

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11430

研究課題名(和文) 口腔細菌がインフルエンザ感染に及ぼす影響の解明とそれを基盤とした感染予防への応用

研究課題名(英文) Study on the effects of oral bacteria in influenza virus infection

研究代表者

神尾 宜昌 (KAMIO, Noriaki)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：60546472

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)：本研究では、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* が産生する酵素によりインフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)を開裂し、ウイルス感染を促進するか検討した。その結果、*P. gingivalis* によりHAは開裂し、ウイルスが宿主細胞に感染できるようになることが明らかとなった。*P. gingivalis* は、トリプシン様酵素であるジンジパインを産生することから、ジンジパイン阻害薬ならびにジンジパイン欠損株を用いて検討を加えた。その結果、アルギニンを切断するジンジパイン(Rgp)がHAを開裂し、ウイルスの感染性獲得に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：During the initial critical steps in influenza A virus (IAV) infection, cleavage of the viral hemagglutinin (HA) by trypsin-like protease is required for expression of fusion activity and virus entry into cells. *Porphyromonas gingivalis* produces trypsin-like proteases, such as arginine-gingipain (Rgp) and lysine-gingipain (Kgp). We found that *P. gingivalis* culture supernatants had the ability to cleave HA, thereby, contribute to induction of viral infection. Moreover, we also demonstrated that Rgp inhibitor suppressed HA cleavage and infected cells via *P. gingivalis* culture supernatants. In addition, the culture supernatants of *P. gingivalis* Rgp-null mutant and Rgp/Kgp-null mutant were not able to cleave HA, thereby, inhibit the spread of IAV infection. In contrast, culture supernatants of wild-type and Kgp-null mutant activated infectivity IAV through HA proteolytic cleavage. Taken together, these results suggest that Rgp has the ability to cleave HA and contribute to viral spread.

研究分野：微生物学

キーワード：インフルエンザウイルス 口腔細菌 ジンジパイン

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では、高齢者を中心にインフルエンザにより、多くの命が失われている。インフルエンザ予防対策としてのワクチン接種は最も効果の高い手法であるものの、副反応の危険性があるとともに、新型インフルエンザによるパンデミックに対応することは極めて困難である。そのため、高齢者などにも応用でき、ウイルスの抗原変異による影響を受けない予防法の確立は喫緊の課題となっている。

口腔ケアがインフルエンザの予防に有効であるとの報告があり(Arch Gerontol Geriatr. 43:157-164. 2006)、口腔とインフルエンザが密接に関連していることが考えられる。申請者は、口腔細菌がインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響を、分子レベルで解明することを目的に検討を行ってきた。これまでの研究から、ノイラミニダーゼ(NA)産生口腔細菌(*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*)がインフルエンザウイルスの感染拡大にはたらくこと、ならびに抗インフルエンザ薬(ザナミビル)の効果を著しく減弱させることを明らかにした(*Cell Mol Life Sci.* 72:357-366. 2015)。以上の研究から、口腔細菌がインフルエンザウイルス感染に影響を及ぼしている可能性がある。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスの感染は、ウイルス表面に突出するヘマグルチニン(HA)が宿主細胞のレセプターと結合することで開始される。しかしながら、HAはそのままの状態ではHA0という形態で、シアル酸と結合できるものの膜融合できないため、HA0のみをもつウイルスには感染性がない。感染性を獲得するには、プロテアーゼによりHA0がHA1とHA2の2つのサブユニットに分解され構造変化を起こす必要がある。HAの分解に働くプロテアーゼは主に宿主由来と考えられているが、黄色ブドウ球菌由来のプロテアーゼによっても分解し、感染を促進させる(*Nature.* 325:536-537. 1987)。口腔細菌からも様々な種類のプロテアーゼが産生されている。そこで、本研究では、口腔細菌由来プロテアーゼがHAを分解することで、インフルエンザウイルスの感染を促進させるか明らかにし、口腔細菌をコントロールする口腔ケアがインフルエン

ザ予防法として重要であることを理論的に証明する。

3. 研究の方法

口腔細菌として歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* の培養上清を用いた。また、長崎大学 中山浩次教授より *P. gingivalis* のジンジパイン欠損株の分与を受け培養上清を調製した。インフルエンザウイルスは、A/Udorn/72 (H3N2) を HA 未開裂状態になるよう複製し、使用した。

口腔細菌がインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響を検討するため、イヌ腎臓由来細胞株(MDCK細胞)にウイルスを吸着させ、*P. gingivalis* 培養上清存在下で培養を行った。培養液中に放出されたウイルス量をプラーク法およびウエスタンブロット法により検討した。またウイルス感染細胞については蛍光免疫染色法およびウエスタンブロット法により検討した。

4. 研究成果

HA 未開裂のウイルスを用いて *P. gingivalis* の培養上清によりウイルスが膜融合能を獲得し感染が成立するか否かプラークアッセイにより検討した。細胞に未開裂のウイルスを吸着させ、ゲルを重層し、*P. gingivalis* の培養上清あるいはトリプシン(ポジティブコントロール)を添加し培養した。その結果、*P. gingivalis* およびトリプシンを添加したゲルでは、プラークを形成したが、未添加のゲルではプラークを形成しなかった(図1)。

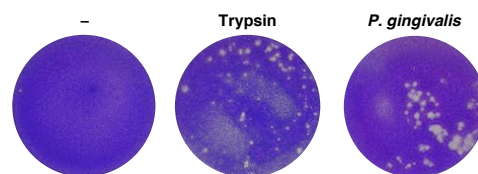


図1 ウイルスによるプラーク形成に *P. gingivalis* が及ぼす影響

さらに、ウイルスを細胞に吸着させ、*P. gingivalis* 培養上清あるいはトリプシンを添加した培地により培養後、抗ウイルス抗体による蛍光免疫染色により、感染状態を評価した。その結果、*P. gingivalis* 培養上清およびトリプシンにより、細胞へのウイルス感染は拡大していた(図2)。

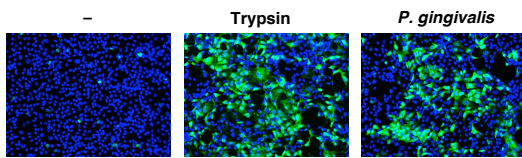


図2 *P. gingivalis* がウイルス感染に及ぼす影響

以上の結果から、*P. gingivalis* 培養上清により HA が開裂し、感染が成立したと考えられる。そこで、ウイルスを *P. gingivalis* 培養上清あるいはトリプシンにより処理し、ウェスタンブロット法により開裂状態を評価した。その結果、*P. gingivalis* 培養上清により HA を開裂させることが明らかとなった (図3)。

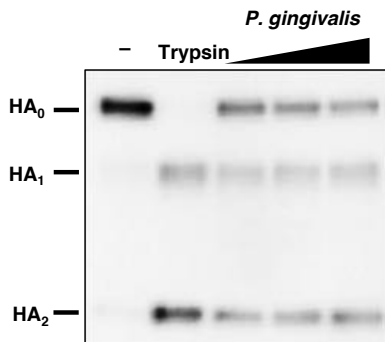


図3 *P. gingivalis* がHAの開裂に及ぼす影響

P. gingivalis は、トリプシン様プロテアーゼであるジンジパインを産生しており、アルギニンを切断するジンジパイン (Rgp) とリシンを切断するジンジパイン (Kgp) がある。HA の開裂部位がアルギニンであることから、ジンジパインがウイルス感染に及ぼす影響を調べた。*P. gingivalis* 培養上清による HA の開裂に、Rgp 阻害薬 (KYT-1) および Kgp 阻害薬 (KYT-36) が及ぼす影響を解析した。その結果、KYT-1 処理時に *P. gingivalis* 培養上清による HA の開裂が抑制され、蛍光免疫染色により解析した結果、感染が抑制された。以上の結果から、Rgp がウイルスの感染性獲得に関与していることが示唆された。

さらに、ジンジパイン欠損株培養上清がインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響を検討した。その結果、wild-type および *kgp* を欠損した *P. gingivalis* (KDP129) 培養上清では、HA は開裂し、感染が成立したが、*rgp* の欠損株 (KDP133、KDP136) では、HA は開裂せず、さらに感染も成立しなかった (図4)。以上の結果からも、Rgp がインフルエンザウイルスの感染性獲得に関与していることが示唆された。

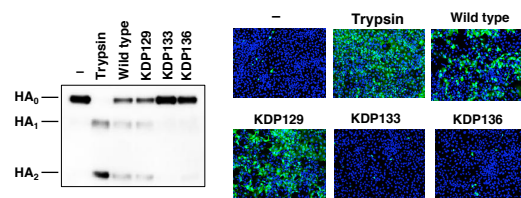


図4 ジンジパインを欠損した *P. gingivalis* がインフルエンザウイルスの感染に及ぼす影響

本研究により、*P. gingivalis* が産生する Rgp がインフルエンザウイルスの HA を開裂し、ウイルスの感染性に関与していることが示唆された。

本研究、およびこれまでの研究により、不衛生な口腔環境や歯周病により、口腔内の NA 活性やジンジパイン活性が高くなることでインフルエンザウイルスの感染を促進する可能性がある。このことから、健康な口腔がインフルエンザを予防する手段として有効であることが考えられる。

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4件)

- ① Nagashima H, Shinoda M, Honda K, Kamio N, Hasuike A, Sugano N, Arai Y, Sato S, Iwata K. CXCR4 signaling contributes to alveolar bone resorption in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in mice. J Oral Sci. 59:571-577. 2017 査読有
- ② Nagashima H, Shinoda M, Honda K, Kamio N, Watanabe M, Suzuki T, Sugano N, Sato S, Iwata K. CXCR4 signaling in macrophages to periodontal hypersensitivity in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in mice. Mol Pain. 13. 1744806916689269. 2017 査読有
- ③ Seki K, Cueno ME, Kamio N, Saito Y, Kamimoto A, Kurita-Ochiai T, Ochiai K. Varying butyric acid amounts induce different stress- and cell death-related signals in nerve growth factor-treated PC12 cells: implications in neuropathic pain absence during periodontal disease progression. Apoptosis. 21:699-707. 2016 査読有
- ④ Cueno ME, Kamio N, Seki K, Kurita-Ochiai T, Ochiai K. High butyric acid amounts induce oxidative stress, alter calcium homeostasis, and

cause neurite retraction in nerve growth factor-treated PC12 cells. Cell Stress Chaperones. 20:709-713. 2015
査読有

〔学会発表〕(計20件)

- ① 神尾 宜昌, 早田 真由美, 渡辺 典久, 納富 啓子, 田村 宗明, 今井 健一, 歯周病原菌 *P. gingivalis* は PAFR の発現と肺炎球菌の肺上皮細胞への付着を促進する, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年
- ② 神尾 宜昌, 早田 真由美, 渡辺 典久, 田村 宗明, 今井 健一, 歯周病原菌と肺炎発症との関連: *Porphyromonas gingivalis* は気道上皮細胞において肺炎球菌受容体 PAFR の発現を増強する, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年
- ③ 神尾 宜昌, 落合 邦康, 今井 健一, *Streptococcus pneumoniae* 培養上清はインフルエンザウイルス感染拡大に働く, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年
- ④ 神尾 宜昌, 今井 健一, *Porphyromonas gingivalis* がインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響, 第 65 回日本口腔衛生学会・総会, 2016 年
- ⑤ 神尾 宜昌, 今井 健一, 落合 邦康, 肺炎球菌培養上清はインフルエンザウイルスの感染拡大に働く, 2016 年
- ⑥ Noriaki Kamio, Kenichi Imai, Kazufumi Shimizu, Kuniyasu Ochiai, 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の産生するジンジパインがインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015 年
- ⑦ 神尾 宜昌, 今井 健一, 中山 浩次, 落合 邦康, ジンジパインがインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年
- ⑧ 神尾 宜昌, 今井 健一, 落合 邦康, ノイラミニダーゼ産生口腔細菌はインフルエンザウイルス感染を促進する, 第 89 回日本感染症学会学術講演会, 2015 年

〔図書〕(計1件)

- ① 神尾 宜昌, 落合 邦康, シーエムシー出版, 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患, 2015, 127-134

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神尾 宜昌 (KAMIO, Noriaki)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号: 60546472

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

清水 一史 (SHIMIZU, Kazufumi)

神戸大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号: 50004677

今井 健一 (IMAI, Kenichi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号: 60381810

田村 宗明 (TAMURA, Muneaki)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号: 30227293

(4) 研究協力者

()