

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15773

研究課題名（和文）歯周病制圧を目指したプロバイオティクスとしてのバクテリオファージセラピーの開発

研究課題名（英文）Development of a bacteriophage therapy against periodontopathic microbiome

研究代表者

久保庭 雅恵（KUBONIWA, MASAE）

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：00303983

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病原性細菌叢のディスバイオシスへの関与が強く示唆されている歯周病関連菌 *Filifactor alocis* を主たる標的として研究を進めた。まず、*F. alocis* ビルレントファージの単離を可能とすべく、同菌の長期培養が可能となる培地の検討を完了したが、同菌特異的なファージ単離には至らなかった。そこで、*F. alocis* が、環境中に放出するアミノ酸の一斉解析を実施した。その結果、L-アミノ酸10種、D-アミノ酸4種が同菌から産生・放出されていることが確認され、近傍に存在する歯周病菌の生育をサポートしている可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We performed this study with a periodontitis-associated microbe, *Filifactor alocis*, as a target. First, we tried to isolate a *F. alocis*-specific bacteriophage from culture supernatant acquired from *F. alocis* continuous culture. This experiment still continues today. Next, we performed an amino acids profiling of *F. alocis* culture supernatant, to know the influence of *F. alocis* on oral microbiome dysbiosis by secreting metabolites into the environment. It was revealed that 10 L-amino acids (Asn, Ser, Gly, Ala, Pro, Val, Ile, Leu, Phe, Lys) and 4 D-amino acids were secreted by *F. alocis*. This finding will provide clues about dysbiosis in oral microbiome.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔細菌叢 歯周病

1. 研究開始当初の背景

近年のメタゲノム研究の進展に伴い、歯周病は、特定の病原性菌の感染症ではなく、口腔細菌叢を構成する菌の種類と量のプロファイルの乱れ(ディスバイオシス)に起因するものであるという考え方が主流となりつつある。しかし、一旦ディスバイオシスを呈した口腔細菌叢から病原性発揮に関連する菌種のみを排除するための決定的な除菌法は未だなく、細菌検査後の措置で菌種特異的な治療手段を患者に提示できないことが、臨床現場で歯周病細菌検査が普及しない一因となっている。

歯周病原性に関連する菌種が定量検出されても、従来から実施されているブラッシング指導、スクレーピング、ルートプレーニング、歯周ポケットへの抗生剤含有ペーストの貼薬、抗生剤の使用等で病原性菌と常在菌の数を同じように減少させ、リコール間隔を短めに設定する治療法では、一時的に口腔内の総菌数を減少させることは出来ても、細菌叢の構成菌種を変化させることはできないため、再発のリスクが高い。そのため、予防歯科の臨床現場において、長期管理中に再発する歯周疾患を防止出来るかどうかは、術者の技量と患者のセルフケア能力に依存しているのが現状である。本研究においては、物理的プラークコントロールや化学的プラークコントロールでは不可能な、歯周病原性に関連する菌種特異的な除菌を実施することで、このリスクを低減させることを目指している。

2. 研究の目的

本研究においては、宿主特異性が高いことで知られるバクテリオファージをプロバイオティクスとして利用することで、菌種特異的な除菌法を確立し、健全な口腔細菌叢にプロファイルを回復させる新規治療法の開発を目的とする。

研究対象としては、近年のメタゲノム研究によって歯周病原性細菌叢のディスバイオシスへの関連が強く示唆されている *Filifactor alocis* を主たる標的として研究を進めることとする。

研究期間内に *F. alocis* 特異的なバクテリオファージの単離が困難な場合、*F. alocis* と他菌種間で繰り広げられている、代謝物質を介した相互作用についての基礎的知見を得るため、*F. alocis* が環境中に放出している代謝物質についての検討を進めることとする。

3. 研究の方法

(1) *F. alocis* を宿主とするビルレントファージの単離

臨床サンプルからの *F. alocis* の単離

F. alocis は *Fusobacterium* 属と近縁種であることから、*Fusobacterium* 属選択培地を一部改変した *F. alocis* 選択培地の作製を試みた。Wang らの報告より、*F. alocis* ATCC35896 株はテトラサイクリン耐性遺伝

子を有していることが明らかとなっている [Wang et al.(2016) Scientific Reports 6:20389]。そこで、*Fusobacterium* 属の選択培地として報告されている CVE 培地の組成を一部改変した mCVE 培地 (10 g/L soy Trypticase, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 0.2% glucose, 0.02% tryptophan, 5% sheep blood, 5 µg/mL crystal violet, 10 µg/mL tetracycline) を作製し、臨床サンプル(舌苔、歯肉縁下プラーク)からの *F. alocis* の単離を試みた。臨床サンプルを mCVE 培地に懸濁し、嫌気条件下で 37、4 日間培養し、得られた菌液を 10 µg/mL tetracycline 含有血液寒天培地上に播種した。得られたコロニーをピックアップし、16s rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法によって *F. alocis* かどうかの判定を行った。

F. alocis を宿主とするビルレントファージの単離

これまでに、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Serotype b、および *F. nucleatum* への溶菌能を有するビルレントファージの単離が報告されている [Castillo-Ruiz et al.(2011) Applied and Environmental Microbiology 77(9):3157-3159], [Machuca et al.(2010) Applied and Environmental Microbiology 76(21):7243-7250] ことから、これらの手法を参考に、下記の手順で *F. alocis* のビルレントファージの単離を試みた。

1) 唾液、歯肉縁下プラーク、舌苔を採取後、滅菌 PBS にて懸濁し、遠心操作にてデブリーおよび細菌菌体を大まかに除去した。

2) ファージを含む上清を回収し、*F. alocis* ATCC35896 株を純培養した菌液に OD=0.2 程度となるよう添加し、嫌気状態に維持されている連続培養装置にて 2 ~ 7 日間培養し、*F. alocis* に感染可能なファージを十分増殖させた。

3) 上記培養液を回収後、臨床サンプル由来の細菌の混入を完全に排除するため、ポアサイズ 0.45 µm のフィルターを用いたフィルトレーションにて培養液中の細菌を全て除去し、上清のみを回収した。

4) BHI アガープレートの上に、静止期まで増殖した *F. alocis* を 0.7% アガーに混合した層をのせて二層プレートとし、3) で得られたフィルトレーション後のファージ含有上清を一滴ずつ滴下した。

(2) *F. alocis* が環境中に放出している代謝物質についての検討

歯周病患者の歯周ポケットより高頻度に歯周病菌と同時検出され、歯周病関連菌と位置付けられている *F. alocis* が、どのような代謝物質を環境中に放出し、近隣の菌に提供しているのかを知るため、培養上清のアミノ酸一斉解析を実施した。

改良 BHI 培地 [vitamin K (0.5 µg/ml), hemin (5 µg/ml), cysteine (0.1%) arginine (100 µg/ml) 添加 BHI 培地] に *F. alocis* ATCC35896 株のコロニーを播種し、37 嫌気条件下で 3 日間培養して後期対数増殖期の *F. alocis* を得た。

後期対数増殖期の *F. alocis* 菌体を遠心にて回収し、生理食塩水にて 2 回洗浄した後 1×10^{10} cfu を成分既知最小培地に懸濁し、37 嫌気条件下で 12 時間培養した後遠心にて上清を回収し、直径 0.22 µm のフィルターを用いたフィルトレーションにて完全に菌体を除去した。

回収した *F. alocis* 培養上清中のアミノ酸を、4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて蛍光誘導体とし、二次元 HPLC にて分析した。

4. 研究成果

(1) *F. alocis* を宿主とするビルレントファージの単離

臨床サンプルからの *F. alocis* の単離

本研究で使用した選択培地からは、*F. alocis* 以外にも *Fusobacterium* 属、*Prevotella* 属などが多数検出されたため、現在プロトコルの見直しを進めている。

F. alocis を宿主とするビルレントファージの単離

F. alocis 溶菌活性を有するビルレントファージが存在した場合、滴下した液の周囲に菌の溶解による透明スポットが形成される。この部分を回収して液体培地に懸濁、希釈し、同様の手法で二層プレートへの滴下と植え継ぎを繰り返す、ビルレントファージを単離する予定であったが、滴下した液の周囲に菌の溶解による透明スポットが形成されず、ビルレントファージの単離には至らなかった。今後、様々な臨床検体提供者からの試料を用いてさらなる検討を加える予定である。

(2) *F. alocis* の培養上清のアミノ酸一斉解析

F. alocis が環境中にどのような代謝物質を放出することで細菌叢全体の歯周病原性を高めているのかについて、アミノ酸一斉解析により詳細に検討した。その結果、同菌が菌体外に放出しているアミノ酸は D-アミノ酸が 4 種、L-アミノ酸が 10 種 (Asn, Ser, Gly, Ala, Pro, Val, Ile, Leu, Phe, Lys) 存在することが明らかとなった。

歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* と *Treponema denticola* は、Gly 産生を介して互いの病原性を亢進させることが報告されている [Tan et al. (2014) PLoS Pathog. 6;10(3):e1003955]。本研究は、アミノ酸の環境中への放出を介して、*F. alocis* が近傍の歯周病菌の病原性亢進をサポートする可能性を示した。

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 10 件)

(1) 原著論文

Sakanaka A, Kuboniwa M*, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A (2017): Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status.

Scientific Reports, 7:42818. (査読有)

doi: 10.1038/srep42818.

Kuboniwa M*, Sakanaka A, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A (2016): Prediction of periodontal inflammation via metabolic profiling of saliva.

Journal of Dental Research, 95(12):1381-1386. (査読有)

doi: 10.1177/0022034516661142.

Takeuchi H*, Takada A, Kuboniwa M, Amano A* (2016): Intracellular periodontal pathogen exploits recycling pathway to exit from infected cells.

Cellular Microbiology, 18(7):928-948. (査読有)

doi: 10.1111/cmi.12551.

Izui S, Sekine S, Maeda K, Kuboniwa M, Takada A, Amano A, Nagata H* (2016): Antibacterial activity of curcumin against periodontopathogenic bacteria.

Journal of Periodontology, 87(1):83-90. (査読有)

doi: 10.1902/jop.2015.150260.

Sakanaka A, Kuboniwa M*, Takeuchi H, Hashino E, Amano A (2015): Arginine-Ornithine Antiporter ArcD Controls Arginine Metabolism and Interspecies Biofilm Development of *Streptococcus gordonii*, The Journal of Biological Chemistry, 290(35): 21185-21198 (査読有)

doi: 10.1074/jbc.M115.644401.

(2) 総説

Sakanaka A, Takeuchi H, Kuboniwa M, Amano A* (2016): Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells.

Microbial Pathogenesis, 94(5): 42-47. (査読有)

doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.003.

坂中哲人, 久保庭雅恵, 天野敦雄 (2016): *Fusobacterium nucleatum* との栄養共生における *Streptococcus gordonii* アルギニン・オルニチンアンチポーター ArcD の機能解析

大阪大学歯学雑誌, 61(1):1-4.

久保庭雅恵 (2016): 歯垢 (デンタルバイ

オフィーム)の病原性変化: Microbial shift コラム1 特別企画「新時代の歯周病を知る」

日本歯科評論, 76(5): 40-41.

久保庭雅恵(2016): 抗菌薬で歯周病は治るのか

コラム5 特別企画「新時代の歯周病を知る」

日本歯科評論, 76(5): 55.

天野敦雄, 竹内洋輝, 久保庭雅恵 (2015): 歯周病の発症と全身疾患: 21世紀の新展開

日本臨床腸内微生物学会誌 17(1):26-32.

〔学会発表〕(計7件)

(1) 特別講演

Kuboniwa M

Insight into the oral microbiome study.
2nd Symposium 2016 of Yeongnam Branch of Korean Academy of Preventive Dentistry and Oral Health,
2016/11/25, Daegu, Korea_

Kuboniwa M

Application of metabolomics for oral microbiome studies.

Streptococcus mutans and systemic diseases 2016 “Cutting-edge knowledge and future perspectives”
2016/10/11, Suita, Japan

Kuboniwa M

New insight into molecular control of subgingival microbiome.

Yonsei University College of Dentistry Centennial Memorial Symposium,
2015/11/6, Seoul, Korea

(2) シンポジウム

久保庭雅恵

Metabolomic shifts during periodontopathic microbiome maturation.

第90回日本細菌学会総会シンポジウム S20「細菌の集団形成とその制御機構の新展開」, 仙台国際センター, 2017年3月21日, 仙台

(3) 一般講演

Sakanaka A, Kuboniwa M, Hashino E, Amano A:

Microbially derived metabolites in saliva affect initiation of periodontitis.

63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, October 29, 2015, Osaka

久保庭雅恵, 坂中哲人, 福崎英一郎、

天野敦雄

アルギニン代謝物質による *P. gingivalis* バイオフィーム形成能の制御

第29回日本バイオフィーム学会、
2015年7月11日、蒲都市
坂中哲人、久保庭雅恵

Fusobacterium nucleatum との栄養共生における *Streptococcus gordonii* アルギニン・オルニチンアンチポーターArcDの機能解析

平成27年度大阪大学歯学会優秀研究奨励賞受賞講演 大阪大学歯学会第122回例会, 2016年7月14日, 吹田市_

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保庭 雅恵 (Kuboniwa, Masae)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 00303983

(2) 研究分担者

小島 美樹 (Ojima, Miki)

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号: 20263303

(平成27年度まで分担者として参画)