

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17020

研究課題名（和文）歯周病の再発や慢性化の原因として細菌Persisterの関与を明らかにする

研究課題名（英文）Identifying the Involvement of the Bacterium Persister as a Cause of Recurrent or Chronic Periodontal Disease

研究代表者

山崎 亮太（Yamasaki, Ryota）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70841998

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）：歯周病はおもに口腔内の病原細菌によって引き起こされる疾患であるが、歯周病患者に対しいかに薬剤を使用しても口腔病原細菌を完全に排除することは難しく、治療後はすぐに増殖し再発のリスクを生じる。薬剤治療に対し細菌が生存してしまう原因の1つに“Persister”がある。歯周病においても薬剤治療でごく一部の歯周病原細菌がPersister形成し生き残ってしまうため、再び増殖してしまい、持続化させてしまうと考えられる。本研究では、薬剤治療におけるPersisterのリスクを明らかにし、そのメカニズム解明と完全に排除する方法を見出し、歯周病の慢性化や再発の抑制に関する新たな知見を得ることを目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人の約8割が歯肉炎や歯周炎を患っているとされるほど、世界的にも最も多い感染症の一つとされる。さらに歯周病は慢性化することが問題となっているが、最も大きな要因は歯周病原細菌の存在である。これら歯周病原細菌が歯科治療後に再発することがしばしばあるが、その原因として「口腔細菌のPersister化」を提案する。Persisterという新たな概念をもとに、これまでとは異なる歯周病の治療や予防法を提唱し、歯周病の根治や再発を防ぐための効果的な方法を確立することで、歯周病の根治または歯周疾患リスクの低減という社会的意義をもつ。

研究成果の概要（英文）：Periodontal disease is primarily caused by pathogenic bacteria in the oral cavity, but no matter how many drugs are used to treat patients with periodontal disease, it is difficult to completely eliminate the oral pathogenic bacteria, which quickly multiply and pose a risk of recurrence after treatment. One of the causes of bacterial survival in response to drug therapy is “persister”. In periodontal disease, a small percentage of periodontopathogenic bacteria may survive drug treatment by forming persisters, which may lead to re-growth and persistence of the disease. The purpose of this study is to clarify the risk of Persister in drug therapy, to elucidate its mechanism, to find a method to eliminate it completely, and to obtain new knowledge on the control of chronicity and recurrence of periodontal disease.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：Persister A. actinomycetemcomitans 歯周病 過酸化水素

1. 研究開始当初の背景

歯周病はおもに口腔病原細菌により惹起され、成人の多くが罹患している疾患である。超高齢社会となった我が国では、要介護高齢者の口腔管理により誤嚥性肺炎の発症が抑えられるという調査研究報告が発表され、にわかに口腔細菌と全身疾患に関する研究が注目されるようになった。そのなかで口腔病原細菌が、口腔疾患にとどまらず、感染性心内膜炎やアルツハイマー型認知症、糖尿病など、種々の全身疾患にも影響を及ぼすことが明らかにされている。このように重篤な全身疾患と関わりがあり、多くの成人が罹患している歯周病は、治療が奏効せず、高い再発率や根治が難しい点が問題となっている。その原因として、口腔内細菌の多種多様な因子が研究されてきたが、本申請では、その一因として、生体の免疫応答や抗生物質に対して、抵抗性を示す細菌の“Persister化”に着目する。Persisterとは微生物集団のごく一部が代謝的に休止状態をとり、抗生物質や飢餓状態に耐え得る表現型の細菌である。薬剤などのストレスが緩和されると、Persisterは再び増殖を始める。このPersisterの存在が感染症や疾病の再発などに影響するとして問題になっている。歯周病などの口腔疾患もまたPersisterの存在が、薬剤治療や免疫応答に抵抗を示し、難治・慢性化しているのではないかと我々は仮説を立てている。しかし、現在に至るまで口腔病原細菌が形成するPersisterに関する研究はほとんど行われていない。そのため、本研究では口腔細菌Persisterがどのように歯周病を始めとする口腔感染症に影響を及ぼしているかを解明し、治療・予防戦略の確立につながる研究を展開していく。

2. 研究の目的

慢性化する歯周病の原因として、歯周病細菌が形成するバイオフィルムによって薬剤治療への感受性が低下することや、生体の免疫反応から逃れる様々なエスケープ機構を有していることが考えられる。本研究では、新たな概念として「口腔細菌のPersister化」という着眼点で研究に着手する。いくつかの細菌種(特に大腸菌)によるPersisterの研究は行われているが、口腔細菌を扱った先行研究はほとんどなく、本研究はきわめて独創的で新規性が高く、かつ歯科医学的にも重要な意義をもたらすと考える。ゆえに、本研究の目的は、口腔病原細菌を薬剤処理した際のPersisterの存在率や形成メカニズムを明らかにすることと、その口腔細菌Persisterを完全に排除する方法を見出すことでより効果的な歯周病治療や予防の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 過酸化水素に対する口腔病原細菌のPersister化の検証

歯周病を引き起こす口腔病原細菌の一つとされる、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 に対し、実際に歯科治療で使用されている薬剤の一つである過酸化水素を作用させ、処理前後での生存率をもとにPersisterの形成率を検証する。また、生存した細菌が変異による薬剤耐性菌ではないことの確認を行う。

(2) Persister化のメカニズム解明

過酸化水素に対して *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 がどのようなメカニズムでPersisterを形成し、逃れたかを解明する。薬剤処理前後それぞれの細菌から mRNA を抽出し、遺伝子の発現量を RNA シーケンスにより比較する。

(3) Persisterの死滅・排除

過酸化水素処理を耐えて生存した *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 を完全に死滅させて排除するために、大腸菌Persisterの死滅を可能とするマイトマイシン C での処理を試みる。

4. 研究成果

(1) 過酸化水素処理に対して *A. actinomycetemcomitans* はPersisterを形成して生存する

対数増殖期の *A. actinomycetemcomitans* Y4 に対して $4 \times \text{MIC}$ である 0.06 v/v% の過酸化水素で処理すると、3時間で99.5%が死滅したが、それ以降で生存菌数(0.5%)が定常化し24時間目まで生存し続けることが確認された(図1左)。また、過酸化水素処理を生存した細菌を薬剤フリーのBHI培地で再増殖させ、再度同じ濃度の過酸化水素で処理した結果、同程度の死滅が確認されたため、遺伝的な薬剤耐性変異体ではなく、Persisterであることを証明した(図1右)。

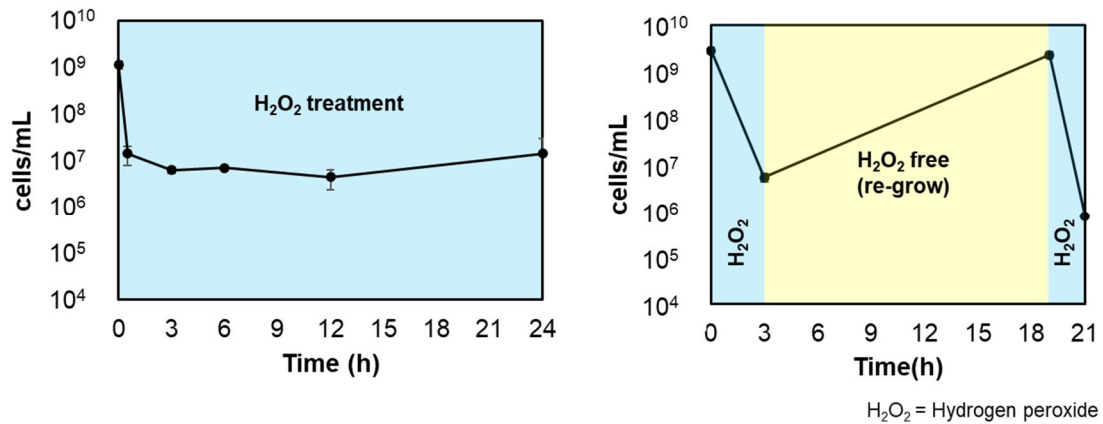


図1. 過酸化水素 (0.06 v/v%) による *A. actinomycetemcomitans* Y4 の殺菌曲線(左)と、処理後に再増殖させた *A. actinomycetemcomitans* Y4 が薬剤耐性菌かどうかの確認(右)

また、Persister を形成した細菌は通常の活性状態の細菌と比べると、分裂を開始するまでの時間が大きく異なることが報告されているため、過酸化水素処理の *A. actinomycetemcomitans* Y4 と未処理の *A. actinomycetemcomitans* Y4 を BHI ゲルパッド上で顕微鏡で観察を行いながら培養した。その結果、未処理（増殖期）の細菌は全体の約 97%がおおよそ 1.5~2 時間で分裂を開始したのに対し、過酸化水素処理した細菌は分裂を開始した時間が 1.5~6 時間と大きくばらつきが生じた。ゆえにこの結果からも Persister を形成したことが裏付けられた。

(2) 過酸化水素による Persister の形成は Lsr トランスポーターが大きく関与している

過酸化水素で処理した *A. actinomycetemcomitans* Y4 と未処理の *A. actinomycetemcomitans* Y4 から mRNA を抽出し、RNA シーケンスによる解析を行い比較した。その結果、Lsr トランスポーターに関与する遺伝子が過酸化水素処理群で大きく増加していることが明らかとなった。とくに *lsrA* と *lsrC* の増加率が大きく、それぞれ 2.51 倍と 5.28 倍であった。Lsr トランスポーターはオートインデューサー AI-2 の取り込みに関与するタンパク質であるため、クオラムセンシングが Persister に関与することを示唆している。AI-2 の発現に関与する遺伝子である *luxS* は 0.95 倍とほぼ変化がなかったことから、オートインデューサーの発現量自体には影響はなく、外部からの取り込みを強めるものであることがわかった。過酸化水素の殺菌機序は生じる活性酸素種によるものであるが、それらを打ち消すカタラーゼの遺伝子発現量も 2.52 倍と大きく増加していた。カタラーゼは AI-2 によっても制御されることがわかっており、Lsr トランスポーターによる AI-2 の取り込み向上がカタラーゼの活性を上昇させ、活性酸素の消去につながっていることが示唆された。また、Lsr オペロンの制御におけるグリセロールの関与も過去に報告されており、リン酸化されたグリセロール（グリセロール 3-リン酸）は、cAMP-CRP を抑制し、Lsr オペロンの活性化を阻害する。グリセロールは、様々な生物の代謝や発酵に用いられる重要な資源である。過酸化水素はリボソームの翻訳活性を不活性化し、persister を形成する細菌は代謝活動を停止していることから、グリセロール発酵が抑制されていると考えられる。したがって、過酸化水素処理によって persister を形成する *A. actinomycetemcomitans* はグリセロール 3-リン酸を産生せず、cAMP-CRP は阻害されず正常に活性を維持するため、Lsr オペロンが活性化される。その結果、過酸化水素ストレスに対して persister を形成して生き残り、AI-2 の取り込みにつながる。さらに、cAMP-CRP は persister のリボソーム活性に大きく関与しており、リボソームレスキュー因子 Hfq を抑制し、リボソームの休眠、すなわち persister を誘導する。さらに、翻訳系（SsrA）を介したリボソームレスキューが persister の蘇生に重要であると報告されている。今回過酸化水素処理した *A. actinomycetemcomitans* ではこれら 2 つの遺伝子 (*hfq* と *ssrA*) の発現量が、*hfq* は 0.91 倍、*ssrA* は 0.31 倍に抑制された。AI-2 の関与、カタラーゼによる酸化ストレスの回避、さらにはリボソーム活性の不活性化など、様々なメカニズムの誘導が、過酸化水素処理による生存をもたらす。これらの考察をまとめると以下ようになる； 1. 過酸化水素ストレスは Lsr ファミリーの発現と AI-2 の取り込みを増加させる。AI-2 は Lsr ファミリーのリプレッサーである LsrR を抑制するため、Lsr ファミリーのさらなる発現を促進する。2. AI-2 の取り込みの増加はカタラーゼの産生を増加させ、過酸化水素から発生する活性酸素種を除去する。3. 代謝活性の低下は解糖系を停止させるため、グリセロール 3-リン酸は産生されず、cAMP-CRP 活性も抑制されない。これにより、Lsr ファミリーの発現がさらに誘導され、リボソームレスキュー因子である Hfq が抑制される。また、もう一つのリボソームレスキュー因子である SsrA も抑制され、リボソームが不活性化される（図 2）。

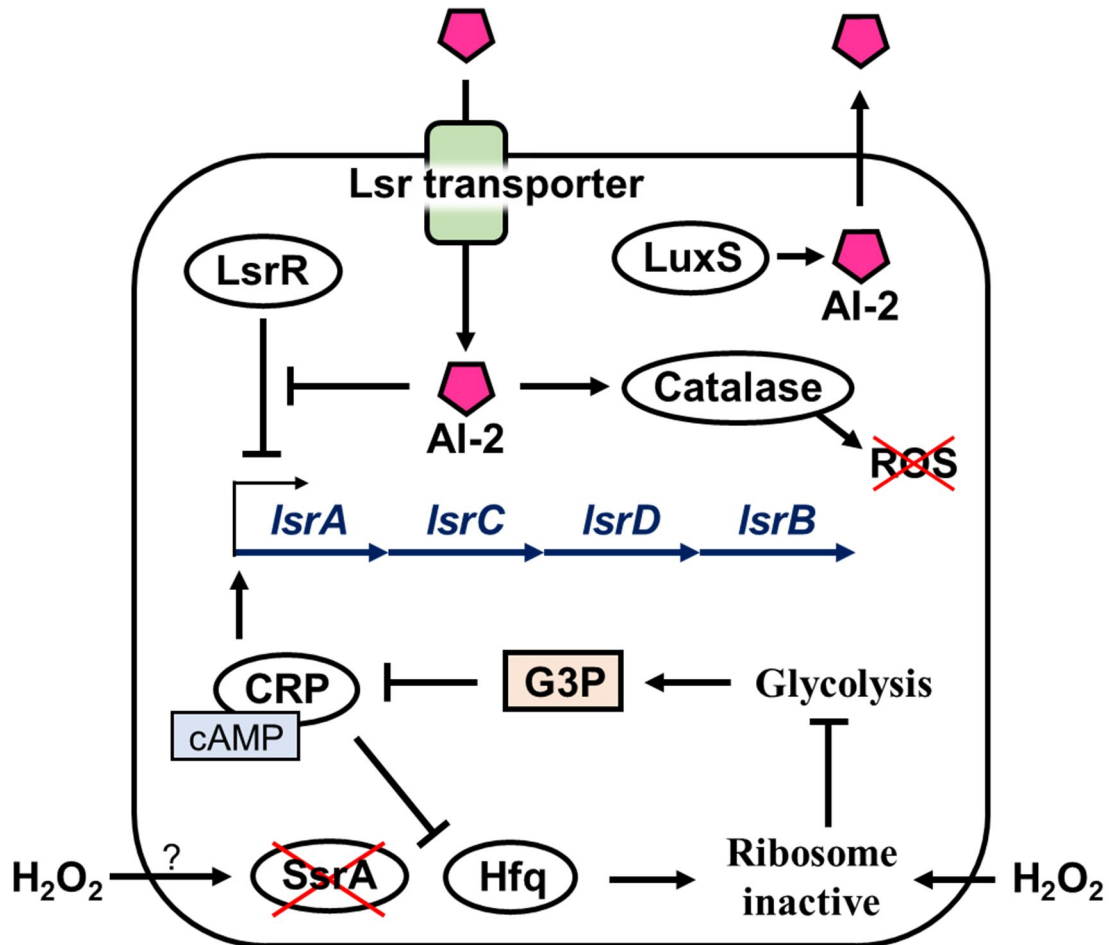


図2 . RNA 発現レベルから推測されるメカニズム。 → は誘導, ⊣ は抑制を示す . × は抑制または消去を示す。

(3) マイトマイシン C は過酸化水素処理を生存した *A. actinomycetemcomitans* Y4 persister を死滅させる

0.06 v/v%の過酸化水素で3時間処理した *A. actinomycetemcomitans* Y4 をさらに 10×MIC のマイトマイシン C で殺菌を試みた結果、30分で大まかに減少し、3時間以降で完全に死滅させることが明らかとなった。

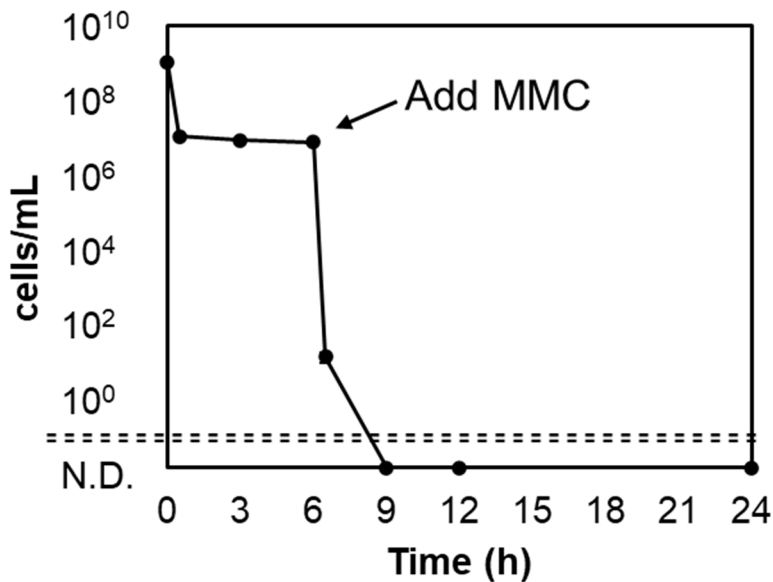


図3 . 過酸化水素処理後の *A. actinomycetemcomitans* persister に対するマイトマイシン C の殺菌効果。

以上の結果から、過酸化水素による歯科治療で歯周病原細菌が Persister を形成し、残存してしまう、すなわち歯周病の再発のリスクが存在することが明らかとなった。Persister の形成メカ

ニズムは RNA シーケンスによる遺伝子発現量の結果をもとにした推測であるため、今後追及していく必要があるが、Lsr トランスポーターによる AI-2 の取り込みが重要であることがわかった。また、形成した Persister はマイトマイシン C で処理することで完全に死滅させることも明らかにしたが、強力な抗がん剤であるため、歯周病治療として臨床応用するためには、より生体への影響が低い薬剤等を見い出していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura Yohei, Watanabe Koji, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru, Yamasaki Ryota	4. 巻 11
2. 論文標題 Persistor Cell Formation and Elevated IsrA and IsrC Gene Expression upon Hydrogen Peroxide Exposure in a Periodontal Pathogen <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1402 ~ 1402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms11061402	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 Okamoto Kentaro, Kudo Daisuke, Phuong Dao Nguyen Duy, Iwamoto Yoshihito, Watanabe Koji, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru, Yamasaki Ryota	4. 巻 13
2. 論文標題 Magnesium Hydroxide Nanoparticles Inhibit the Biofilm Formation of Cariogenic Microorganisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 864 ~ 864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano13050864	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 Takada Kazuya, Nakano Shizuki, Nishio Reina, Muku Daichi, Mochizuki Shinichi, Inui Inori, Okita Kaede, Koga Ayaka, Watanabe Koji, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru, Yamasaki Ryota	4. 巻 66
2. 論文標題 Medicinal herbs, especially Hibiscus sabdariffa, inhibit oral pathogenic bacteria	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 179 ~ 187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2024.01.006	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 Okamoto Kentaro, Kudo Daisuke, Phuong Dao Nguyen Duy, Iwamoto Yoshihito, Watanabe Koji, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru, Yamasaki Ryota	4. 巻 13
2. 論文標題 Magnesium Hydroxide Nanoparticles Inhibit the Biofilm Formation of Cariogenic Microorganisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 864 ~ 864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano13050864	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 Okita Kaede, Yamasaki Ryota, Nakamura Yohei, Sakakura Tatsuya, Kawano Aki, Takatsuji Yoshiyuki, Haruyama Tetsuya, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru	4. 巻 113
2. 論文標題 Quick and environmentally friendly sterilization process of dental instruments by radical vapor reactor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Process Biochemistry	6. 最初と最後の頁 22 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.procbio.2021.12.014	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9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yohei Nakamura, Ryota Yamasaki, Yoshie Yoshioka, Wataru Ariyoshi
2. 発表標題 Elucidation of the persistence formation mechanism of Aggregatibacter actinomycetemcomitans caused by hydrogen peroxide treatment
3. 学会等名 IAPD2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takada Kazuya, Ryota Yamasaki, Yoshie Yoshioka, Koji Watanabe ¹ , Katura Saeki, Wataru Ariyoshi
2. 発表標題 Persistence of oral pathogenic bacteria causing infective endocarditis to antibiotics
3. 学会等名 IAPD2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎 亮太, 中村 鷹平, 沖田 楓, 吉岡 香絵, 有吉 渉
2. 発表標題 休眠・冬眠研究の最前線 細菌"Persister"と歯周病持続化の関連
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沖田 楓、山崎 亮太、中村 鷹平、吉岡 香絵、有吉 渉
2. 発表標題 マクロファージに貪食されたAggregatibacter actinomycetemcomitans Persisterの生理的動態
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryota Yamasaki, Yoshie Yoshioka, Wataru Ariyoshi
2. 発表標題 -glucan from baker's yeast inhibits Streptococcus mutans biofilm
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 亮太、中村 鷹平、沖田 楓、吉岡 香絵、有吉 渉
2. 発表標題 細菌“Persister”と歯周病持続化の関連
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 亮太、吉岡 香絵、有吉 渉
2. 発表標題 パン酵母 -グルカンによるStreptococcus mutansバイオフィルムの形成抑制効果
3. 学会等名 第96回日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yohei Nakamura, Ryota Yamasaki, Wataru Ariyoshi, Yoshie Yoshioka
2. 発表標題 Elucidation of the persistence formation mechanism of <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> caused by hydrogen peroxide treatment
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaede Okita, Ryota Yamasaki, Yohei Nakamura, Yoshie Yoshioka, Wataru Ariyoshi
2. 発表標題 Physiological dynamics of <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Persister phagocytosed by macrophages
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference 2022 (国際学会)
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
---------	---------