

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19598

研究課題名（和文）Fusobacterium nucleatum の遺伝学的解析手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of genetic analysis method for Fusobacterium nucleatum

研究代表者

林 美加子（Hayashi, Mikako）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40271027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：Fusobacterium nucleatumは歯周疾患だけでなく大腸癌の病態や予後にも影響を及ぼす病原細菌であるが、遺伝子操作が難しく逆遺伝学的な解析手法がまだ確立されていない。そこで本研究では、F. nucleatum に関する遺伝学的解析手法を確立し、宿主細胞との相互作用を詳細に解明することを目的とした。ヒトマクロファージ細胞株にF. nucleatumを感染させRNAシーケンス解析を行った結果、特異的に発現が上昇する遺伝子群が認められ、炎症性応答を促進することが示唆された。また、遺伝子導入が困難とされるF. nucleatumに対して遺伝子導入効率を改善することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

F. nucleatum の遺伝学的解析手法を確立できれば、宿主細胞との相互作用をさらに詳細に分析することができるようになり、歯周疾患にとどまらず腸疾患を含めた様々な慢性炎症の病態解明を一気に加速することができるのではないかと考えられる。さらに、まだまだ謎の多いF. nucleatumがもつ未知の病原因子を同定しそれに対する宿主の反応機構を明らかにすることは、新規の発癌・転移促進メカニズムの解明につながる可能性も秘めており、腫瘍生物学的にも生命科学領域の研究を飛躍的に発展させる潜在性を有していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Fusobacterium nucleatum is a pathogenic bacterium that affects the pathogenesis and prognosis of colorectal cancer as well as periodontal disease, but a reverse genetic analysis method has not yet been established due to the difficulty of genetic manipulation. In this study, we aimed to establish a genetic analysis method for F. nucleatum and to elucidate its interaction with host cells. RNA sequencing analysis of human macrophage cell lines infected with F. nucleatum revealed a group of genes whose expression was specifically upregulated, suggesting that they promote inflammatory responses. In addition, we succeeded in improving the gene transfer efficiency of F. nucleatum.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯学 微生物学 口腔細菌学 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

Fusobacterium nucleatum (*F. nucleatum*) は主に口腔内に常在するグラム陰性の偏性嫌気性細菌ですが、2011 年に大腸癌の組織から多量の *F. nucleatum* が検出されることが初めて報告され、近年では歯周疾患だけでなく大腸癌の病態や予後にも影響を及ぼす病原細菌として非常に注目を集めています。しかしながら現状ではまだ、主な歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) や腸内細菌である大腸菌、サルモネラなどと比べると、細胞内での適応機構についての基礎的研究の進展はかなり遅れています。その理由としては、*F. nucleatum* がこれまで研究対象としてそれほど注目されてこなかったことと、遺伝子操作が難しく逆遺伝学的な解析手法がまだ確立されていないことの 2 点が挙げられます。

このような現状から、*F. nucleatum* の遺伝学的解析手法を確立できれば、宿主細胞との相互作用をさらに詳細に分析することができるようになり、歯周疾患にとどまらず腸疾患を含めた様々な慢性炎症の病態解明を一気に加速することができるのではないかと考え、本研究の着想に至りました。さらに、まだまだ謎の多い *F. nucleatum* がもつ未知の病原因子を同定しそれに対する宿主の反応機構を明らかにすることは、新規の発癌・転移促進メカニズムの解明につながる可能性も秘めており、腫瘍生物学的にも生命科学領域の研究を飛躍的に発展させる潜在性を有していると考えられます。

2. 研究の目的

そこで本研究では、*F. nucleatum* に関する遺伝学的解析手法を確立し、宿主細胞との相互作用に基づく感染分子機構を詳細に解明するための研究基盤を創出することを目的とした研究を行いました。

3. 研究の方法

研究計画では、RNA-seq 解析を用いた *F. nucleatum* による細胞内侵入と感染宿主細胞の遺伝子発現解析、CRISPR/Cas9 に代表されるゲノム編集技術を駆使した逆遺伝学的アプローチから本菌の遺伝子機能解析方法の確立を試みました。

(1) RNA-seq 法による *F. nucleatum* 感染マクロファージの遺伝子発現の網羅的解析

F. nucleatum を感染させた宿主細胞における遺伝子発現プロファイルを解析した報告もまだそれほど多くない現状をふまえ、本菌の感染が引き起こす転写発現挙動を包括的に把握することを目的とした RNA-seq 解析を行いました。

(2) *F. nucleatum* 感染によって生じる宿主炎症応答の qPCR および ELISA による定量化

F. nucleatum を感染させた宿主細胞における炎症性サイトカインの発現変化を定量 RT-qPCR および ELISA 法を用いて計測しました。

また、トランスウェルを利用した非接触共培養法を用いて、本菌に対する炎症応答が細菌 - 宿主細胞間の直接接触を必要とするのか、あるいは細菌由来の分泌性分子によるものなのかを確認しました。

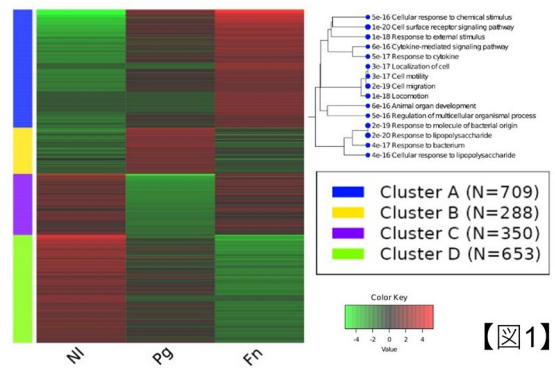
(3) *F. nucleatum* の機能欠失株作製技法の確立

歯周疾患と大腸癌に関連し病原性が明確になりつつある *F. nucleatum* に対する遺伝学的解析手法を、可能な限り汎用性のある手法で確立することを目的として、DNA 切断を生じることなく発現制御を行う dCas9 による CRISPR 干渉法を試みました。

4. 研究成果

(1) RNA-seq 法による *F. nucleatum* 感染マクロファージの遺伝子発現の網羅的解析

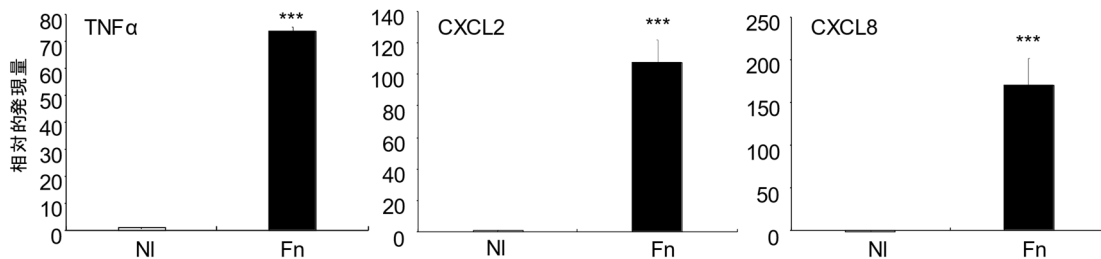
ヒトマクロファージ細胞株に主要な歯周病原性細菌である *F. nucleatum* および *P. gingivalis* を感染させ RNA シークエンス解析を行いました。その結果、*F. nucleatum* によって特異的に発現が上昇する遺伝子群が認められ、炎症性応答を活性化することが示唆されました【図1】。



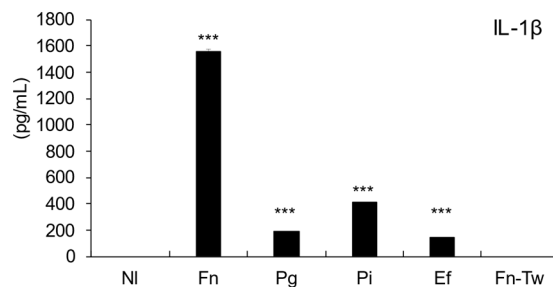
(2) *F. nucleatum* 感染によって生じる宿主炎症応答の qPCR および ELISA による定量化

F. nucleatum による炎症性遺伝子発現を qPCR により定量化しました【図2】。また、を用いて代表的な炎症性サイトカインの1つである IL-1 β の分泌量を ELISA で定量化したところ、他の歯周病原性細菌に比較して優位に産生量が多いこと、トランスウェルを利用した非接触共培養法を用いた検討から、炎症性サイトカインの発現が細菌-宿主細胞間の直接接触を必要とすることを確認しました【図3】。

【図2】



【図3】



(3) *F. nucleatum* の機能欠失株作製技法の確立

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術では、2本鎖 DNA を切断 (Double-strand DNA break) し、その修復の過程で欠失や挿入といった変異が導入されるという仕組みが基本となっています。しかし、細菌では2本鎖 DNA の切断は致死となってしまうことが多いため、本研究では DNA 切断を生じることなく発現制御を行う dCas9 によるシステムを用いました。この方法は gRNA の配列を工夫することでゲノムワイドな機能性スクリーニングにも応用可能であることという利点もあります。遺伝子導入が困難とされていた *F. nucleatum* に対して遺伝子導入効率を改善し、塩基編集用の dCas9-CDA の恒常発現株の作製に成功しました。今後は *F. nucleatum* 内で駆動するプロモーターを搭載した gRNA 発現プラスミドを作製し、単一の gRNA を遺伝子導入することで標的遺伝子改変株を、複数の gRNA をプールし導入することでランダム欠損株ライブラリーを作製することを試んでいます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	大嶋 淳 (Ohshima Jun) (30755450)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	

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