

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11628

研究課題名（和文）肺炎球菌感染と歯周病原細菌ヌクレアーゼの相互作用の解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of nucleases from periodontal bacteria and the role in pneumococcal infection

研究代表者

深町 はるか（Fukamachi, Haruka）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10433799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：肺炎の主要な原因細菌は肺炎球菌や肺炎桿菌であるが、肺炎の検体から口腔内の歯周病原性菌の検出頻度が高いことが報告されている。本研究では、肺炎球菌感染における歯周病原細菌の役割を解明するために、歯周病原細菌の産生するヌクレアーゼに着目し、その機能解析と肺炎球菌の病態における相互作用を解明した。歯周病原細菌 *P. intermedia* が高いヌクレアーゼ活性をもつこと、歯周病原細菌の培養上清が肺炎球菌のレセプターの発現を誘導し、肺炎球菌の宿主細胞への付着を増加させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内細菌、特に歯周病原性細菌が肺炎検体から高頻度に分離されるが、肺炎の病態における影響は依然として不明である。本研究では、歯周病原細菌の産生する物質に着目して肺炎球菌感染に及ぼす影響を解析し、肺炎球菌の定着に歯周病原性細菌が関与することが示唆された。この研究成果は、肺炎球菌感染における歯周病原細菌の役割が示され、今後定着の阻害から予防法を確立する際の基礎的知見となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The main causative bacteria of pneumonia are *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae*, but it has been reported that periodontal pathogenic bacteria in the oral cavity are frequently detected from pneumonia specimens. In this study, to elucidate the role of periodontopathic bacteria in pneumococcal infection, we focused on nucleases produced by periodontopathic bacteria, analyzed their functions, and elucidated their interactions in the pathophysiology of pneumococcus. It was clarified that the periodontopathic bacterium *P. intermedia* has high nuclease activity and that the culture supernatant of the periodontopathic bacterium induces the expression of the pneumonia bacillus receptor and increases the attachment of the periodontal pathogenic bacteria to the host cell.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯周病原性細菌 ヌクレアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎は、日本における死因別死亡率で第3位を占め、感染症関連死亡で最多である。高齢者での肺炎の多くが誤嚥によるものとされ、不顕性誤嚥により口腔内容物中の口腔細菌を気管や肺に吸引し肺炎を発症する。口腔衛生状態の不良や歯周疾患を有する場合で、口腔内の嫌気性菌の増加は、呼吸器疾患の危険因子であることが示唆されており(J Periodontol. 82:1155-60 2011)、誤嚥性肺炎の原因細菌としても歯周病原細菌や口腔レンサ球菌が報告されている(J Periodontol. 70: 793-802 1999)。市中肺炎においても口腔細菌の関連が報告されており、市中肺炎においては肺炎球菌が主要な病原細菌であるが(N Engl J Med 333: 1618 1995)、Yamasakiらの研究では、検体中の病原微生物を同定した結果、約16%で *Neisseria* 属、口腔レンサ球菌、*Corynebacterium* 属の細菌が、また約16%で口腔の偏性嫌気性菌である *Prevotella* 属、*Fusobacterium* 属の細菌が検出されたことが報告され、市中肺炎においても口腔内細菌の関与が示唆された(PLoS One 8:e63103 2013)。このように、肺炎感染症の病態において口腔内の歯周病原細菌の検出頻度が高いことが報告されているが、病態への関与については不明な点が多い。そのため、肺炎球菌感染における歯周病原細菌の役割を解明することが重要である。

## 2. 研究の目的

肺炎球菌感染における歯周病原細菌の役割を解明するために、歯周病原細菌の産生する物質に着目し、肺炎球菌の病態(感染成立や病巣の拡大・増悪)における相互作用を解明する。

肺炎球菌が感染を成立させるために最初に直面する気道・肺において、好中球細胞外トラップ(Neutrophil Extracellular Traps: NETs)が形成されている。NETsは網目状の細胞外構造体で、物理的に病原微生物を捕捉・殺菌し、感染を防御する機能を持ち、肺炎球菌感染に対する防御の最前線であると考えられる。一部の病原細菌は nuclease を産生し、NETs を分解して宿主の捕捉から逃れ、感染の成立のための病原因子とされる。肺炎球菌感染において、共感染する細菌によって産生される nuclease は、感染拡大につながる事が推測される。そこで、本研究では、肺炎球菌と歯周病原細菌の産生する nuclease に着目して、その分子生物学的な解析と、歯周病原細菌が肺炎球菌感染に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯周病原細菌の nuclease 産生能の比較

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* を用いて、nuclease agar plate assay で nuclease 産生能を比較した。また、培養上清から粗精製した nuclease を用いて NETs 分解を評価した。NETs はヒト末梢血からデキストランと percoll 比重遠心法を用いて分離した好中球を PMA で誘導して作製した。

### (2) *P. intermedia* nuclease の分子生物学的解析

nuclease 活性の高い *P. intermedia* の分泌型 nuclease である nucA および nucD をクローニングし、それらの遺伝子産物の分子生物学的な解析を行った。

### (3) 歯周病原細菌存在下での PAFR 発現解析

A549 細胞(ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞)を用いて、歯周病原細菌の培養上清存在下での肺炎球菌のレセプター Platelet activating factor receptor (PAFR) 発現量を real-time PCR および western blot で評価した。

### (4) 歯周病原細菌存在下での肺炎球菌感染への影響

培養細胞系: A549 細胞に、歯周病原細菌の培養上清存在下で肺炎球菌を感染させ、A549 細胞に付着した肺炎球菌数を求めた。マウス感染モデル: 肺炎球菌と歯周病原細菌の培養上清および rNucA, rNucD を混和し、Balb/c マウスに経鼻投与後、生存率と気管支肺胞洗浄液、血液、脾臓における肺炎球菌の細菌数を算出した(実験中)。

## 4. 研究成果

### (1) 歯周病原細菌の nuclease 産生能

細胞外に分泌される nuclease が細菌から拡散して、細菌スポット周囲に透明な DNA 分解環を形成した。DNA 分解活性は *P. intermedia* で特に顕著に認められた(図1)。

DNA 分解活性の病原性の役割を評価するために、培養上清から粗精製した nuclease を NETs に添加して 90 分後に DAPI で染色した。*P. intermedia* では暴露後に分解されて NETs の構造がみられなかった(図2)。

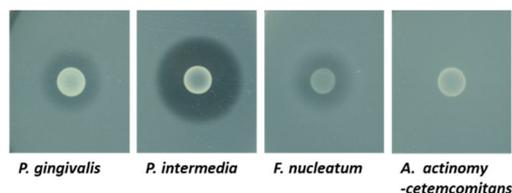


図1: 歯周病原細菌の nuclease 産生能

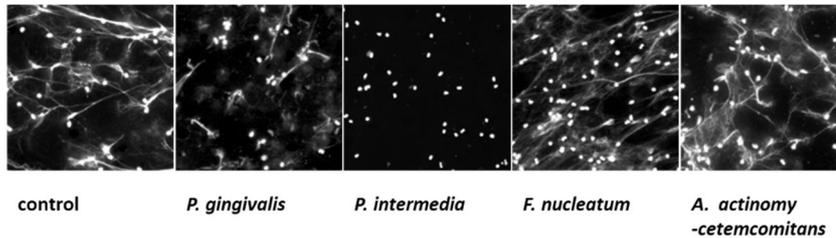


図 2：粗精製した培養上清による NETs 分解活性

(2) *P. intermedia* nuclease の分子生物学的解析

*P. intermedia* の分泌型 nuclease である *nucA* および *nucD* をクローニングし、それらの遺伝子産物の分子生物学的な解析を行った。rNucA と rNucD 共に環状二本鎖 DNA、環状一本鎖 DNA および RNA を基質とした。活性の発現には  $Mg^{2+}$  および  $Ca^{2+}$  を必要とした。至適 pH は、rNucA は pH6.0~7.0、rNucD は pH 6.0~8.0 であった。

rNucA および rNucD の NETs 分解活性を評価した。核 DNA を DAPI (青) で染色し、好中球エラスターゼを抗ヒト好中球エラスターゼ抗体と Cy3 標識二次抗体 (オレンジ) で検出した。rNucA と rNucD 共に、NETs を分解した (図 3)。

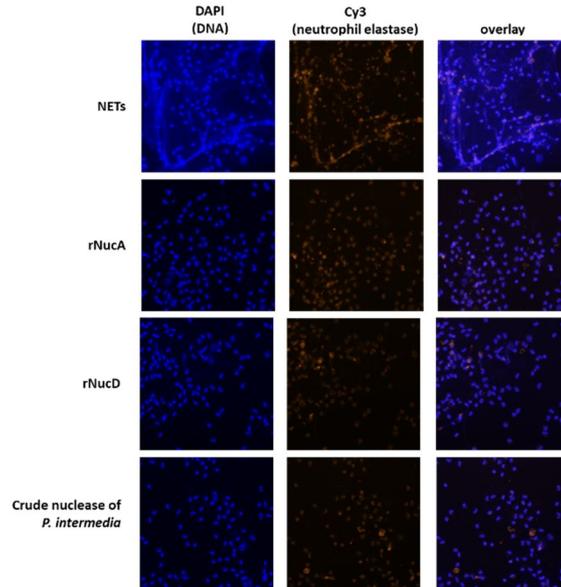


図 3：精製した rNucA, rNucD および *P. intermedia* 粗精製 nuclease による NETs の分解

(3) 歯周病原細菌存在下での PAFR 発現解析

A549 細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞) に歯周病原細菌の培養上清を作用させると、肺炎球菌のレセプターである Platelet activating factor receptor (PAFR) の mRNA の発現が上昇していた。western blot でタンパク質レベルでも発現が上昇していた (図 4)。rNucA, rNucD では mRNA、タンパク質レベルでの発現誘導は認められなかった。

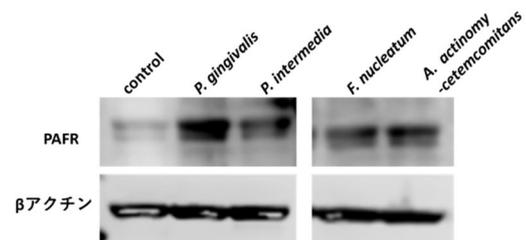


図 4：培養上清添加時の PAFR 発現

(4) 歯周病原細菌存在下での肺炎球菌感染への影響

培養細胞系：A549 細胞に、歯周病原細菌 *P. gingivalis*, *P. intermedia* の培養上清存在下で肺炎球菌を感染させ、A549 細胞に付着した肺炎球菌数を求めたところ、付着は優位に増加していた。PAFR アンタゴニスト CV-3988 の前処置で肺炎球菌の付着の増加はみられなかった。

マウス感染モデル：肺炎球菌と歯周病原細菌の培養上清および rNucA, rNucD を混和し、Balb/c マウスに経鼻投与後、生存率と感染菌数を求めた。マウス感染実験に関しては、研究期間中に最終的なデータを得ることができなかつたため、継続して研究を行い、データが得られ次第学会発表および論文で公表する。

以上の結果より、歯周病原細菌には、細菌を捕捉して排除する NETs を nuclease で分解する能力を持つことから、生体の感染防御に抵抗性を示すことで細菌の感染部位への定着に重要な役割を持つことが推測された。歯周病原細菌のうち、*P. intermedia* が高い nuclease 活性を持ち、その nuclease 活性は rNucA, rNucD によるもので、NETs の分解に関与することが推測された。また、*P. intermedia* の同定した nuclease (rNucA, rNucD) の病原性への影響を解明するために、rNucA, rNucD の遺伝子欠損変異株の作製に着手したができなかったため、NucA, NucD それぞれの抗体を用いて病態への関与を調べることにし、それぞれのポリクローナル抗体を作製した。今後マウス感染モデルで解析予定である。

歯周病原細菌存在下で、A549 細胞の肺炎球菌レセプター PAFR の発現が上昇して肺炎球菌の付着の増加が認められ、アンタゴニストの前処置では付着の増加が認められなかったことから、歯周病原細菌は PAFR の発現を増強させて肺炎球菌の感染を促進することが示唆された。マウスモデルを用いた歯周病原細菌存在下での肺炎球菌感染実験については、データが得られ次第公表予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsui Shohei, Kataoka Hideo, Tanaka Jun-Ichi, Kikuchi Mariko, Fukamachi Haruka, Morisaki Hirobumi, Matsushima Hitomi, Mishima Kenji, Hironaka Shoji, Takaki Takashi, Okahashi Nobuo, Maruoka Yasubumi, Kuwata Hirotaka	4. 巻 88
2. 論文標題 Dysregulation of Intestinal Microbiota Elicited by Food Allergy Induces IgA-Mediated Oral Dysbiosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00741-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00741-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ota Chiaki, Morisaki Hirobumi, Nakata Masanobu, Arimoto Takafumi, Fukamachi Haruka, Kataoka Hideo, Masuda Yoshiko, Suzuki Noriyuki, Miyazaki Takashi, Okahashi Nobuo, Kuwata Hirotaka	4. 巻 86
2. 論文標題 Streptococcus sanguinis Noncoding cia-Dependent Small RNAs Negatively Regulate Expression of Type IV Pilus Retraction ATPase PilT and Biofilm Formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00894-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00894-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kadena Miki, Kumagai Yutaro, Vandenbon Alexis, Matsushima Hitomi, Fukamachi Haruka, Maruta Noboru, Kataoka Hideo, Arimoto Takafumi, Morisaki Hirobumi, Funatsu Takahiro, Kuwata Hirotaka	4. 巻 485
2. 論文標題 Microarray and gene co-expression analysis reveals that melatonin attenuates immune responses and modulates actin rearrangement in macrophages	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 414-420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.02.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsushima Hitomi, Kumagai Yutaro, Vandenbon Alexis, Kataoka Hideo, Kadena Miki, Fukamachi Haruka, Arimoto Takafumi, Morisaki Hirobumi, Fujiwara Nagatoshi, Okahashi Nobuo, Kuwata Hirotaka	4. 巻 485
2. 論文標題 Microarray analysis of macrophage response to infection with Streptococcus oralis reveals the immunosuppressive effect of hydrogen peroxide	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 461-467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.02.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三宅 理子, 佐藤 あや子, 清水 茉莉奈, 松井 庄平, 深町 はるか, 有本 隆文, 桑田 啓貴, 武藤 光範, 木庭 新治, 丸岡 靖史	4. 巻 70
2. 論文標題 アテローム性動脈硬化病変部の細菌叢と口腔細菌叢のメタゲノム解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 254-261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11277/stomatology.70.254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大田 千明, 森崎 弘史, 有本 隆文, 深町はるか, 片岡 嗣雄, 鈴木 規元, 増田 宜子, 宮崎隆, 桑田 啓貴
2. 発表標題 Streptococcus sanguinis のノンコーディング csRNA は IV 型線毛 pilT 遺伝子の発現を負に制御し, バイオフィルム形成を抑制する
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林真奈美, 逸見百江, 森美菜, 深町はるか, 桑田啓貴
2. 発表標題 HOMA(ヒト口腔細菌定着)モデルマウスを用いた口腔常在菌による肺炎増悪誘導の解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 常在細菌は口腔内の免疫細胞の分化に重要な役割を果たしている
2. 発表標題 森美菜, Natasa Trtic, 逸見百江, 中村夏野, 林真奈美, 深町はるか, 桑田啓貴
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------