

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18481

研究課題名(和文) Fusobacterium nucleatumの共凝集メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of fusobacterial coaggregation with other oral bacteria

研究代表者

多田 彩乃 (Tada, Ayano)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80779463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：F. nucleatumは他の口腔内細菌と共凝集し、強固で複雑な口腔バイオフィルムを形成する。A. naeslundiiの培養上清によるF. nucleatumの遺伝子発現変化に注目し、共凝集シグナル分子を抽出した結果、D-fructose代謝関連遺伝子の発現上昇が認められた。D-fructose含有培地でF. nucleatumを培養すると、菌の増殖とバイオフィルム形成が促進し、歯肉上皮細胞であるCa9-22細胞への付着性が増加した。以上の結果より、栄養素等の外的環境の変化に対するF. nucleatumの適応が歯周病細菌の細胞付着性や病原性と密接に関連していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病と全身疾患との関連について、糖尿病や心疾患、誤嚥性肺炎、早産との関連性が明らかになっている。成人の70-80%が歯周病に罹患しており、残存歯数の増加に伴う高齢者での歯周病の増加も問題となっている。健康寿命の延伸が喫緊の課題であるわが国において、生涯にわたる歯周病予防は極めて重要である。F. nucleatumは歯周病関連細菌として知られており、他の口腔細菌や歯周病原細菌と共凝集する性質を持つ。この共凝集活性が多種多様な細菌による複雑なバイオフィルム形成を可能にし、プラーク形成に重要な役割を果たしている。このような共凝集因子の同定は新たな歯周病予防法の開発に多大な情報を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Fusobacterium nucleatum co-aggregates with other oral microbes. We found that the culture supernatant of A. naeslundii enhanced the growth and autoaggregation of F. nucleatum. Transcriptome analysis of F. nucleatum revealed that the expression of the genes for D-fructose utilization was up-regulated in response to the culture supernatant of A. naeslundii. In consistent with the finding, D-fructose promoted the growth of F. nucleatum and biofilm formation. Furthermore, the adherence of F. nucleatum to Ca9-22, human gingival cancer cell, when the bacterium was cultured in BHIS medium containing D-fructose. These results indicate that the adaptation of F. nucleatum to environmental changes such as nutritional status closely associates with the formation of complex bacterial consortium in subgingival region, resulting in the progression of periodontal diseases.

研究分野：口腔細菌

キーワード：Fusobacterium nucleatum バイオフィルム 共凝集

1. 研究開始当初の背景

口腔には700種を超える細菌が存在し、複雑な口腔細菌叢を形成している。歯周病は、プラークの蓄積による細菌感染が主な原因であり、細菌および細菌が産生する炎症惹起物質による歯肉炎症や歯槽骨の破壊などを特徴とする口腔疾患である。歯周病と全身疾患との関連はすでに知られており、糖尿病や心疾患、誤嚥性肺炎、早産との関連性が明らかになっている。成人の70-80%が歯周病に罹患しているとの調査結果があり、また、残存歯数の増加に伴う高齢者での歯周病の増加も問題となっている。健康寿命の延伸が喫緊の課題であるわが国において、生涯にわたる歯周病予防は極めて重要である。偏性嫌気性グラム陰性桿菌である *F. nucleatum* は歯周病関連細菌として知られており、他の口腔細菌や歯周病原細菌と共凝集する性質を持つ。この共凝集活性が多種多様な細菌による複雑なバイオフィーム形成を可能にし、歯肉縁上および歯肉縁下プラーク形成に重要な役割を果たしている。このような共凝集因子の同定は新たな歯周病予防法の開発に多大な情報を与えるものである。

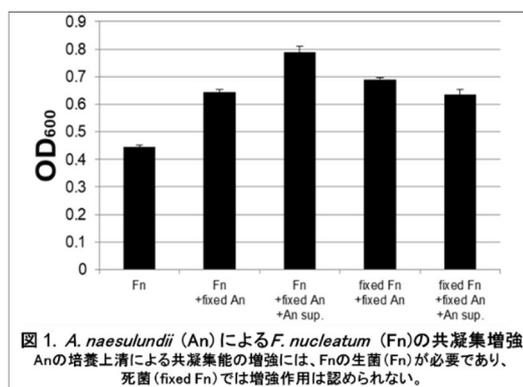
2. 研究の目的

本研究では、*F. nucleatum* の共凝集能を増強するシグナル分子の同定とシグナル伝達機構の解明を目指す。近年、口腔内バイオフィーム制御の標的として *F. nucleatum* に大きな関心が寄せられており、共凝集因子として FomA などの外膜タンパク質が同定されている。しかしながら、*F. nucleatum* は多様な口腔内細菌と共凝集するため、特定の細菌との共凝集分子の阻害のみでは十分なプラーク抑制効果が得られない可能性が高い。真に効果的なプラーク制御法の確立には、*F. nucleatum* がどのように他の口腔細菌を認識し、どのようなシグナル伝達経路を介してどのような遺伝子群の発現を変化させているのかを把握する必要がある。申請者は既に *A. naeslundii* の培養上清中に *F. nucleatum* の凝集能を増強する因子が存在することを見出している。本研究では *A. naeslundii* の培養上清をシグナル分子として利用し、*F. nucleatum* の凝集能を制御するシグナル伝達経路の全容を解明する。また、解明した遺伝子ネットワーク情報をもとに、*A. naeslundii* の培養上清中に存在するシグナル分子の本体を明らかにする。

3. 研究の方法

A. naeslundii の培養上清による *F. nucleatum* の遺伝子発現変化

本研究では共凝集能の高い *F. nucleatum* ATCC25586 株と *A. naeslundii* X-600 株を用いた。予備検討において、*A. naeslundii* の培養上清による *F. nucleatum* の凝集能増強作用は4時間をピークとすることが分かっている。また、生菌および4%パラホルムアルデヒドで固定した菌体を用いた検討から、この増強作用は *F. nucleatum* の生菌にのみ認められることから、*A. naeslundii* の培養上清中の多糖などを介した作用ではなく、*F. nucleatum* の生理学的変化に起因するものと考えられる(図1)。そこで、*A. naeslundii* の培養上清を50%含有する培地で *F. nucleatum* を2時間および4時間培養後、RNAを抽出した。比較対照は培養上清を含有しない培地で培養した *F. nucleatum* とした。Illumina HiSeq で1サンプルあたり4 Gbのシーケンス情報を取得し、*F. nucleatum* ATCC25586 株のゲノムにマッピングした。RPKM



値を比較し、*A. naeslundii* の培養上清を添加したサンプルで有意に発現量が変化する遺伝子群を抽出した。

A. naeslundii の培養上清中に存在する *F. nucleatum* の共凝集シグナル分子の同定

上記解析によって *A. naeslundii* の培養上清で発現誘導される遺伝子を同定し、トランスポーターなど遺伝子の相同性からシグナル分子を推定した。また、候補物質を含む培地および対照群として BHIS 培地で嫌気培養した *F. nucleatum* ATCC25586 株を 24 ウェルプラスチックプレートへ入れ、24 時間嫌気培養後にバイオフィーム形成量をクリスタルバイオレット染色法で比較した。また、*F. nucleatum* ATCC23726 株、臨床分離株 2 種の計 3 種の *F. nucleatum* を用いて ATCC25586 株と同様にバイオフィームアッセイを行った。

共凝集シグナル分子が及ぼす *F. nucleatum* の細胞付着性および細胞増殖への影響

共凝集シグナル分子の候補物質を含む培地および対照群として BHIS 培地で嫌気培養した *F. nucleatum* の生菌または 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定した死菌を FITC 標識し、歯肉上皮細胞 (Ca9-22) または大腸がん細胞 (HCT116 および HT29) と接触させ、細胞への付着菌量を fluorometer で定量・比較した。また、FITC 標識した *F. nucleatum* の生菌または死菌を各種細胞に 3 時間接触させ、細胞核を DAPI 染色後に蛍光顕微鏡で細胞への付着量を観察した。さらに、各種培養条件下での *F. nucleatum* の大腸がん細胞に対する増殖促進効果を CytoSelect WST-1 キットで評価した。

4. 研究成果

培養上清を添加したサンプルで有意に発現量が変化する遺伝子群を抽出した結果、D-fructose 代謝関連遺伝子の発現上昇が認められた (図 2)。そこで、D-fructose を含有する培地で *F. nucleatum* を培養すると宿主細胞への接着因子である Fap2 遺伝子の発現が上昇するとともに、歯肉上皮細胞である Ca9-22 細胞への付着性が増加した。さらに、D-fructose は *F. nucleatum* の増殖とバイオフィーム形成を促進した (図 3)。また、この現象は臨床分離株でも確認できた。さらに、栄養素の異なる培地で培養した *F. nucleatum* の生菌および死菌を HCT116 細胞へ付着させ、48 時間までの細胞増殖を WST-1 アッセイキットで評価すると、BHIS 培地と比較して 0.5% D-fructose 添加培地で培養した *F. nucleatum* は生菌および死菌ともに HCT116 細胞の増殖を促進した。以上の結果より、栄養素等の外的環境の変化が *F. nucleatum* の歯肉への付着性や増殖能に影響することが明らかになった。デンタルプラーク内での環境適応が歯周病細菌の細胞付着性及び病原性と密接に関連していると考えられた。

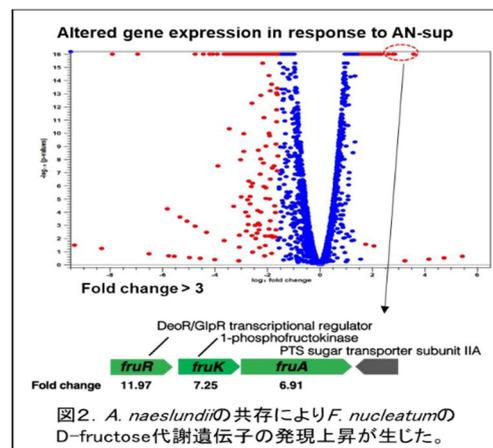


図2. *A. naeslundii* の共存により *F. nucleatum* の D-fructose 代謝遺伝子の発現上昇が生じた。

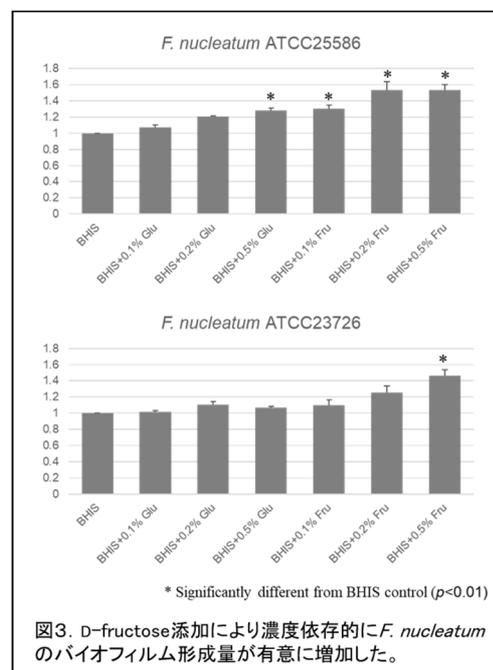


図3. D-fructose 添加により濃度依存的に *F. nucleatum* のバイオフィーム形成量が有意に増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tada Ayano, Nakayama-Imaohji Haruyuki, Yamasaki Hisashi, Elahi Miad, Nagao Tamiko, Yagi Hirofumi, Ishikawa Masao, Shibuya Koji, Kuwahara Tomomi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of thymoquinone on <i>Fusobacterium nucleatum</i> -associated biofilm and inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 643 ~ 650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.11136	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 Elahi Miad, Nakayama-Imaohji Haruyuki, Hashimoto Masahito, Tada Ayano, Yamasaki Hisashi, Nagao Tamiko, Kuwahara Tomomi	4. 巻 10
2. 論文標題 The Human Gut Microbe <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> Suppresses Toxin Release from <i>Clostridium difficile</i> by Inhibiting Autolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 187 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10020187	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多田彩乃、今大路治之、桑原知巳
2. 発表標題 Inhibitory effect of thymoquinone on biofilm formation and inflammation induced by <i>Fusobacterium nucleatum</i>
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多田彩乃、今大路治之、桑原知巳
2. 発表標題 <i>Fusobacterium nucleatum</i> 含有バイオフィルムに対するチモキノンの効果
3. 学会等名 第69回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多田彩乃、今大路治之、桑原知巳
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatumの細菌-宿主相互作用に与えるD-フルクトースの影響
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------