

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05512

研究課題名(和文) 口腔内マイクロバイオーム形成機序および宿主免疫に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Analysis of oral microbiome formation and effect on host immunity

研究代表者

小松澤 均 (Komatsuzawa, Hitoshi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：90253088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では主として口腔細菌叢形成に影響を及ぼす抗菌性因子についての解析を行った。270名の被検者より、*S. mutans*及びブドウ球菌を分離し、性状解析とゲノム解析を行った。併せて唾液のメタゲノム解析を行った。その結果、*S. mutans*は種々の抗菌性ペプチド(バクテリオシン)の産生を認め、その産生性は菌株により多様性を認めた。また、バクテリオシンの種類により他の口腔細菌種に対する感受性に多様性を認めた。*S. mutans*と他のレンサ球菌種との共培養試験の結果、一部のバクテリオシン産生株で2菌種の占める割合が変化した。しかし、唾液細菌叢と分離菌の性状に強い相関性は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、*S. mutans*の産生する抗菌性因子は多様性があり、この多様性が細菌叢形成に影響を及ぼすことが示唆された。*S. mutans*はう蝕原性細菌であり、デンタルプラーク形成に非常に重要な細菌種である。したがって、*S. mutans*の抗菌性因子によりプラーク中に占める本菌の割合が変動する可能性があり、う蝕誘発能に影響を及ぼす可能性が考えられた。また、細菌叢の変化は歯周病原菌の定着にも影響を及ぼす可能性も考えられ、将来的には口腔疾患発症の予測、細菌叢改善などに結びつくと考えられ、本研究の意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied the effect of antibacterial factors on the formation of oral microbiome. We isolated *S. mutans* and staphylococci from 270 volunteers. Also, we studied metagenome analysis using saliva. We found several kinds of antimicrobial peptides (bacteriocins) in *S. mutans* strains, and their productions are different among strains. Also, the susceptibility against oral bacteria was different among the bacteriocins. When various *S. mutans* strains were co-cultured with other streptococcal strain, the ratio of each strain was altered. However, we could not find the relation between the character of the strain and the composition of oral microflora.

研究分野：細菌学

キーワード：マイクロバイオーム 口腔細菌叢 レンサ球菌 バクテリオシン ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

人体には 100 兆もの微生物が棲んでいるが、これら常在細菌の役割や性状についての詳細については不明であった。しかし、近年のシーケンシング技術の急激な発展に伴い、メタゲノム解析等によるヒトに常在する微生物群の詳細な研究により、細菌叢と生体との関係性が徐々に明らかになってきている。

近年、常在細菌は宿主と相互作用を行う過程で、ヒトの免疫機能にも影響を及ぼすことが提唱されている。つまり、ヒトは常在細菌に居場所を提供し、常在細菌はヒトの免疫力の維持に貢献するという共存関係を構築している。このようにヒトにとって利益供与的に働く常在細菌群を一個体として捉え、マイクロバイームと呼ぶようになり、近年は腸内におけるマイクロバイームと生体との関わりについての解明がなされるようになってきた。このような背景により、唾液、皮膚、糞便などから採取した試料を用いて、試料に含まれる遺伝子全てを網羅解析するメタゲノム解析により、ヒトのマイクロバイームの正体が明らかにされようとしている。例えば、腸内細菌群では構成パターンは人によって千差万別であることから、マイクロバイームも個体間で多様性を持ち、宿主に異なった影響を与えることが指摘されている。また、こうした体内の細菌の状態が、ヒトの健康にとどまらず、心や精神の状態にも影響を与えている可能性も示唆されている。このように、ヒトと細菌を包括的に捉えるマイクロバイームの研究は、旧来の研究観を変えつつあるともいえる。

マイクロバイームの重要な役割としてヒトとの相互作用が挙げられるが、このように生体や環境中の限局された領域で異種生物間クロストークによって構成される共生環境・生体の恒常性維持において重要なシステムをエコシステムと呼ぶ。近年では腸内細菌による腸内エコシステムの解明が盛んに行われており、善玉菌と呼ばれる腸内細菌の一種が粘膜免疫を介して健康に寄与する報告がされている (PMID:21270894, 24226770)。口腔内エコシステムにおいてもヒトの免疫系に関与している可能性が考えられるが、その詳細は明らかでない。また、口腔内細菌叢は侵襲した細菌に対して定着を阻害する先天性免疫機構の一つとして知られているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。口腔は腸内に比べ好氣的環境であることから、レンサ球菌を筆頭とした通性嫌気性細菌が多く認められており、口腔常在細菌群で形成される口腔内エコシステムは腸内エコシステムと異なる可能性が考えられる。また、口腔内は唾液中に多く分泌される IgA、先天性免疫因子であるディフェンシンや LL37 などの抗菌性ペプチド、ラクトフェリン、リゾチームなどが多く存在しており、免疫システムも腸内と異なる。したがって、口腔は外界に対する生体の門戸としての役割も持ち、飲食に伴う急激な温度や浸透圧、pH 等の変化への適応、外来性微生物の侵入に対するバリアーとしての役割を担うことで外環境から生体を守ることで生体の恒常性を保っていると考えられることから腸内環境とは異なるエコシステムが成り立つことは十分考えられる。

以上のことから、口腔常在細菌がマイクロバイームとして異種細菌同士や生体の免疫系とのクロストークにより、腸など他の消化器官とは異なる口腔特有の環境が織りなすエコシステムが確立している可能性が高い。

申請者らの研究室では、これまでに細菌と先天性免疫因子、細菌間の相互作用の検証を行っており、これらの研究から、細菌が産生する抗菌性因子であるバクテリオシンや先天性免疫機構である抗菌性ペプチドが微生物間ならびにヒト-細菌間のクロストークに重要な役割を担っているのではないかとこの着想を得た。そのためには、多くのヒトから一口腔単位での細菌を分離し、マイクロバイームと捉えた検証を行うことで、より確実な細菌-宿主間の相互作用の検証ができると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、口腔常在細菌をマイクロバイームとして捉え、口腔マイクロバイームが生体因子や異種細菌同士の緊密なクロストークによって口腔内の恒常性を保っているのではないかと考えている。そこで、本研究期間内に、

- 1) 口腔マイクロバイームの形成機構の解明
- 2) 口腔内感染防御機構としての口腔マイクロバイームの検証

の2つを基軸に、口腔マイクロバイームによるエコシステム形成が成り立つかどうかを明らかにすることを目的とした。1) の口腔マイクロバイーム形成機構を解明するにあたっては、100 名から口腔常在細菌を採取し、一口腔単位における常在細菌の性状ならびに微生物間相互作用を明らかにする。本研究では唾液やプラーク中で最も優勢を占めるレンサ球菌に特に着目をし、解析を行う。また、2) の口腔常在細菌がマイクロバイームとして生体に与える影響については、1) で分離した口腔常在細菌による宿主細胞に対する作用、病原細菌定着阻害作用などを検証することで、マイクロバイームの宿主免疫力への影響を明らかにする。特にマイクロバイームが産生する種々の抗菌性因子による感染防御への関わりについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 270 名からの口腔細菌の分離・同定

【各種口腔内細菌の分離】

270 名の被検者から、口腔レンサ球菌 (*S. mutans* は全被検者から分離を試みた)、ブドウ球菌

の分離を行った。

唾液検体からの分離

安静時唾液を 5~10 ml 採取後、激しく vortex し、滅菌 PBS にて 10 倍系列希釈を行う。各 100 μ l を各細菌種分離用選択培地に播種し、培養した。*S. aureus* は併せて鼻腔を綿棒で swab し、選択培地に播種した。

multicomplex primer を用いた PCR による細菌の同定

研究室で設定した化膿レンサ球菌、肺炎球菌、ミュータンス菌、サリバリウス菌など主なレンサ球菌 10 種のプライマー (5 菌種同定 \times 2 セット) を用いた PCR 法にて同定を行う。ブドウ球菌種 (*S. aureus*, *S. epidermidis*) は 1 種のための PCR により行う。同定された細菌は、1 菌種あたり 2 株ずつ再度培養し、2) とは異なった配列を持つ特異的プライマーを用いた PCR により確認した。同定した菌株は全て 80 $^{\circ}$ C にて保存した。

(2) *S. mutans* の性状解析

S. mutans のバクテリオシン産生性

分離した *S. mutans* において、種々の細菌種に対する抗菌力を検討した。分離細菌を寒天培地上にスポットし、一晚培養後、被検菌を溶解した軟寒天培地に適量加え、寒天培地上に播種した。一晚培養を行い、形成される阻止円の大きさを測定し、抗菌力を判定した。

バクテリオシンをコードする遺伝子解析

分離菌から DNA を抽出し、6 種のバクテリオシン (MutacinI ~ , Smb, K8) の特異プライマーを用いて遺伝子の有無を評価した。

バクテリオシン発現性の検証

分離菌を培養後、RNA を抽出・精製を行い、cDNA を調整後、定量性 PCR 法で発現量を検討した。

バクテリオシン欠損株の作成

エリスロマイシン等の薬剤耐性遺伝子をバクテリオシンをコードする遺伝子と replace することで欠損株の作成を行い、性状解析を行った。

(3) *S. aureus* の性状解析

POT 法による遺伝子タイピング

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* において、POT 法によるタイピングを行った。

過酸化水素感受性、ナイシン感受性試験

分離した *S. aureus* 株を用いて、*S. sanguinis* が産生する過酸化水素およびナイシンに対する感受性試験を行った。過酸化水素感受性は上述の方法で、*S. sanguinis* を寒天培地上にスポットし、一晚培養後、軟寒天培地に包埋した黄色ブドウ球菌を播種することで、判定した。ナイシンの感受性は市販のナイシンを用いて MIC を算定した。

バクテリオシン産生性の検討

分離した黄色ブドウ球菌及び表皮ブドウ球菌について、バクテリオシン産生性について 2 - に示す方法で検討を行った。

(4) ゲノム解析

唾液のメタゲノム解析

採取した唾液を等量の生理食塩水で希釈後、タングステンおよびガラスビーズを用いて菌体を破碎し、DNA を回収した。本検体は - 80 $^{\circ}$ C で保存する。唾液検体については遠心分離後の上清画分も - 80 $^{\circ}$ C で保存する。得られた DNA を用いてメタゲノム解析を行った。

S. mutans, *S. aureus* のゲノムシーケンス

培養した菌を集菌し、通法に基づき DNA を調整した。得られた DNA を使用し、次世代シーケンサーを用いて解読を行った。シーケンスについては、国立感染症研究所薬剤耐性研究センター菅井基行博士、久恒順三博士との共同研究で行った。

(5) 共培養試験

S. mutans と他細菌種の培養液を等量混ぜ、寒天培地上にスポットし、一晚培養する。その後、寒天培地上で生育した細菌をかきとり、DNA の抽出を行った後、菌種特異的プライマーを使用して定量性 PCR を行い、各菌の割合を算出した。

(6) グリチルレチン酸及びその誘導体における *S. mutans* に対する抗菌活性

細菌叢の改善方法を模索するため、天然由来成分であるグリチルレチン酸およびその誘導体の本研究で分離した *S. mutans* に対する抗菌活性を検討した。活性の測定は微量液体希釈法により MIC 値を算定した。

4 . 研究成果

(1) 270 名からの口腔細菌の分離・同定

S. mutans 138 株、*S. sobrinus* 6 株、*S. epidermidis* 237 株、*S. aureus* 150 株を分離した。また、数名の被検者からは複数のレンサ球菌種 (*S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. oralis* など) の分離を行った

(2) *S. mutans* の性状解析

バクテリオシンをコードする遺伝子解析

5種のバクテリオシン (Mutacin I ~ , K8) の遺伝子の有無を評価した結果を下記表に示す。それぞれ、単独で保有する菌株、複数を保有する菌株などその遺伝子の保有は菌株間で異なっていた。

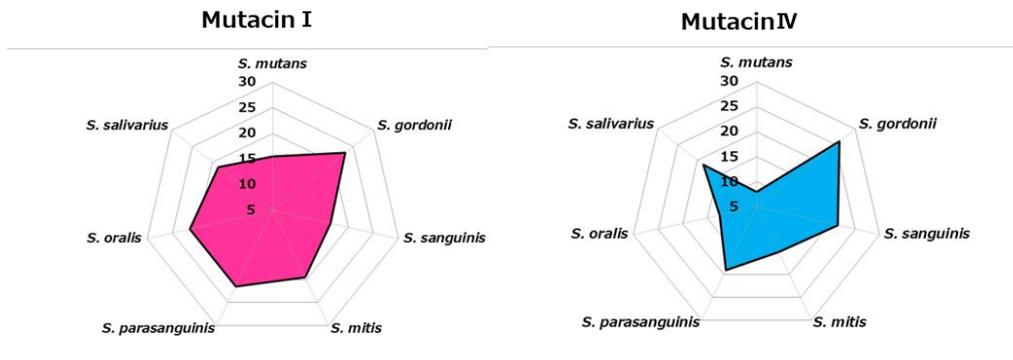
	Number of strains							
	positive stain	single positive strain	additional gene					
			Mutacin I	Mutacin II	Mutacin III	K8	Mutacin IV	
Mutacin I	14	9	-	1	0	3	2	I+K8+IV: 1 strain
Mutacin II	15	7	1	-	1	0	7	II+III+IV: 1 strain
Mutacin III	9	5	0	1	-	0	4	II+III+IV: 1 strain
K8	23	15	3	0	0	-	6	I+K8+IV: 1 strain
Mutacin IV	65	48	2	7	4	6	-	I+K8+IV: 1 strain II+III+IV: 1 strain

バクテリオシン産生性

バクテリオシン産生性について、阻止円の形成および mRNA の発現量について検証した。その結果、遺伝子を保有株でも発現量は株間で異なることが認められた。また、複数のバクテリオシン保有株においては、いずれかのバクテリオシン発現性が認められない株が多い傾向であった。

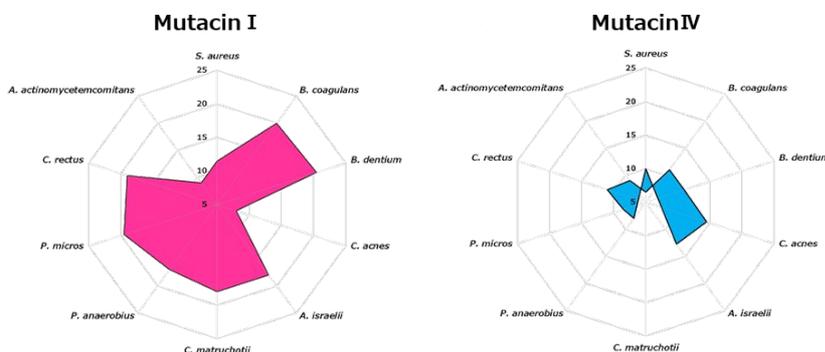
バクテリオシンの種類による他菌種への抗菌活性

1種のバクテリオシン産生株を用いて、各バクテリオシンの種々の細菌種に対する抗菌力を検討した結果、バクテリオシンの種類により、各種細菌への抗菌活性は異なった。一部の結果を下表に示す。



図：Mutacin I 及びIV産生株の口腔レンサ球菌に対する抗菌活性
数値は各細菌種に対する阻止円の直径 (mm) を表す。

同様に他の細菌種に対する抗菌活性を検討した。一部の結果を下表に示す。



図：Mutacin I 及びIV産生株の口腔内細菌に対する抗菌活性
数値は各細菌種に対する阻止円の直径 (mm) を表す。

バクテリオシン欠損株の作成
 各バクテリオシン欠損株の作成を試みた結果、Mutacin I と MutacinIV の欠損株の作成に成功した。阻止円の評価を行った結果、親株に比べて大幅な阻止円の減少が認められた。しかし、完全な阻止円の欠失ではなかったことから、他のバクテリオシンあるいは過酸化水素産生の可能性が考えられた。

Clinical-isolated strain / Indicator strain	WT157 (mut I +)	KO157 (Δ mut I)	WT138 (mutIV+)	KO138 (Δ mutIV)
<i>S. gordonii</i>	23	7	19	9
<i>S. sanguinis</i>	18	7	17	11
<i>S. salivarius</i>	21	7	12	6
<i>S. aureus</i>	12	6	6	6
<i>B. coagulans</i>	19	7	7	6

(3) *S. aureus* の性状解析

POT 法による遺伝子タイピング

228名の口腔および鼻腔から分離できた株を下表に示す。およそ50%のヒトから分離された。鼻腔と口腔の両方から分離できたヒトは51名であった。次にPOT法によるタイピングを行った結果、口腔と鼻腔で同じ遺伝子型を保有するヒト(76.5%)と異なるタイプを保有するヒト(23.5%)が存在した。

被検者	228名	POT法	
<i>S. aureus</i> +	116名(50.9%)	口腔・鼻腔から分離	51名(22.4%)
MRSA	5(5.2%)	同タイプ	39名(76.5%)
鼻腔から分離	82名(36.0%)	異種タイプ	12名(23.5%)
口腔から分離	85名(37.3%)		
口腔・鼻腔から分離	51名(22.4%)		
鼻腔のみ分離	31名(13.6%)		
口腔のみ分離	34名(14.5%)		

過酸化水素感受性、ナイシン感受性試験

分離した *S. aureus* 株を用いて、*S. sanguinis* が産生する過酸化水素およびナイシンに対する感受性試験を行った結果、感受性は株間で異なっており、多様性を認めた。しかし、感受性と口腔および鼻腔から分離した菌との関連性は認められなかった。

(4) ゲノム解析

唾液のメタゲノム解析

191検体のメタゲノム解析をT-RFLP法を用いて解析を行った結果、細菌の種類、構成比率は個体差が大きかった。*S. mutans*の産生するバクテリオシンの種類と産生性との関連性について、検証したが、相関性は認められなかった。また、メタゲノム解析で同定された菌種について、菌種間での相関性について検証した結果、一部の菌種間で相関が認められた。

S. mutans, *S. aureus* のゲノムシーケンス

分離した *S. mutans* 全株について、ゲノム解読を行ったが、DNAの抽出の問題で十分な結果が得られず、再度、全株のDNA抽出を行った。現在、ゲノム解読を再度実施中である。

S. aureus については、ゲノム解読が終了した。口腔と鼻腔でPOT法により、同一個体で同じタイプを示した菌株についてゲノムを比較したところ、平均して約16か所の変異が認められた。したがって、定着する部位によって細菌叢などの環境が大きく変わるため、異なる部位に定着するために変異を起こす可能性が示唆された。

(5) 共培養試験

MutacinI (WT157株) および Mutacin (WT138) 産生株および欠損株を用いて、*S. gordonii* および *S. sanguinis* を用いて共培養試験を行った結果、親株に比べて欠損株では全体の占める *S. mutans* の割合が小さくなる傾向を示した。

(6) グリチルレチン酸及びその誘導体の *S. mutans* に対する抗菌活性

本研究で分離した *S. mutans* 100株について検討した結果、Glycyrrhetic acid (GRA) および disodium succinoyl glycyrrhetinate において、抗菌力を認めた。これらの物質は消炎効果もあることから、う蝕や歯肉炎などへの臨床応用の可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Antibacterial activity of disodium succinoyl glycyrrhetinate, a derivative of glycyrrhetic acid against *Streptococcus mutans*. Yamashita T, Kawada-Matsuo M, Katsumata T, Watanabe A, Oogai Y, Nishitani Y, Miyawaki S and Komatsuzawa H. Microbiology and Immunology in press, 2019. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

(1) 渡邊 温子、松尾 美樹、小松澤 均、*Streptococcus mutans* の保有するバクテリオシンの解析、第92回 日本細菌学会総会、一般演題(ポスター発表)、2019年4月23~25日 札幌

(2) 渡邊 温子、松尾 美樹、小松澤 均、*Streptococcus mutans* の保有するバクテリオシンの解析、第60回 歯科基礎医学会学術大会、2018年9月5~7日 福岡

(3) 小松澤 均、Significance of bacteriocins in oral microbiome, 第91回日本細菌学会総会 2018年3月27日~29日 福岡

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松尾 美樹

ローマ字氏名：Matsuo Miki

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20527048

研究分担者氏名：大貝 悠一

ローマ字氏名：Oogai yuichi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：40511259

(2)研究協力者

研究協力者氏名：菅井 基行

ローマ字氏名：Sugai Motoyuki

研究協力者氏名：久恒 順三

ローマ字氏名：Hisatune Junzo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。