

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592872

研究課題名(和文) 菌体外DNA・蛋白複合体を標的とした口腔バイオフィーム感染症の予防と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of extracellular DNA-protein complex-targeting novel treatments and prevention for oral biofilm-related infectious diseases

研究代表者

湯本 浩通 (YUMOTO, Hiromichi)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：60284303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：菌体外DNAとヒストン様DNA結合タンパク(HLP)は、Biofilmの成熟や安定性に重要な役割を演じ、菌体外DNAは、Candida biofilm成熟中に酵母型から菌糸型へ形態変化を誘導する事を示した。また2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-polymerは、歯周病細菌やToll-like receptor-2リガンドの上皮細胞への付着・結合を阻害し、IL-8産生も抑制する事も示した。以上より、菌体外DNAやHLPはBiofilm関連感染症に対する治療の標的となり、MPC-polymerは口腔感染症予防に有用である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Extracellular DNA and histone-like DNA binding protein (HLP) play crucial roles in biofilm development and its rigidity. eDNA also induces the morphological transition from yeast to hyphal growth form during Candida albicans biofilm development. MPC-polymer treatment significantly reduced the adherence of Porphyromonas gingivalis, major periodontitis-related pathogen, on oral keratinocytes and inhibited TLR2-mediated IL-8 production by blocking the binding of its specific-ligand in a concentration-dependent manner. This study suggests that eDNA- and HLP-targeting strategies may be applicable to novel treatments for bacterial biofilm-related infectious diseases and MPC-polymer is potentially useful for oral care to prevent oral infection.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 感染症 細菌 細胞・組織 遺伝子 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔細菌は、歯面・口腔粘膜や人工修復物等の固体表面に付着・定着して、Biofilm を形成する。そして口腔 Biofilm 中の細菌が、呼吸器系や循環器系に侵入し、慢性気道感染症、感染性心内膜炎、動脈硬化や骨髄炎のような全身疾患を発症させる事も多数報告されており、特に現在、加速度的に進んでいる高齢化社会において、抵抗力の低下した高齢者では、時として死に至る重大な問題となっている。このような現状を考慮すると、口腔 Biofilm 感染症の予防や治療法を確立する事は、我々の歯科界が果たすべき大きな課題・責務であると考えられる。

(2) 我々は、これまでに細菌 Biofilm 感染症である齲蝕・根尖性歯周炎や歯周病の病因や病態を細菌学的及び分子細胞生物学的に解析を行ってきた(Caries Res 1993, J Endod 1993, 2003, J Dent Res 2007, Oral Microbiol Immunol 2008)。近年、Histone 様 DNA 結合蛋白質(Histone-Like DNA binding Protein; HLP)が、レンサ球菌(Streptococci)の生存に必須である事や菌体外にも分泌される事を見出し、さらに Streptococcus 属においてアミノ酸配列レベルで 89%以上という非常に高い homology を示し、高度に保存されている遺伝子・蛋白質であることを明らかにした(Cell Microbiol 2008, Mol Microbiol 2008)。興味深い事に、HLP の発現を down-regulate させると、Biofilm 形成メカニズムの Quorum Sensing 機構において Auto Inducer の発現に関与する LuxS の発現も抑制された(Mol Microbiol 2008)。すなわち、HLP が Biofilm 形成抑制・破壊の標的分子となる可能性が示唆され、これに一致して、グラム陰性菌の Histone 様蛋白も Biofilm 形成を調節する重要な役割を演ずるといった報告もある(Dalai ら Microb Pathog 2009)。

(3) さらに HLP が単球に炎症性サイトカイン

を発現誘導させる事を明らかにし、感染局所において炎症反応を惹起・増強させる可能性を示唆した(Cell Microbiol 2008)。近年、細菌種を超えて広く保存されている HLP の遺伝子伝播・伝達(Gene Delivery)機能・一本鎖 RNA と結合して遺伝子の転写・発現や蛋白の翻訳制御を行う機能や細菌由来 DNA が自然免疫機構の TLR9 を介して免疫反応を惹起させる事や菌体外 DNA (extracellular DNA; eDNA)量が Biofilm 形成とその構造維持等を決定づける重要な因子である事が報告されている(Peterson ら J Bacteriol. 2004)。

(4) また我々は、Biofilm 形成を抑制する手段の開発を目的として、水溶性 MPC-polymer で表面処理すると、hydroxyapatite や上皮細胞表面への口腔細菌の付着や Biofilm 形成を抑制し、さらに異種細菌間の付着も抑制した。加えて、臨床試験により 30 秒間の含嗽は、よる口腔内の *S. mutans* の増殖を 5 時間抑制する事を報告した(J Dent Res 2011)。

(5) これらの成果による eDNA や HLP の Biofilm 形成における役割と病原性を考慮すると、Biofilm 形成抑制・破壊の標的分子として eDNA や HLP を分子レベルでより詳細に解析する事より、新規の口腔 Biofilm 感染症の予防や治療法を開発できるのではないかという発想を得た。

2. 研究の目的

現在、齲蝕・歯周病や難治性根尖性歯周炎等の口腔疾患の大部分は、細菌 Biofilm が原因という概念が認識されている。本研究では、Biofilm が菌体外 Matrix に被覆された特別な環境で、その形成や病原性が発現される事に着目し、菌体外環境因子という新たな視点から、菌体外 Matrix 中に多量に存在する eDNA や DNA 結合蛋白の役割を遺伝子や分子レベルで網羅的かつ詳細に解析し、Biofilm 形成と病原性の発現に鍵となる遺伝子や分子群を同定する事を目的とした。これらの解析は、耐性菌の出現原因となる耐性遺伝子等の遺伝子水平伝播、抗菌剤抵抗性や Biofilm 形成に関与する Quorum sensing 機構に関与する分子を標的としたワクチンの開発に結び付く

可能性がある。さらに臨床応用を目指して、網羅的分子生物学的解析結果を利用して、細菌付着や Biofilm 形成を抑制し、またその構造破壊能を有する新規の材料や薬剤の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Biofilm 形成及びその安定性に対する DNase I 処理の影響についての解析：*Streptococcus intermedius* ATCC27335 の初期培養液に DNase I (200 U/ml)を添加して 24 あるいは 48 時間培養して Biofilm を形成させた。Crystal violet 染色後、形成された Biofilm を 540 nm の吸光度にて測定して定量した。また 48 時間培養後、走査型電子顕微鏡(SEM)観察も行った。加えて、24 時間培養して形成された Biofilm に DNase I (200 U/ml)を添加して、さらに 24 時間培養後、Crystal violet 染色し、形成された Biofilm を 540 nm の吸光度にて測定し定量した。eDNA 染色は、7-hydroxyl-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one) (DDAO; 2 μmol/l)を用いて 30 分間行い、洗浄後、未固定で共焦点顕微鏡観察を行った。

(2) Biofilm 中の eDNA と HLP の局在の蛍光顕微鏡下での観察：*S. intermedius* ATCC27335 を 48 時間培養して形成した Biofilm を blocking 後、ウサギ抗 *Si*-HLP 抗体で 1 時間反応させ、洗浄後、Alexa fluor 488 抗ウサギ IgG 抗体と 1 時間反応させた後、DDAO (2 μmol/l) で eDNA を 30 分間染色し、さらに Hoechst 33342 (10 μg/ml)で細胞内 DNA を染色後、Biofilm を共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。

(3) *S. intermedius* の Biofilm 形成における *Si*-HLP の影響についての解析：*Si*-HLP 発現抑制株(BETAHT), wild-type (WT)と2つのControl 形質転換株(BETTとBETAXT)をErythromycin (10 μg/ml)と20-60 ng/mlのDoxycyclineを添加した培地で48時間培養し、Crystal violet染色後、形成されたBiofilmを540 nmの吸光度にて測定して定量した。

(4) *S. intermedius* Biofilmの安定性及び形成におけるDNA添加の影響についての解析：*S. intermedius* WT, BETT, BETAHTやBETAXT培養液に*S. intermedius*, *Staphyrococcus aureus* 209P, *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1やKB細胞から精製したDNAを様々な濃度で添加して48時間培養し、Biofilmを形成させた。洗浄前と洗浄後に残存したBiofilmをCrystal violet染色後、540 nmの吸光度を測定して定量した。Biofilmの安定性として、Biofilm removal percentageを次のような式で算出した。Biofilm removal percentage = (洗浄前のOD_{540 nm} - 洗浄後のOD_{540 nm}) / 洗浄前のOD_{540 nm} X 100%

(5) *S. intermedius* の増殖に対するDNA添加の影響の解析：*S. intermedius* WT培養液に精製し

た*S. intermedius* WT株のDNAを添加して12時間培養し、増殖は、2時間毎に600 nmの吸光度にて測定した。

(6) recombinantHLP (r*Si*-HLP)刺激したTHP-1細胞(ヒト単球系細胞)における遺伝子発現Profile解析：r*Si*-HLPで4時間刺激したTHP-1細胞より、total RNAを抽出・精製後、GeneChip®Gene 1.0 ST Array (Affymetrix; Microarray)にて網羅的に遺伝子発現解析を行った。

(7) *P. aeruginosa*におけるPyocyanin産生と増殖に対するeDNA添加の影響についての解析：精製したDNAを*P. aeruginosa*培養液に添加して、10時間培養後、培養上清を696 nmの吸光度にて測定した。また、*P. aeruginosa*の増殖については、Colony形成数をCountした。

(8) *P. aeruginosa*やCandida Biofilm形成におけるDNA添加の影響についての解析：*P. aeruginosa*やCandida培養液に精製したDNAを様々な濃度で添加して培養し、Crystal violet染色後、形成されたBiofilmを540 nmの吸光度にて測定して定量した。またCandidaの菌形態はSEM観察も行った。

(9) *S. mutans*の増殖に対するDNA添加の影響についての解析：*S. mutans* UA159から精製したDNAを*S. mutans*の浮遊またはBiofilm培養系に添加して培養し、増殖についてColony形成数をCountした。

(10) Biofilm 形成に関与する Quorum sensing, 特に Cell-cell signaling に影響を及ぼす Com circuit system に関与する分子が DNA 添加による Biofilm 形成増強に与える影響の解析：*S. mutans* UA159 から精製した DNA をそれぞれ *S. mutans* U159 WT, Δ*ComC*, Δ*ComD* または Δ*ComE* mutant 株培養液に添加して 24 時間培養後、Crystal violet 染色し、形成された Biofilm を 540 nm の吸光度にて測定し定量した。

(11) DNA 添加による *S. mutans* における HLP 発現に対する影響についての解析：精製 *S. mutans* UA159 DNA を *S. mutans* U159 WT の浮遊または Biofilm 系培養液に添加して 24 時間培養後、HLP 発現量を ELISA で測定した。

(12) *S. intermedius* biofilm 中の eV と *Si*-HLP の局在の観察：*S. intermedius* ATCC27335 から Cloning した *Si*-hlp 遺伝子配列から構造予測を行った後、表層に露出する 16-mer のペプチド配列を免疫して得られた抗 *Si*-HLP 抗体を用いて、24 穴プレートで形成した *S. intermedius* ATCC27335 Biofilm の免疫電顕観察と蛍光顕微鏡観察を行った。

(13) r*Si*-HLP の結合解析：糖鎖固定化アレイやヘパラン硫酸アレイ (共に住友ベークラ

イト)を用いて rSi-HLP の結合解析を行った。

(14) Si-HLP の発現局在の解析：抗 Si-HLP 抗体を用いて、Streptococci の細菌表層ならびに菌体内での HLP 発現量を調べた。

4. 研究成果

(1) DNase I 処理により *S. intermedius* の Biofilm 量は、24, 48 時間共に、未処理の Control と比較して有意に減少した。SEM 観察でも Biofilm 中の細菌密度は、DNase I 処理では顕著に低かった。24 時間培養して形成された Biofilm に DNase I (200 U/ml) を添加して、さらに 24 時間培養した場合でも、Biofilm 量は、未処理の Control と比較して有意に減少した。24 時間培養して形成された Biofilm 中の eDNA を DDAO で染色すると、DNase I 処理により顕著に eDNA は減少した。これらの結果より、eDNA は、Biofilm 形成を誘導し、さらに形成された Biofilm の安定性に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

2) 2 日間形成させた *S. intermedius* Biofilm を DDAO と抗 Histone-like DNA binding protein (HLP) 抗体で染色した結果、eDNA と extracellular HLP (eHLP) は豊富に存在し、HLP は菌体内外で DNA と共局在、すなわち複合体を形成している事が示された(図 1)。さらに HLP を Downregulate させた Si では、顕著に Biofilm 形成量が抑制された。

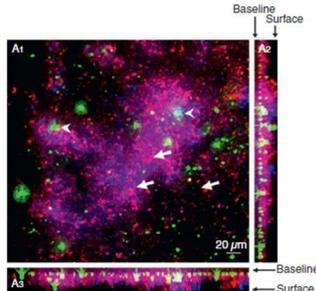


図1 *S. intermedius* biofilm中の染色体DNA、eDNA及びSi-HLPの蛍光顕微鏡観察
Si-HLP：緑、eDNA：赤、細胞内DNA：青
白矢印：HLPとeDNAの共局在、白矢頭：HLPと細胞内DNAの共局在

(3) Si-HLP 発現抑制株(BETAHT)では、他のすべての株(WT, BETT や BETAHT)より顕著に Biofilm 形成量が抑制され、Biofilm 形成量は、Doxycycline 調節下での HLP の発現量に依存していた。この事より、HLP は Biofilm 形成に影響を及ぼす事が示唆された(図 2)。

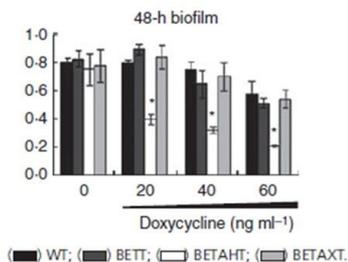


図2 *S. intermedius*のBiofilm形成におけるSi-HLPの影響

(4) 精製 *S. intermedius* DNA を添加して *S. intermedius* を培養すると、1 $\mu\text{g/ml}$ までは DNA 濃度依存的に Biofilm 形成量は増加したが、10 または 100 $\mu\text{g/ml}$ では減少した(図3A)。高濃度の DNA を添加して形成した Biofilm は、剥がれやすく、その構造に影響を及ぼす事も示された(図3B)。他のグラム陽性菌や陰性菌、さらには宿主細胞から精製した異種 DNA の添加でも同様の結果を認めた事から、この現象は DNA の由来に依存しない事も示された(図3C)。

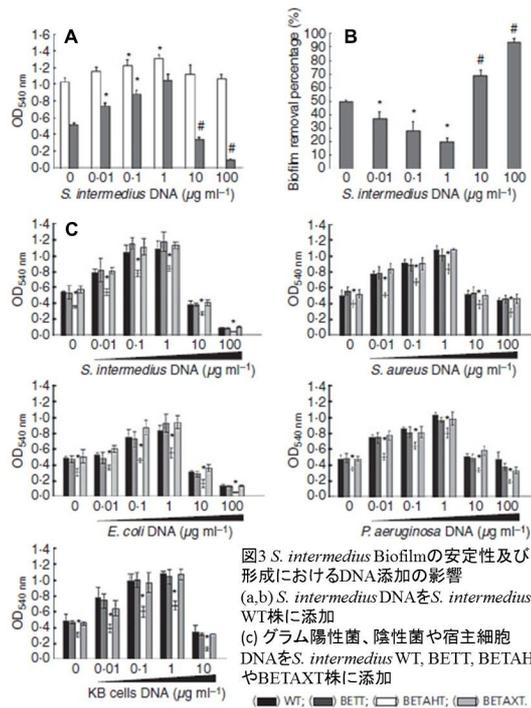


図3 *S. intermedius* Biofilmの安定性及び形成におけるDNA添加の影響
(a,b) *S. intermedius* DNAを *S. intermedius* WT株に添加
(c) グラム陽性菌、陰性菌や宿主細胞 DNAを *S. intermedius* WT, BETT, BETAHT や BETAHT株に添加

(5) 10 $\mu\text{g/ml}$ の DNA 存在下では、*S. intermedius* の増殖は軽度に抑制されたが、1 $\mu\text{g/ml}$ の DNA は影響を与えなかった(図 4)。

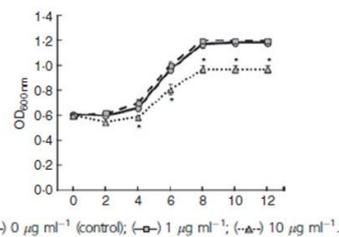


図4 *S. intermedius*の増殖に対するDNA添加の影響

以上より、eDNAやHLPはBiofilm形成を増強し、その安定性・硬直性に重要である事が示された。

(6) rSi-HLP で THP-1 細胞を刺激して Microarray 解析を行った結果、cytokine や chemokine 等の炎症性メディエーターの遺伝子発現が有意に増強していた。

(7) グラム陽性菌、陰性菌、真菌や宿主細胞から精製した DNA を添加して *P. aeruginosa*

を培養すると、Pyocyanin 産生量は DNA 濃度依存的に有意に増加したが、Colony 形成数に変化は認めなかった。

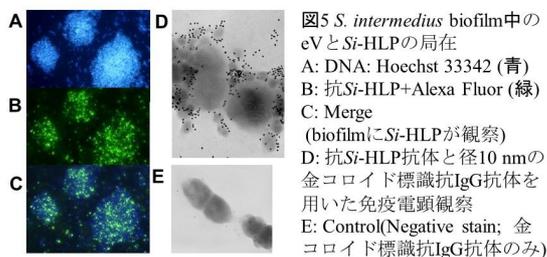
(8) 精製各種 DNA を添加して *P. aeruginosa* を培養すると、1 µg/ml の DNA 濃度で Biofilm 形成量は増加したが、10 µg/ml では減少した。また真菌である *Candida* の Biofilm 形成に対する eDNA の同様な影響と DNA 長による影響が無い事を確認し、さらに eDNA は、*Candida* をより病原性が強いと考えられている菌糸型への形態変化を誘導した。

(9) 精製 *S. mutans* DNA を *S. mutans* の浮遊または Biofilm 培養系に添加して培養すると、Biofilm 培養系において colony 形成数の有意な増加が認められたが、浮遊培養系では認められなかった。

(10) Biofilm 形成に関与する Quorum sensing、特に Cell-cell signaling に影響を及ぼす Com circuit system に関与する分子 ComC、ComD、ComE または ComX を code する遺伝子を欠損させた各 *S. mutans* com 欠失株と Wild-type を用いて、精製 *Sm* DNA を添加して培養すると、Wild-type と ComX 欠失株では、DNA 添加により Biofilm 形成量は増加したが、ComC、ComD、ComE 欠失株では認めなかった。

(11) 精製した *S. mutans* DNA を *S. mutans* UA159 株の浮遊または Biofilm 培養系に添加して培養すると、Biofilm 培養系において HLP の菌体表面への有意な発現増強が認められたが、浮遊培養系では認められなかった。

(12) *S. intermedius* ATCC27335 Biofilm に *Si*-HLP が多量に存在し、さらに細菌が菌体外に分泌する extracellular vehicle (eV) 外表面に抗 *Si*-HLP 抗体が反応したことから、*Si*-HLP の RK クラスタを有する Arm region が eV 外表面に突出している事や HLP は Vehicle により菌体外へ分泌する可能性が示唆された(図 5)。



(13) *Si*-HLP の糖鎖結合能を糖鎖固定化アレイを用いた解析により、*Si*-HLP のレセプターは、ヘパリンやヘパラン硫酸であり、特に e *Si*-HLP とヘパリンとの結合には、GlcNH₂ の 2 位アミノ基の硫酸化が必須であることが示唆された。さらに *S. intermedius* は、1.0 mg/ml 以上のヘパラン硫酸に顕著に結合し、抗 *Si*-HLP 抗体で前処理すると、*S. intermedius* 菌

体は、1.0 mg/ml 以上のヘパラン硫酸にも結合しなかったことから、*S. intermedius* 菌体のヘパラン硫酸への特異的な結合には、*Si*-HLP が関与し、特に heparin-binding consensus sequence である Arm region が重要である事が示唆された。

(14) 抗 *Si*-HLP 抗体を用いて細菌表面の反応性を蛍光顕微鏡ならびに ELISA にて解析を行うと、*S. mutans* ATCC25175 は、*S. intermedius* ATCC27335 と同様の epitope 配列を有する HLP を保有しているにもかかわらず、抗 *Si*-HLP 抗体とは反応しなかった(図 6)。

Strain (epitope)	Cell surface	Cell lysate
	O.D. 414nm	
<i>S. intermedius</i> ATCC27335 (EVRERAARKGRNPQTG)	1.03±0.07	1.00±0.05
HLP-Downregulated strain	0.10±0.01	0.21±0.02
<i>S. mutans</i> ATCC25175 (EVRERAARKGRNPQTG)	0.11±0.02	1.02±0.04

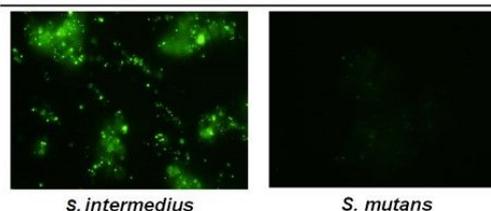


図6 抗*Si*-HLP抗体反応性

以上の結果から、HLP の細菌内や菌体外での発現局在には、菌種により差があり、eV 等を利用した菌体外への分泌機構も影響を与えている可能性が示唆された。また、誤嚥性肺炎患者の咽頭細菌中にも多くの eV が観察される事等から、口腔 Biofilm 由来 HLP の Vesicle を介した分泌機構とその結合特異性が、誤嚥性肺炎等の病原性に関与している可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Hiromichi Yumoto, Katsuhiko Hirota, Kouji Hirao, Tsuyoshi Miyazaki, Nobuyuki Yamamoto, Koji Miyamoto, Keiji Murakami, Natsumi Fujiwara, Takashi Matsuo, Yoichiro Miyake, Anti-inflammatory and protective effects of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on oral epithelial cells; Journal of Biomedical Materials Research. Part A. 査読有, Vol. 103, No. 2, 2015, pp. 555-563. DOI: 10.1002/jbm.a.35201.

Bayarmagnai Sapaar, Asikin Nur, Katsuhiko Hirota, Hiromichi Yumoto, keiji Murakami, Takashi Amoh, Takashi Matsuo, Tetsuo Ichikawa, Yoichiro Miyake, Effects of

extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation; Journal of Applied Microbiology. 査読有, Vol. 116, No. 6, 2014, pp: 1531-1542. doi:10.1111/jam.12483.

Asikin Nur, katsuhiko Hirota, Hirromichi Yumoto, Kouji Hirao, Dali Liu, Kanako Takahashi, Keiji Murakami, Takashi Matsuo, Rong Shu, Yoichiro Miyake, Effects of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of a *Streptococcus intermedius* biofilm; Journal of Applied Microbiology. 査読有, Vol. 115, No. 1, 2013, pp. 260-270. doi:10.1111/jam.12202.

[学会発表](計 19 件)

弘田克彦、湯本浩通、村上圭史、平尾功治、天羽 崇、三宅洋一郎: *Streptococcus intermedius* Histone-Like Protein と細胞外ベシクルの特性、第 88 回日本細菌学会総会、2015. 3. 25, 26、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

Hirromichi Yumoto, Katsuhiko Hirota, Kouji Hirao, Tsuyoshi Miyazaki, Keiji Murakami, Natsumi Fujiwara, Yoichiro Miyake, Takashi Matsuo: Anti-inflammatory and protective effects of 2-methacryloyloxyethyl-phosphorylcholine-polymer on oral epithelial cells; 92th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2014. 6. 27, Cape Town (South Africa)

Asikin Nur、弘田克彦、湯本浩通、平尾功治、村上圭史、三宅洋一郎: Extracellular DNA influences pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa*、第 87 回日本細菌学会総会、2014. 3. 28、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Hirromichi Yumoto, Katsuhiko Hirota, Kouji Hirao, Keiji Murakami, Yoichiro Miyake, Takashi Matsuo: Pathogenic roles of Streptococcal histone-like protein in microbial infection; The 15th Joint-Scientific Meeting of Korean Academy of Conservative Dentistry & Japanese Society of Conservative Dentistry, 2013. 11. 23, Gyeongju (Korea)

Asikin Nur、弘田克彦、湯本浩通、平尾功治、村上圭史、三宅洋一郎: The roles of extracellular DNA in *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus intermedius* infection、第 86 回日本細菌学会総会、2013. 3. 18, 20、幕張メッセ(千葉県千葉市)

Kouji Hirao, Hirromichi Yumoto, katsuhiko Hirota, Liu Dali, Asikin Nur, Kanako Takahashi, Takashi Matsuo, Yoichiro Miyake: Global Gene Analysis in Monocytes Stimulated with Streptococcal Histone-Like Protein; 90th General Session & Exhibition

of the International Association for Dental Research, 2012. 6. 21, Iguasu falls (Brazil)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

湯本 浩通 (YUMOTO, Hirromichi)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号: 60284303

(2)研究分担者

松尾 敬志 (MATSUO, Takashi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 30173800

尾崎 和美 (OZAKI, Kazumi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 90214121

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 00217770

(3)連携研究者

()

研究者番号: