

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10077

研究課題名（和文）マイクロバイオータの表現型可塑性に着目した歯性病巣感染症の病態機序解明

研究課題名（英文）Phenotypic plasticity of the microbiota associated with odontogenic infections

研究代表者

大坂 利文（Osaka, Toshifumi）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70514470

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：口腔内病原体による異所性定着は常在細菌叢の構造および表現型の変性をもたらし、様々な全身性疾患の病態形成に関与していると考えられる。そこで本研究では、大腸がんに関連性がある *Fusobacterium nucleatum* は、異種細菌間の相互作用によって、増殖能、代謝物動態、細胞表面構造、バイオフィーム形成能などの表現型を変化させることを明らかとした。また、*Fusobacterium nucleatum* においては、クォーラムセンシング分子の産生能や腸炎関連大腸がんモデルにおける大腸組織前がん病変（aberrant crypt foci）の誘発能が亜種レベルで異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病関連細菌の腸内移行は大腸がんの発症リスクを増加させることから、健康な口腔環境の管理は大腸がんの予防に寄与することが考えられる。また、異種細菌間の相互作用研究は、バイオフィーム感染症に対する新しい治療方法の開発に波及することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Ectopic colonization by oral pathogens results in structural and phenotypic alteration in the commensal bacterial flora, which may play a role in the pathogenesis of various systemic diseases. In this study, we found that *Fusobacterium nucleatum*, which is associated with colorectal cancer, altered phenotypes (e.g., growth potential, metabolite dynamics, cell surface structure, and biofilm formation ability) through interactions among heterologous bacteria. In addition, *Fusobacterium nucleatum* showed subspecies-level differences in the ability to produce quorum sensing molecules and induce aberrant crypt foci in colonic mucosal surface in a colitis-associated colorectal cancer murine model.

研究分野：細菌学

キーワード：Fusobacterium nucleatum バイオフィーム クォーラムセンシング 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

外部環境と接する皮膚や口腔を含めた消化管などにおいては、宿主免疫系と常在細菌が協調して生体恒常性を維持している。近年、次世代シーケンサーによる遺伝子解析(メタ 16S 解析、メタゲノム解析)によって、皮膚および粘膜面における常在細菌叢のバランス異常“dysbiosis”が様々な慢性炎症疾患の病態形成に関与する可能性が示唆されている。しかしながら、細菌叢の群集組成データから病態形成と関連する細菌因子を特定することは困難である。

慢性感染症である歯周病罹患者の口腔は、細菌・エンドトキシン・炎症性メディエーターを豊富に含み、歯周局所だけでなく全身に影響を与えている(Hajishengallis, *Nat Rev Immunol*, 2015)。とくに、歯周病とメタボリック症候群は相互に影響を与えあうことが知られている。また、生活習慣病の肝の表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患が進展するインフラマソーマ欠損マウス腸内では、*Porphyromonadaceae/Prevotellaceae* の増加を特徴とする **dysbiosis** が報告された(Henao-Mejia et al. *Nature*, 2012)。さらに肝硬変患者の糞便中には、口腔由来の細菌 (*Streptococcus/Veillonella* など) の定着を特徴とする **dysbiosis** が報告されている(Qin et al. *Nature*, 2014)。口腔内病原体である *Fusobacterium nucleatum* は、大腸がん患者の便から高頻度に検出され、大腸がんの進行に関与していることも報告がされている(Kostic et al. *Genome Res*, 2012; Gholizadeh et al. *Biomed Pharmacother*, 2017)。これらの報告から、口腔内病原体による異所性定着が様々な疾患の病態形成に関与している可能性が示唆されている。

細菌の表現型は、細菌間の相互作用によって影響を受ける。細菌が産生するシグナル分子を介した細菌間相互作用は、クォーラムセンシング(QS)と呼ばれる。QS とは、オートインデューサー(AI)と呼ばれる化学物質の細菌外濃度を感知し、細菌密度依存的な遺伝子発現を制御する細菌間情報伝達機構である。現在までに、様々な細菌における多様な表現型(例 運動性、芽胞形成、形質転換、抗菌物質生産、バイオフィーム形成、病原性など)が QS 機構によって制御されていることが明らかとなっている。現在までに同定されてきた QS 機構に関連するシグナル分子は、グラム陰性細菌からは Acyl-homoserine lactones(AHLs, AI-1) と AI-3、グラム陽性細菌からは Autoinducing peptides(AIPs)、さらにグラム陰性・陽性問わず、多様な細菌が産生する AI-2 が知られている。AI-2 は異種細菌間 QS を担うシグナル分子であり、口腔バイオフィーム(Guo et al. *Front Microbiol*, 2014)や腸内細菌叢(Hsiao et al. *Nature*, 2014)の構造や機能に影響を与える。また、*P. gingivalis* などの口腔病原体は AI-2 産生能が高いことも報告されており、口腔病原体由来の AI-2 が腸内細菌叢の構造や表現型に影響を与えている可能性もある(Cvitkovitch et al. *J Clin Invest*, 2003)。そこで本研究では、細菌の表現型に着目して常在細菌叢の機能的変性を解明することで、**dysbiosis** 関連疾患の病態形成に関わる細菌-宿主間相互作用の発見に繋がると考えた。

2. 研究の目的

dysbiosis 関連疾患の病態形成メカニズムを解明するためには、次世代シーケンサーを活用したマイクロバイオーム解析だけでなく、病態形成に関連する細菌の表現型を理解する必要がある。細菌は、生育条件に応じて各種遺伝子の発現を制御し、環境適応している。そこで本研究では、大腸がんとの関連性が指摘されている *Fusobacterium nucleatum* をモデルケースとして、AI-2 を介した QS 機構による細菌の表現型可塑性を分子レベル(トランスクリプトーム、プロテオーム)で解析することを目的とする。さらに、宿主細胞あるいは異種細菌との直接的な相互作用因子である細菌表面タンパク質に限定したメタプロテオーム解析アプローチを用いて、病態形成期におけるバリア臓器内の環境変化に対する常在細菌叢の機能的変質を評価することを試みる。

3. 研究の方法

(1) 口腔細菌の AI-2 産生能評価

Fusobacterium 属 5 株(*F. nucleatum subsp. animalis*, *F. nucleatum subsp. fusiform*, *F. nucleatum subsp. polymorphum*, *F. periodoticum*, *F. varium*)に加えて、*P. gingivalis*、*Streptococcus* 属 6 株、*Prevotella* 属 3 株を用いて、口腔細菌の AI-2 産生能を評価した。各細菌の培養上清を用いて、AI-2 レポーター株である *V. harveyi* BB170 株を用いた発光値を測定した。なお、多様な細菌種の AI-2 産生量を比較するため、ポジティブコントロールの *Vibrio harveyi* BB152 株における AI-2 産生量を 100 とし、各細菌の発光値を相対的に評価した。

(2) AI-2 産生能が異なる *Fusobacterium* 属細菌の相互作用解析

低 AI-2 産生細菌である *F. nucleatum subsp. fusiforme* (FnF, JCM11024) および高 AI-2 産生細菌である *F. nucleatum subsp. polymorphum* (FnP, JCM12990) を相互作用させた場合の表現型(例 増殖能、バイオフィーム形成能など)の変化を解析した。培養器として 12 ウェルプレートを使用し、菌体を透過せず産生物質のみを透過するポリエステル製半透膜が底面に張られているインサート(greiner、孔径 0.4 μm)を各ウェルに設置した。FnF と FnP の単独培

養および共培養のため、インサート上部または下部に初期菌体濃度が 1.0×10^6 CFU/mL となるように調製した。その後、アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）を用いて、嫌気環境下で培養を行った（37、72時間）。なお、バイオフィーム形成能を評価する際には、12 ウェルプレート（ウェル底面に Poly-L-lysine (PLL) 処理済みカバーガラス（松浪硝子、直径 12 mm）を設置した。カバーガラス上に形成したバイオフィーム量はクリスタルバイオレット染色法によって定量した。

(3) トランスクリプトーム解析

単独培養時と共培養時の FnF の遺伝子発現の違いを解析するために、RNA-seq を行った。培養液から遠心分離（15,000 rpm、4、3分）して菌体を回収し、PBS で 2 回洗浄した。その後、RNAprotect® Cell Reagent を添加して再度遠心分離（15,000 rpm、4、3分）して菌体を回収し、RNA を抽出するまで -80 の冷凍庫で保存した。抽出した RNA は、NanoDrop（Thermo Fisher Scientific）で濃度を測定した。RNA Integrity Number (RIN) の測定、DNase 処理、ライブラリー作成、Novaseq6000 (illumina) によるシーケンシングは、ゲノムリード株式会社の受託解析を利用した。

(4) 細胞表面タンパク質を標的とした表現型解析

細菌の表層のタンパク質には、接着因子やトランスポーターなど、バイオフィーム形成やシグナル伝達に参与する代謝物の細菌内外の輸出入を担う因子が多く存在している。そこで、高 AI-2 産生株 FnP と低 AI-2 産生株 FnF の表層タンパク質の発現量について、Two Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) で解析することを試みた。本研究では、Cell surface protein isolation kit (abcam) を用いて、細菌の細胞表面タンパク質を抽出した。抽出タンパク質は、IC3-OSu special packaging (同仁化学) および IC5-OSu special packaging を用いて蛍光標識した。本研究においては、単独培養時または共培養時の FnF の表面タンパク質を IC3 で標識し、内部標準試料として単独培養した FnF のタンパク質と共培養したタンパク質を等量混合したものを IC5 で標識した。タンパク質 (1 µg) を Auto-2D (SHARP) を用いて電気泳動し、Chemidoc touch MP (Bio-Rad) で撮影した。

(5) AI-2 産生能の異なる Fusobacterium 属細菌が腸炎関連大腸がんモデルに与える影響評価

腸炎関連大腸がんモデルを用いて、AI-2 産生能の異なる Fusobacteria 属細菌 (FnF, FnP) の病態進展への影響を評価した。実験方法としては、6 - 7 週齢の雄マウスの腹腔にアゾキシメタン (AOM, 12.5 mg/kg-b.w.) を投与し、AOM 投与 1、4、7 週間後に 2% デキストラン硫酸塩 (DSS) 水溶液を 5 日間投与する。各 DSS 投与終了から 1 週間、FnP 菌および FnF 菌の生菌 (10^9 cells/ml) を経胃投与する。10 週間後に、腫瘍発生頻度・腫瘍サイズを解析した。

4. 研究成果

(1) 口腔細菌の AI-2 産生能評価

AI-2 産生能の比較結果より、本研究で用いた Streptococcus 属の細菌株はいずれも AI-2 産生能が低く、Fusobacterium 属および Prevotella 属の細菌では (亜) 種間で AI-2 産生能が異なることがわかった。なお、F. nucleatum subsp. polymorphum および P. gingivalis は高い AI-2 産生細菌であることを見出した。

(2) AI-2 産生能が異なる Fusobacterium 属細菌の相互作用解析

FnP (高 AI-2 産生菌) と共培養することによって、FnF (低 AI-2 産生菌) の増殖が有意に抑制され、FnP の増殖は亢進することが確認された。F. nucleatum は、口腔では歯周病において初期定着細菌と後期定着細菌の両者とのバイオフィーム形成に参与する細菌である。そこで、FnF および FnP の PLL コートカバーガラスへのバイオフィーム形成能をクリスタルバイオレット染色法で評価した。その結果、FnP はバイオフィーム形成能が著しく低かったが、FnF は単独培養に明瞭なバイオフィーム形成能を示した。一方、FnP と共培養した FnF はバイオフィーム形成能が著しく抑制されることが明らかとなった。

走査型顕微鏡観察 (SEM) を用いて細菌表面構造を観察したところ、単独培養時の FnF の細胞表面に遊離前の membrane vesicle (MV) が多数観察されたが、共培養時 FnF の細胞表面に遊離前の MV はほとんど観察されなかった。MV は、細菌表面から放出される 20~500 nm の脂質二重膜で構成される球状構造物であり、リポタンパク質、外膜タンパク質、リポ多糖 (LPS) などを内包している。MV は、細胞表面の疎水性を高め、細胞外マトリックスを増加させることで、バイオフィーム形成に寄与している。そのため、FnP との共培養による FnF のバイオフィーム形成量の減少は、MV 量の減少が関与していることが考えられる。

FnP の産生する AI-2 が FnF のバイオフィーム形成阻害に関与しているか検証するために、FnP 菌の AI-2 非産生株 (luxS 遺伝子欠損株) を作成することが必要である。しかしながら、研究期間中に FnP の luxS 遺伝子欠損株の樹立に至らなかった。

(3) 共培養に伴う FnF のトランスクリプトーム動態解析

FnP との共培養時と単独培養時の FnF の遺伝子発現の違いを、RNA-seq によって解析した。

その結果、**FnP** との共培養によって、**FnF** の mRNA の発現が増加あるいは減少した遺伝子が見出された。mRNA 発現量が増加した遺伝子としては、**rplJ1** 遺伝子（リボソームと GTP 結合翻訳因子との相互作用に関与するリボソームのストークの構成因子をコード）や **rpsM** 遺伝子（リボソームの **30S** サブユニットの構成因子をコード）などであった。一方、発現が有意に減少した遺伝子は、**tnaA** 遺伝子（L-トリプトファンからのインドールの生成を担うトリプトファンナーゼをコード）や **ribH** 遺伝子（リボフラビンの生合成に関与する因子をコード）などであった。インドールは、細菌のバイオフィーム形成の制御に関連することが報告されている。そこで、**FnP** のインドール産生能を調べたところ、**FnP** との共培養によって **FnF** のインドール産生能は **1/5** 以下に減少することが確認された。しかしながら、インドールを外部添加しても、**FnP** 共培養による **FnF** のバイオフィーム形成能は阻害されたままであったことから、**FnP** のバイオフィーム形成阻害機構は未解明のままである。

(4) 細胞表面タンパク質を標的とした表現型解析

細菌の表層には、バイオフィーム形成やシグナル伝達に関与するタンパク質が複数種類存在する。そこで、細胞表面タンパク質を対象にした **2D-DIGE** 解析によって、**FnP** との共培養によって、発現量が変化している **FnF** の細胞表面タンパク質を解析した。その結果、**FnP** との共培養によって、**FnF** において **AckA** の発現量が有意に増加していることが確認された。**AckA** は、**ADP** とアセチル **CoA** から合成されたアセチルリン酸から酢酸と **ATP** を合成する反応を触媒する酵素である。細胞内のアセチルリン酸は、大腸菌のバイオフィーム形成の調節因子である可能性が指摘されており、共培養によって **FnF** の **AckA** 発現量が増加し、アセチルリン酸が蓄積されないことで、**BF** 形成能に影響を与えている可能性が考えられた。

腸内細菌叢の表現型評価手法としての適用を目指すために、マウス糞便試料を用いて細胞表面タンパク質の **2D-DIGE** 解析を検討した。しかしながら、**2D-DIGE** に影響を与える夾雑物質の除去や表面タンパク質の収率の改善など、技術的課題が認められた。

(5) **AI-2** 産生能が異なる *F. nucleatum* が大腸がんの病態形成に与える影響

Methylene blue 染色の結果、**FnP** および **FnP** 投与群の大腸組織における前がん病変である **aberrant crypt foci (ACF)** の数が、細菌非投与群よりも有意に増加していた。とくに、高 **AI-2** 産生能を有する **FnP** 菌投与群で最も多くの **ACF** が観察された。また、肉眼的に明確に腫瘍として判定される部位も、対照群と比較して、**FnP** 菌投与群では有意な増加が確認された。また、糞便内細菌叢の解析を行ったところ、主要な細菌構成種としては、**Lachnospiraceae** 科、**Bacteroidaceae** 科、**Muribaculaceae** 科、**Lactobacillaceae** 科、**Erysipelotrichaceae** 科が検出された。ただし、各実験群の細菌叢の構成も比較的似通っており、細菌叢の構成に影響を与えるような目立った変化は観察されなかった。今後、**Fusobacterium** 属細菌の投与が **ACF** 数増加に関連する腸内細菌叢の機能的変性が生じているか検証していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Arisa Shiozaki, Toshifumi Osaka, Hidehiro Ueshiba, Satoshi Tsuneda, Junji Yagi, Naoko Yanagisawa
2. 発表標題 Biological effects of Fusobacterium nucleatum with different autoinducer-2 productivity
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川隼輔、塩崎有彩、常田聡、柳澤直子、大坂利文
2. 発表標題 細菌間コミュニケーションによるFusobacterium nucleatumの動態変化の解析
3. 学会等名 第106回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------