

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21028

研究課題名（和文）歯周病原細菌の菌体成分/分泌物が肺炎モデルマウスに及ぼす作用の検討

研究課題名（英文）*Porphyromonas gingivalis* components/secretions synergistically enhance pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice

研究代表者

岡部 徹平（OKABE, Teppei）

愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員

研究者番号：90964411

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：6週齢雄性C57BL/6マウスをコントロール群(*Porphyromonas gingivalis*、*Streptococcus pneumoniae*培養液であるsTSB投与群)、P.g培養上清(PgSup)投与群、S.p感染群、ロイペプチン投与群、S.p+PgSup混合感染群、S.p+LPS混合感染群、S.p+FimA混合感染群、S.p+PgSup+ロイペプチン混合感染群の8群に分け24時間飼育後、肺を回収し組織学的解析、遺伝子発現解析、タンパク発現解析、肺における好中球/マクロファージ分画の解析を行った。
結果として、S.p+LPS、S.p+PgSup+ロイペプチンにおいて炎症増加傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでも歯周病原細菌の誤嚥性肺炎に与える影響については行われてきたが、*Porphyromonas gingivalis*の菌体成分/分泌物に着目し、個別にマウスに肺炎球菌と混合感染させる例は皆無であった。今回、LPS、ロイペプチンとの混合感染において炎症増加傾向が認められたが、ロイペプチンにおいては当初想定した結果とは異なっていた。
今回の結果を受けてさらに各成分の投与量について精査を行い、手法を検討し、誤嚥性肺炎の原因物質を明らかにしていきたい。これらを解明することは、超高齢社会において問題となっている歯周病と誤嚥性肺炎の効果的な治療薬の開発に繋がる可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：Six-week-old male C57BL/6 mice were divided into 8 groups: control group (*Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus pneumoniae* culture medium, sTSB group), P.g culture supernatant (PgSup) group, S.p infection group, leupeptin group, S.p+PgSup mixed infection group, S.p+LPS mixed infection group, S.p+FimA mixed infection group, and S.p+PgSup+Leupeptin mixed infection group. After 24 hours of rearing, lungs were collected for histological analysis, gene expression analysis, protein expression analysis, and neutrophil/macrophage fraction analysis in the lungs. The results showed that S.p+LPS and S.p+PgSup+Leupeptin showed a tendency to increase inflammation.

研究分野：誤嚥性肺炎

キーワード：誤嚥性肺炎 *Porphyromonas gingivalis* *Streptococcus pneumoniae* ロイペプチン リボポリサッカライド FimA

1. 研究開始当初の背景

歯周病は世界で最も患者数の多い感染症であり、日本では75歳以上の高齢者の50%以上が進行した歯周病を有するとされている。また、歯周病原細菌は血行性や経気道的に多臓器に移行することで異所性感染を誘発することも知られている。特に肺炎に関してはその発生頻度が高く、致命的な疾患となることが知られている(Nelson et al. AM Rev Respir Dis.1986、Kimizuka et al. Microbes Infect. 2003)。実際に、令和4年度の主な死因の構成割合においても肺炎と誤嚥性肺炎(AP)の割合を合わせると悪性新生物、心疾患、老衰に続く第4位である。また、高齢者の肺炎においては院内肺炎と市中肺炎に医療・介護関連肺炎(NHCAP)という新しい概念が提唱された。APは日和見感染であり、口腔咽頭にコロニー形成した細菌が誤嚥することで肺に侵入することで発症するとされている。NHCAPの1/4は他菌種の関与が示唆されており、起因菌の約1/3が*Streptococcus pneumoniae*であること、*S. pneumoniae*によるNHCAPの6割以上にAPが関与していると報告されている(Fukuyama et al. J Infect Chemother. 2013)。また、*Porphyromonas gingivalis*は歯周炎の組織における検出量は少ないものの、口腔内フローラの構成を変化させ炎症などの免疫の破綻を引き起こすキーストーン細菌であるとされ(Hajishengallis et al. Nat Rev Immunol. 2011)、*P. gingivalis*が重篤な肺炎患者から検出されることも報告されており(Finegold et al. Rev Infect Dis. 1991)、APにおいてもキーストーン細菌として病態形成に関与している可能性がある。よって、歯周病の代表的な原因菌でありキーストーン細菌とされている*P. gingivalis*および医療・介護関連肺炎の起因菌である*S. pneumoniae*はともにAPの病態形成に強く関与することが推察される。申請者は先行研究にて*P. gingivalis*と*S. pneumoniae*のマウスへの混合感染により*S. pneumoniae*による肺炎が増悪されるか検証したが、*P. gingivalis*そのものでは肺炎の増悪を認めなかった。これは、肺の好気環境下では偏性嫌気性菌である*P. gingivalis*が感染、増殖することが困難であるためと考え、*P. gingivalis*培養上清(PgSup)と*S. pneumoniae*をマウスに混合感染することで誤嚥性肺炎モデルマウスを作製し、肺炎が*S. pneumoniae*単独感染よりも増悪することを示した(Okabe et al. Int J Mol Sci. 2021)。しかし、*P. gingivalis*の菌体成分/分泌物中のどの因子が肺炎の増悪に関与するかは明らかにならず、詳細な解析が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

*P. gingivalis*はリポポリサッカライド(LPS)、ジンジパイン、線毛などの病原因子を発現しており、これらの因子が宿主細胞を活性化し、炎症巣の形成に大きな役割を果たしている。申請者は、これらの因子またはジンジパインの阻害因子(ロイペプチン)を含んだPgSupを*S. pneumoniae*と混合感染することにより*P. gingivalis*の病原因子が肺炎に与える影響の検証を行うことが出来ると考えた。本研究により歯周病原細菌の誤嚥性肺炎に与える影響の詳細な機序が解明されれば歯周病原細菌をターゲットにした新規治療法の開発に繋がること多いに期待される。

3. 研究の方法

(1) *S.pneumoniae*, *P.gingivalis* の培養

*S.pneumoniae*URF918株を血液寒天培地で嫌気培養を行う。形成されたコロニーを yeast extract、ヘミン、メナジオンを含むTrypticase Soy Broth(sTSB)で嫌気培養し、菌体懸濁液の調整を行った。

P.gingivalis ATCC 33277株を血液寒天培地で嫌気培養を行った。形成されたコロニーをsTSBで24時間嫌気培養し、その菌体懸濁液を新しいsTSBに再添加、24時間培養後遠心分離、フィルター濾過を行うことでPgSupの調整を行った。

(2) ジンジパイン阻害因子投与量の確認

6週齢雄性C57BL/6マウスに三種混合麻酔(塩酸メドミジン、ミタゾラム、酒石酸ブトルファノール)下で、喉を切開し、気管からプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチンを直接投与した。対照群としてsTSBを投与したマウスを用いて、生存率の検討及び採取した肺構成細胞を用いた細胞毒性を検討し、これらに影響を与えない投与量を決定した。

(3) PgSup中に含まれる線毛量の測定

ATCC33277由来の*P. gingivalis*変異株SMF-1(FimA線毛)をブルセラHK寒天培地(KYOKUTO, Tokyo, Japan)に5%[V/V]ウサギ血清、2.5µg/mlヘミン(Sigma-Aldrich)を添加、調整し、37℃、嫌気条件下で培養した。液体培地は、Trypticase soy broth(Thermo Fisher Scientific)、0.25% yeast extract(Thermo Fisher Scientific)および蒸留水を混合し、滅菌後2.5µg/mlヘミン、5µg/mlメナジオンを加えて調整した。

FimA線毛の精製は、フランス式圧力セル(OHTAKEWORKS, Osaka, Japan)で破碎した*P. gingivalis*を超遠心分離し、上清を硫酸アンモニウム(50%飽和)で沈殿させた。

線毛の純度はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルゲル電気泳動によって確認した。

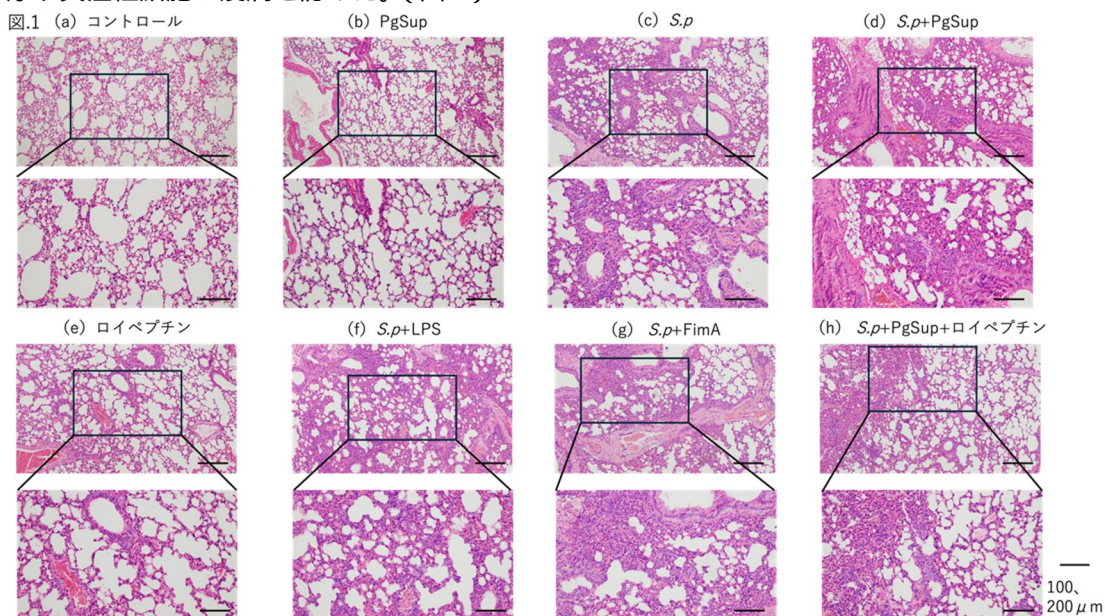
(4) LPS投与量の決定

LPSの投与量については参考論文より5mg/kgとした。(Yang et al. *cell&Bioscience*. 2022)

- (5) 肺の組織学的解析
(2)と同様の手技を用いてマウスを PgSup 投与群、*S.pneumoniae* 投与群、ロイペプチン投与群、*S.pneumoniae* と PgSup 混合投与群、*S.pneumoniae* と線毛混合投与群、*S.pneumoniae* と LPS 混合投与群、*S.pneumoniae* と PgSup・ロイペプチンの混合懸濁液投与群、コントロール群 (STS 投与) の 8 群に分けて 24 時間飼育する。これらのマウスを屠殺、回収した肺から肺切片を作製し、HE 染色による病理組織学的解析を行った。
- (6) フローサイトメトリー解析
(4)と同様に感染、屠殺後回収した肺から肺ホモジナイズを作製し、単一細胞懸濁液を調整後、肺における好中球/マクロファージ分画をフローサイトメトリーにより解析を行った。
- (7) 肺組織内遺伝子発現の検討
(4)と同様に感染、屠殺後回収した肺をホモジナイズ後、遠心分離を行い、Nucleospin RNA キットを使用し total RNA を抽出、qPCR 法を用いて、TNF- α 、CXCL1/KC、CXCL2/MIP-2、について遺伝子発現の比較検討を行った。
- (8) 肺組織内タンパク発現の検討
4.と同様に感染、屠殺後回収した肺をホモジナイズ後、遠心分離を行い、上清を回収した。ELISA 法を用いて TNF- α 、KC、MIP-2 についてタンパク発現の定量を行った。

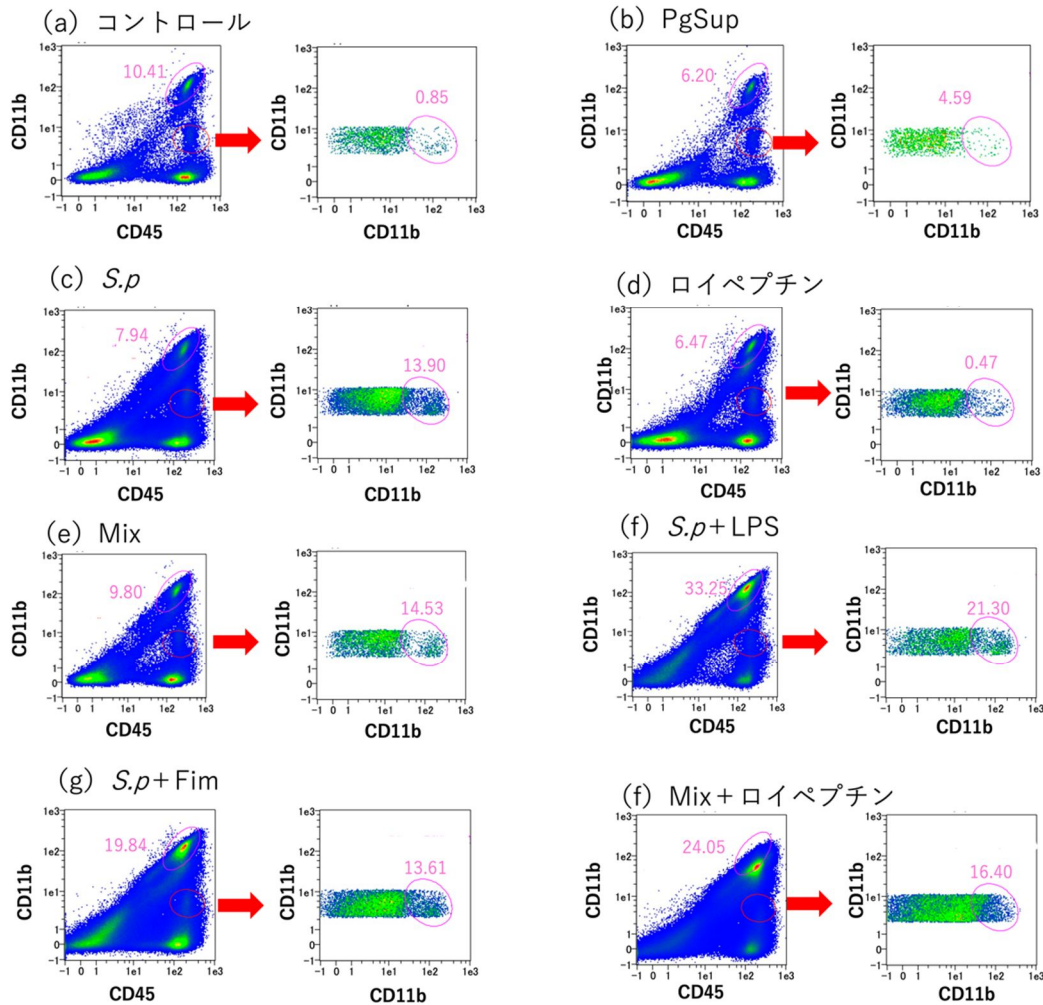
4. 研究成果

- (1) ロイペプチン投与量の決定
C57BL/6 マウスにロイペプチンを 1、10、50、100 (mg/kg) 投与し、サバイバルレートを行った。結果として 50mg/kg においてマウスの脱落が認められなかったため、以降の投与量を 50mg/kg と定めた。
- (2) PgSup 中に含まれる線毛量の測定
獲得した *P. gingivalis* 培養液を硫酸アンモニウムを用いて濃縮し、培養液中に 0.00477mg/ml の線毛が含まれていることがわかった。以降の感染においては精製した FimA 原液 0.27021mg/ml を希釈して用いた。
- (3) 肺組織における病理組織学的解析
P. gingivalis、*S.pneumoniae*、ロイペプチン、線毛、LPS の混合感染を行い、肺を回収後、肺切片を作成した。その後、肺組織の HE 染色による病理組織学的評価を行った。コントロール投与群、PgSup 投与群、ロイペプチン投与群と比較して各感染群において間質の肥厚や炎症性細胞の浸潤を認めた。(図.1)



- (4) 肺組織における浸潤炎症細胞のフローサイトメトリー解析
病理組織像より、感染群において炎症細胞の浸潤を認めたことから、肺における好中球/マクロファージ分画をフローサイトメトリーにより解析を行った。各感染群において好中球/マクロファージ数の増加傾向は認めたが有意差は認めなかった。(図.2)

図.2

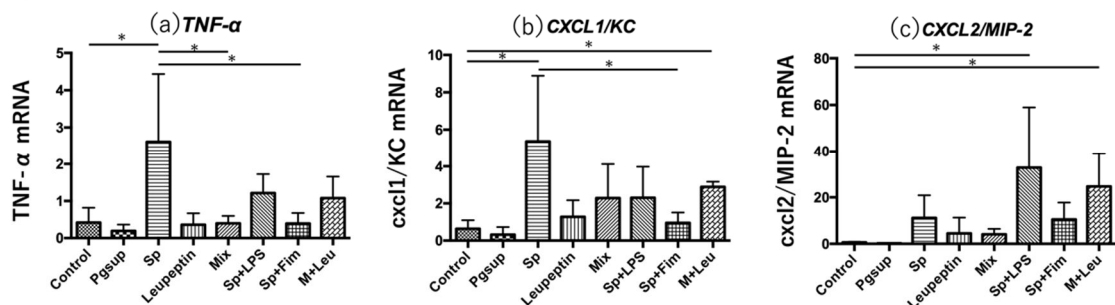


	好中球	マクロファージ
コントロール	9.187 ± 3.547	3.553 ± 5.006
PgSup	7.037 ± 2.188	6.053 ± 5.795
<i>S.p</i>	11.21 ± 6.217	13.04 ± 4.497
ロイペプチン	15.35 ± 12.17	6.035 ± 7.870
Mix (<i>S.p</i> + PgSup)	18.72 ± 16.59	13.89 ± 1.493
<i>S.p</i> +LPS	32.43 ± 9.457	17.62 ± 3.187
<i>S.p</i> +Fim	16.20 ± 3.211	10.83 ± 8.144
Mix+ロイペプチン	25.47 ± 3.126	12.22 ± 9.933

(5) 肺組織における遺伝子発現の検討

肺の炎症に関与する因子を調べるために、炎症性サイトカインとケモカインの mRNA の発現を qPCR で調べた。*S.pneumoniae* 投与群において *TNF-α*、*CXCL-1*、*S.pneumoniae* と PgSup・ロイペプチンの混合懸濁液投与群において *CXCL-1*、*CXCL-2*、*S.pneumoniae* と LPS 混合投与群において *CXCL-2* の有意な増加を認めた。また *S.pneumoniae* 投与群と比較して *S.pneumoniae* と PgSup 混合投与群では *TNF-α*、*S.pneumoniae* と線毛混合投与群では *TNF-α*、*CXCL-1* の有意な発現低下が認められた。(図.3)

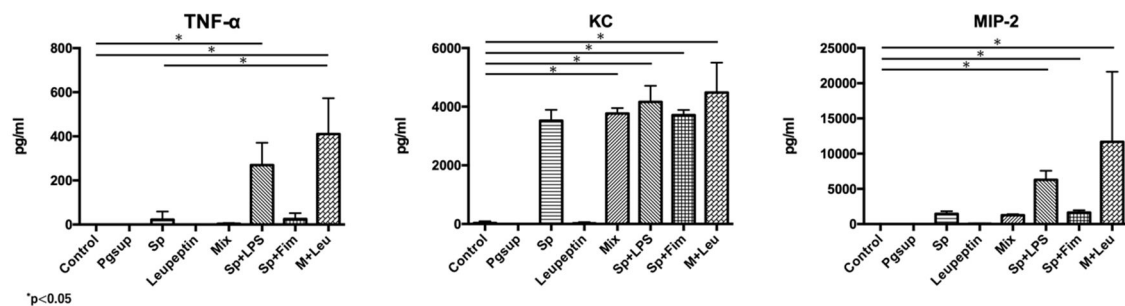
図.3



(6) 肺組織におけるサイトカイン産生解析

S.pneumoniae 感染マウスの炎症性サイトカインとケモカインの産生に対する各病原因子の影響を調べるためタンパク質レベルで調べた。*S.pneumoniae* と LPS 混合投与群、*S.pneumoniae* と PgSup・ロイペプチンの混合懸濁液投与群において TNF- α 、KC、MIP-2、*S.pneumoniae* と線毛混合投与群において KC、MIP-2、*S.pneumoniae* と PgSup 混合投与群では TNF- α の有意な産生の増加を認めた。また、*S.pneumoniae* と PgSup・ロイペプチンの混合懸濁液投与群において *S.pneumoniae* 投与群と比較し有意な産生の増加を認めた。
(図.4)

図.4



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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------