

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09920

研究課題名（和文）口腔細菌の制御を基盤としたインフルエンザ予防戦略の確立に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Exploring the influence of oral bacteria on influenza virus infection

研究代表者

神尾 宜昌（KAMIO, Noriaki）

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：60546472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯周病原菌*Fusobacterium nucleatum*がインフルエンザウイルス感染を促進していることを明らかにした。感染を促進させるメカニズムとして、宿主細胞への*F. nucleatum*刺激によるHDAC1およびHDAC6の発現低下が関与している可能性がある。さらに本研究では、肺炎球菌などの宿主レセプターであるPAFRの発現を歯周病原菌*Porphyromonas gingivalis*が亢進し、肺炎球菌の宿主細胞への付着を増加させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、口腔細菌、とくに歯周病原菌がインフルエンザウイルス感染や肺炎球菌感染の促進に働いていることが示唆された。そのため、口腔を健康に保つことが、インフルエンザウイルス感染の予防につながる可能性がある。さらに、インフルエンザ罹患後にしばしば細菌性肺炎を合併し重症化することがあることから、重症化を予防する上でも健康な口腔は重要と考えられる。以上のことから、本研究は、口腔環境の管理による呼吸器感染症予防法を確立する上で、科学的根拠を構築するための一助となったと考える。

研究成果の概要（英文）：*Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* are known to be involved in periodontal disease. In this study, we explored the effect of *F. nucleatum* on influenza virus infection. Our findings revealed that *F. nucleatum* enhanced influenza virus replication possibly attributable to *F. nucleatum*-reduced HDAC1 and HDAC6 expression. We also found that *P. gingivalis* enhanced pneumococcal adhesion to respiratory cells by inducing PAFR expression. These results provides the scientific basis to support the importance of keeping good oral hygiene as an effective approach in preventing the occurrence and/or progression of respiratory infection.

研究分野：微生物学

キーワード：インフルエンザウイルス 口腔細菌

1. 研究開始当初の背景

毎年インフルエンザによって高齢者を中心に多くの命が失われている。インフルエンザ予防対策として、ワクチンは最も効果の高い手法であるものの、副反応などのリスクがある。また、新型インフルエンザウイルスによるパンデミック発生時には、即座にワクチンを供給することが困難であることが予想される。そのため、高齢者に応用可能な、ウイルスの抗原変異に影響を受けない予防方法の確立は重要である。

口腔ケアがインフルエンザの発症リスクを低下させるとの臨床研究による報告があることから (*Arch Gerontol Geriatr.* 43:157-164. 2006)、口腔細菌がインフルエンザウイルス感染に影響を及ぼしていることが考えられる。しかしながら、その分子メカニズムは不明のままであるため、研究代表者はその検討を行ってきた。検討の結果、ノイラミニダーゼ産生口腔細菌がインフルエンザウイルスの感染拡大に働くことを明らかにした (*Cell Mol Life Sci.* 72:357-366. 2015)。以上の研究から、口腔細菌がインフルエンザウイルス感染に影響を及ぼしている可能性がある。

また、インフルエンザウイルス感染後に、肺炎球菌やインフルエンザ菌などが原因となる続発性細菌性肺炎がしばしば発症し、重症化することがある。そのため、細菌性肺炎の発症を予防することも、インフルエンザの重症化を予防する上で重要である。

2. 研究の目的

本研究は、口腔細菌がインフルエンザウイルス感染の重症化に及ぼす分子メカニズムを解明し、インフルエンザ予防法として口腔ケアが有効であることを示すことを目的に実施した。さらに、インフルエンザ感染後にしばしば細菌性肺炎を合併し重症化する。細菌性肺炎の予防に口腔ケアが有効であるが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。そこで、その分子メカニズムを明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

ヒト肺胞上皮細胞である A549 細胞株を用いた。口腔細菌として歯周病原菌である *Fusobacterium nucleatum*、*Porphyromonas gingivalis*、*Prevotella intermedia* の培養上清を用いた。また、長崎大学 中山浩次先生より *P. gingivalis* のジンジパイン欠損株の分与を受け培養上清を調製した。インフルエンザウイルスは、A/Udorn/72 (H3N2) を使用した。

各種遺伝子発現状態をリアルタイム PCR により解析した。各種タンパク質発現状態をウエスタンブロットもしくは蛍光免疫染色により解析した。ウイルス力価はプラークアッセイにより評価した。

4. 研究成果

(1) 歯周病原菌がインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響

歯周病原菌である *F. nucleatum*、*P. gingivalis*、*P. intermedia* により A549 細胞を前処理後、インフルエンザウイルスを感染させた。細胞培養上清中に放出されたウイルス量をプラークアッセイならびにウエスタンブロットにより解析した。その結果、*F. nucleatum* および *P. gingivalis* で前処理した細胞においては、ウイルスの増殖促進を認めたものの、*P. intermedia* による前処理では認めなかった (図1)。

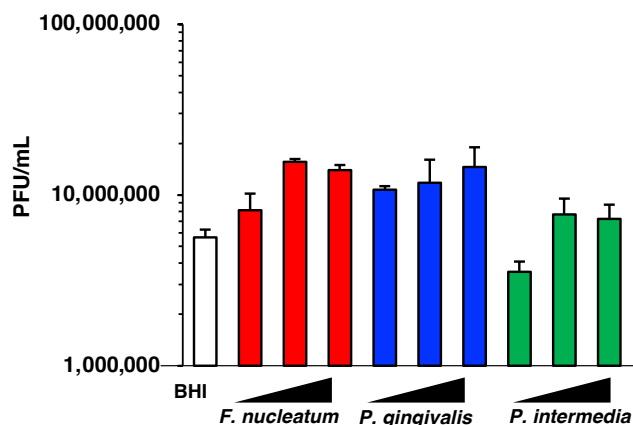


図1 歯周病原菌 前処理細胞におけるインフルエンザウイルス増殖状態

近年、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) がインフルエンザウイルスの増殖に関係していることが報告されている。そこで A549 細胞を *F. nucleatum* にて前処理後にインフルエンザウイルスを感染させ、HDAC1 と HDAC6 の遺伝子発現状態をリアルタイム PCR で、タンパク質発現状態をウエスタンブロットにて検討した。その結果、*F. nucleatum* にて前処理した群では、HDAC1 および HDAC6 の遺伝子発現ならびにタンパク発現が低下していた (図 2)。

HDAC6 をノックダウンすることにより、 α -Tubulin のアセチル化が促進され、インフルエンザウイルスの増殖が促進されることが報告されている。*F. nucleatum* 前処理により HDAC6 の発現が抑制されることから、 α -Tubulin のアセチル化が促進されている可能性がある。そこでアセチル化状態をウエスタンブロットにより検討した。その結果、*F. nucleatum* 前処理群においてアセチル化が促進されていることを確認した (図 2)。以上の結果から、*F. nucleatum* による HDAC6 の発現低下により α -Tubulin のアセチル化が起こり、ウイルスの増殖を促進している可能性が示唆された。

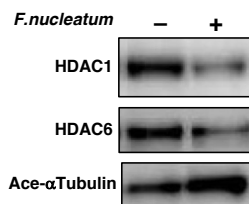


図2 *F. nucleatum* 前処理細胞にインフルエンザウイルス感染させた際のタンパク発現およびアセチル化の状態

本研究、およびこれまでの研究により、口腔環境が不良で口腔細菌が多量に存在する場合、インフルエンザウイルスの感染を促進させる可能性がある。このことから、健康な口腔がインフルエンザ予防手段として有効である可能性がある。

(2) 歯周病原菌が肺炎球菌の宿主細胞付着に及ぼす影響

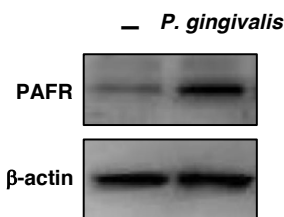


図3 *P. gingivalis* 刺激による PAFR の発現状態

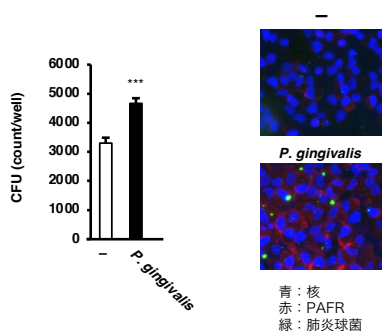


図4 *P. gingivalis* 前処理細胞における肺炎球菌の付着

インにより PAFR の発現が亢進し、肺炎球菌の付着が促進されることが明らかとなった。

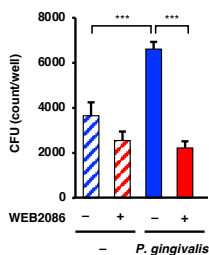


図5 PAFR阻害薬 (WEB2086) が *P. gingivalis* 前処理細胞への肺炎球菌付着に及ぼす影響

インフルエンザ罹患後に、肺炎球菌やインフルエンザ菌が原因となる細菌性肺炎を合併し、重症化することがある。これらの細菌のレセプターとなる血小板活性化因子受容体 (PAFR) が宿主細胞に発現している。そこで本研究では、歯周病原菌の刺激が PAFR の発現を亢進させ、肺炎球菌の細胞付着が増加するか検討した。その結果、A549 細胞を歯周病原菌 *P. gingivalis* により刺激すると PAFR 遺伝子発現およびタンパク発現が亢進していた (図 3)。さらに *P. gingivalis* により刺激した細胞に肺炎球菌を付着させたところ、付着数は増加していた (図 4)。*P. gingivalis* が誘導した PAFR 発現増強によって肺炎球菌の付着数が増加したのかを確認するため、*P. gingivalis* 前処理細胞に PAFR 阻害薬 WEB2086 を作用させ、肺炎球菌付着実験を実施した。その結果、肺炎球菌の宿主細胞への付着数は、*P. gingivalis* 前処理細胞に WEB2086 を作用させた群と *P. gingivalis* 未処理細胞の群では同程度になった (図 5)。

つぎに *P. gingivalis* ジンジパイン欠損株を用いてジンジパインが PAFR の発現および肺炎球菌の細胞付着に及ぼす影響を検討した。その結果、ジンジパイン欠損株で刺激した細胞では、PAFR の発現は上昇せず、また肺炎球菌の付着も増加しなかった。

以上の結果から、歯周病や口腔環境が不良な場合、宿主細胞に PAFR の発現が亢進し、肺炎球菌などの肺炎起因菌が付着しやすい状態となっている可能性がある。そのため、健康な口腔は、肺炎球菌などによる肺炎予防にも重要と考えられる。また、インフルエンザ罹患後の続発性細菌性肺炎による重症化を予防する上でも、健康な口腔が重要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hayata M, Watanabe N, Kamio N, Tamura M, Nodomi K, Tanaka K, Iddamalgoda A, Tsuda H, Ogata Y, Sato S, Ueda K, Imai K.	4. 巻 73
2. 論文標題 Cynaropicrin from <i>Cynara scolymus</i> L. suppresses <i>Porphyromonas gingivalis</i> LPS-induced production of inflammatory cytokines in human gingival fibroblasts and RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nat Med.	6. 最初と最後の頁 114-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-018-1250-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayata M, Watanabe N, Tamura M, Kamio N, Tanaka H, Nodomi K, Miya C, Nakayama E, Ueda K, Ogata Y, Imai K.	4. 巻 53
2. 論文標題 The Periodontopathic Bacterium <i>Fusobacterium nucleatum</i> Induced Proinflammatory Cytokine Production by Human Respiratory Epithelial Cell Lines and in the Lower Respiratory Organs in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Physiol Biochem.	6. 最初と最後の頁 49-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33594/000000120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tamura Muneaki, Cueno Marni E., Abe Kazumasa, Kamio Noriaki, Ochiai Kuniyasu, Imai Kenichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Ions released from a S-PRG filler induces oxidative stress in <i>Candida albicans</i> inhibiting its growth and pathogenicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stress and Chaperones	6. 最初と最後の頁 1337 ~ 1343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12192-018-0922-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Sari, Zhou Liming, Nakayama Yohei, Mezawa Masaru, Kato Ayako, Suzuki Naoto, Tanabe Natsuko, Nakayama Tomohiro, Suzuki Yuki, Kamio Noriaki, Takai Hideki, Ogata Yorimasa	4. 巻 67
2. 論文標題 MiR-200b attenuates IL-6 production through IKK and ZEB1 in human gingival fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 965 ~ 973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00011-018-1192-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koike Ryo, Cueno Marni E., Nodomi Keiko, Tamura Muneaki, Kamio Noriaki, Tanaka Hajime, Kotani Ai, Imai Kenichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Heat-Killed <i>Fusobacterium nucleatum</i> Triggers Varying Heme-Related Inflammatory and Stress Responses Depending on Primary Human Respiratory Epithelial Cell Type	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3839 ~ 3839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25173839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yuwa, Watanabe Norihisa, Kamio Noriaki, Kobayashi Ryutaro, Iinuma Toshimitsu, Imai Kenichi	4. 巻 63
2. 論文標題 Aspiration of periodontopathic bacteria due to poor oral hygiene potentially contributes to the aggravation of COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnugd.20-0388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yuwa, Watanabe Norihisa, Kamio Noriaki, Yokoe Sho, Suzuki Ryuta, Sato Shuichi, Iinuma Toshimitsu, Imai Kenichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 and Proinflammatory Cytokines Induced by the Periodontopathic Bacterium <i>Fusobacterium nucleatum</i> in Human Respiratory Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1352 ~ 1352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamio Noriaki, Hayata Mayumi, Tamura Muneaki, Tanaka Hajime, Imai Kenichi	4. 巻 -
2. 論文標題 <i>Porphyromonas gingivalis</i> enhances pneumococcal adhesion to human alveolar epithelial cells by increasing expression of host platelet activating factor receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神尾 宜昌, 田村 宗明, 今井 健一
2. 発表標題 歯周病原菌Porphyromonas gingivalisがインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神尾 宜昌, 田村 宗明, 早田 真由美, 渡辺 典久, 宮 千尋, 今井 健一
2. 発表標題 口腔細菌による肺炎発症メカニズム (1) - P. gingivalisはPAFR発現と肺炎レンサ球菌の肺細胞への付着を促進する -
3. 学会等名 第60回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神尾 宜昌, 早田 真由美, 田村 宗明, 今井 健一
2. 発表標題 ジンジパインは呼吸器上皮細胞において肺炎球菌受容体PAFRの発現を誘導する
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神尾 宜昌, 田村 宗明, 今井 健一
2. 発表標題 歯周病原菌Porphyromonas gingivalisはインフルエンザウイルスのヘマグルチニンを開裂し感染を促進する
3. 学会等名 第67回日本感染症学会東日本地方会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神尾 宜昌
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisは、呼吸器上皮細胞における肺炎球菌受容体PAFRの発現と肺炎球菌の付着を促進する
3. 学会等名 第68回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神尾 宜昌, 田村 宗明, 今井 健一
2. 発表標題 口腔細菌と呼吸器感染症関連微生物との相互作用－歯周病原細菌が肺炎とインフルエンザの発症に及ぼす影響－
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神尾 宜昌, 田村 宗明, 早田 真由美, 渡辺 典久, 宮 千尋, 今井 健一
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisのジンジパインは、呼吸器上皮細胞における肺炎球菌受容体PAFRの発現と肺炎球菌の付着を促進する
3. 学会等名 第61回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	今井 健一 (IMAI Kenichi) (60381810)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	関 啓介 (SEKI Keisuke) (10386120)	日本大学・歯学部・講師 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関