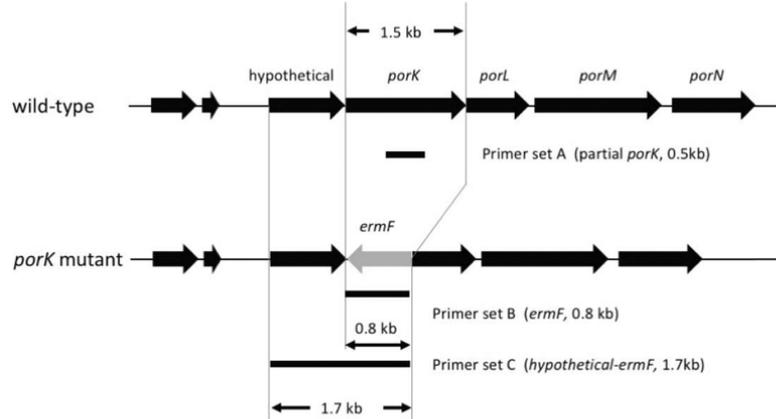


図2 *porK* 遺伝子と *ermF* 遺伝子の挿入による欠失

行った(図2)。これにより得られたプラスミドから、標的遺伝子とその中間に *ermF* 遺伝子が挿入されているカセットを制限で切断して切り出し、これを *Bacteroides* 属と *Escherichia coli* のシャトルベクターである pT-COW に組換えた。このプラスミドを *E. coli* S17-1 株に形質転換し、対数増殖期初期まで培養し、対数増殖期初期まで培養した *P. melaninogenica* の培養液と混合して遠心分離でペレット状にし、これをさらにブルセラ寒天培地で一晚培養した。培養した培地より得られたコロニーをゲンタマイシン (*P. melaninogenica* はゲンタマイシン耐性) とエリスロマイシンを加えたブルセラ寒天培地に播種して接合伝達と相同組換えにより上記カセットを取り込んだ *P. melaninogenica* を得ることで、欠失変異株を作成した。

(3) *porK* 遺伝子欠失変異株を用いた *porK* 遺伝子の病原性解析

- 1) *porK* 遺伝子欠失変異株における挿入遺伝子の確認を行った。
- 2) anti-Pork 抗体を用いたイムノプロット分析による *porK* 遺伝子欠失変異株におけるタンパク発現の確認を行った。
- 3) *porK* 遺伝子欠失変異株の培養上清中に含まれるタンパクの比較を二次元電気泳動により野生株と比較した。
- 4) 乳成分含有培地で培養した場合に形成されるハロの直径の野生株と *porK* 遺伝子欠失変異株の比較を行った。
- 5) 野生株と *porK* 遺伝子欠失変異株のマウスへの感染実験を行い、致死率を比較することで病原性の変化について検討した。

4. 研究成果

1) *porK* 遺伝子欠失変異株における挿入遺伝子の確認

本研究では、まず *P. melaninogenica* の *porK* 欠失変異株を相同組換えにより作成した。得られた *porK* 欠失変異株における挿入カセット遺伝子の確認を *porK* 遺伝子のプライマー、*ermF* 遺伝子のプライマーを用いて確認したところ、*porK* 欠失変異株はゲノム上に存在する *porK* 遺伝子の途中で *ermF* 遺伝子が挿入されていることが確認された(図3)。

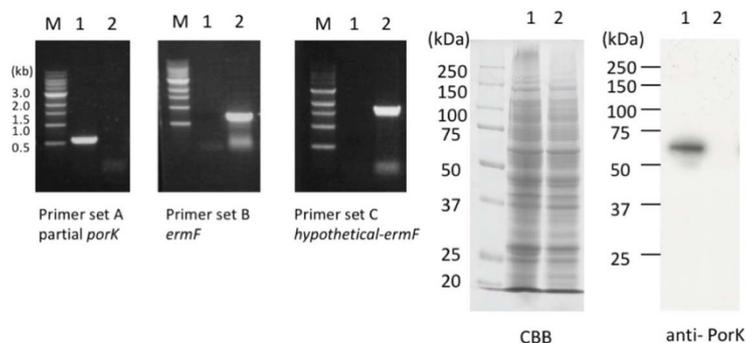


図3 *ermF* 遺伝子の挿入による *porK* 遺伝子の欠失の確認

2) *porK* 遺伝子欠失変異株におけるタンパク発現

porK 遺伝子欠失変異株と野生株の菌体成分を SDS-PAGE による電気泳動を行ったのち、

anti-PorK 抗体を用いたイムノブロット分析を行ったところ、野生株では anti-PorK 抗体と反応するバンドが検出されたが、*porK* 遺伝子欠失変異株では検出されなかったことから、*porK* 遺伝子欠失変異株で、*ermF* 遺伝子の挿入によりエリスロマイシン耐性を獲得する一方で、PorK のタンパク発現が欠失していることが確認された (図 3)。加えて、*porK* 遺伝子欠失変異株の赤血球凝集とバイオフィーム形成を野生株と比較したところ、血球凝集とバイオフィーム形成ともに減少していることが明らかとなった。

3) *porK* 遺伝子欠失変異株の培養上清中に含まれるタンパクの比較を二次元電気泳動

porK 遺伝子欠失変異株の培養上清中に含まれるタンパクの比較を二次元電気泳動によりおこなったところ、*porK* 欠失変異株では野生株と比べて検出される分泌タンパクのスポットが減少しているのが認められた。これにより病原因子を含む分泌タンパクが T9SS により細胞外に分泌されており、これを欠失させることでこれらの分泌タンパクが分泌されなくなることが示唆された (図 4)。

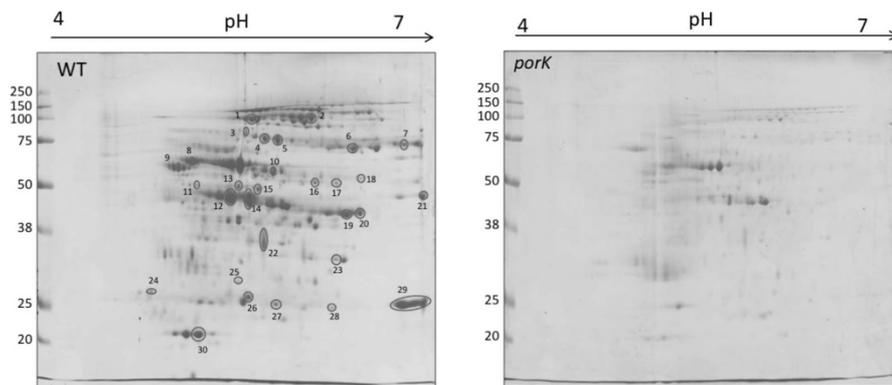


図4 野生株と*porK*遺伝子欠失変異株培養上清中に発現するタンパクの二次元電気泳動による比較

4) 野生株と *porK* 遺伝子欠失変異株で形成されるハロの直径の比較

P. melaninogenica を乳成分を含有する培地で培養した場合、バクテリア細胞外にプロテアーゼ分泌されるため、タンパクが分解されるので、培地上にハロが形成される。*porK* 遺伝子欠失変異株では、バクテリア細胞外に分泌するプロテアーゼが減少することが想定されるため、野生株が形成するハロの直径よりも小さくなると考えられる。そこで、本実験を行ったところ、予想通り、*porK* 遺伝子欠失変異株では、ハロの形成が小さくなっていたことから、細胞外に分泌するプロテアーゼが減少していることが示唆された (図 5)。

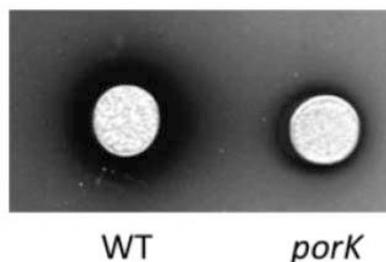


図5 *porK* 遺伝子欠失変異株のハロ形成

5) *porK* 遺伝子欠失変異株のマウスへの感染実験

porK 遺伝子欠失変異株のマウスへの感染実験では、*porK* 遺伝子欠失変異株のマウスの死亡率は、野生株の死亡率よりも統計的に有意に減少していることが明らかとなった (図 6)。

これらのことから、*P. melaninogenica* の T9SS は分泌タンパクの細胞外への移送に重要な役割を果たしており、*porK* 遺伝子が欠失すると分泌タンパク中に含まれる病原タンパクも移送されなくなることから、*porK* 遺伝子およびこれにより発現する

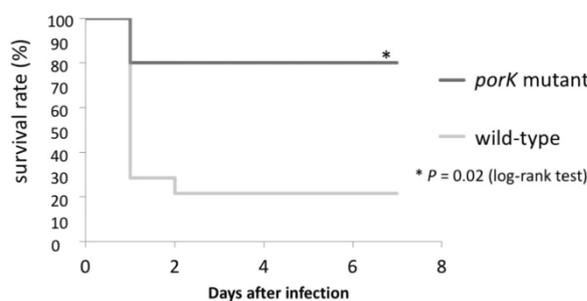


図6 *porK* 遺伝子欠失変異株のマウスへの感染実験

PorK タンパクは *P. melaninogenica* における病原因子の一つであることが示唆された。また、本分泌システムを介した病原因子の移送が本菌種の病原性に関与しており、誤嚥性肺炎など病態においても関連性があり、*P. melaninogenica* における本分泌システムの阻害剤などは誤嚥性肺炎の発症予防につながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Involvement of PorK, a component of the type IX secretion system, in *Prevotella melaninogenica* pathogenicity. Yoshio Kondo, Keiko Sato, Keiji Nagano, Miyuki Nishiguchi, Tomonori Hoshino, Taku Fujiwara, Koji Nakayama., *Microbiol Immunol.* 2018

Sep;62(9):554-566. doi: 10.1111/1348-0421.12638.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：近藤好夫

ローマ字氏名：Yoshio Kondo

所属研究機関名：長崎大学大学院

部局名：生命医科学域（歯学系）

職名：助教

研究者番号（8桁）：30581954

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。