

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24102

研究課題名（和文）口腔細菌が形成するPersisterのメカニズム解明とその除去法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of persister formed by oral bacteria and development of its removal method

研究代表者

山崎 亮太（YAMASAKI, Ryota）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70841998

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）：本研究は、「歯周病の発症や再発を“Persister”の視点から防ぐ」ことを目的としている。ストレス環境下で生存するためにとるPersisterという細菌の表現型は、口腔病原細菌においても例外ではなく、これらが歯周病の持続化や、再発の原因となっていると考える。本研究ではまず、薬剤の効果を高めるためにPersisterを通常の状態に目覚めさせるメカニズムを明らかにし、更に、Persisterを殺菌する技術を確立することで、歯科治療における新たな知見を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は誰もが起こり得る疾病である。歯周病患者には、治療が奏効せず再発を繰り返し、持続してしまう、いわゆる慢性歯周炎となる症例をしばしば経験する。その要因の1つとして、Persisterの存在に着目した。薬剤療法などに耐え得るPersisterは治療後も生存してしまい、これが再増殖することで病気を持続化させていると考える。本研究は歯周病の持続化や再発がPersisterによるものという仮説の元、歯周病原性細菌が形成するPersisterのメカニズムを解明し、その排除法を確立することで、新たな口腔内感染症の病態解明や治療・予防戦略の確立に繋がるものである。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to prevent the onset and recurrence of periodontal disease from the perspective of "persister". persister is a bacterial phenotype that is adopted to survive under stressful conditions, and oral pathogenic bacteria are no exception to this phenotype, which is thought to be the cause of the persistence and recurrence of periodontal disease. In this study, we first clarified the mechanism that awakens persister to its normal state in order to enhance the effect of drugs, and then established a technique to disinfect persister, thereby providing new knowledge in dental treatment.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯周病 齲蝕 Persister バイオフィルム 活性酸素種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、口腔内の細菌感染による歯周組織局所における炎症を主症状とする多因子性疾患であり、成人の約8割弱が罹患していると考えられている。また近年、歯周病が全身疾患の原因となっていることが明らかになり、臨床的大きな問題となっている。歯周病患者には、治療が奏功せず、また再発を繰り返し、完治が困難な症例をしばしば経験する。その原因として、口腔内細菌の多種多様な因子が研究されてきたが、本申請では、その一因として、生体の免疫応答や抗生物質に対して、抵抗性を示す細菌の“Persister化”に着目する。

Persisterとは微生物集団の一部が代謝的に休止状態をとり、抗生物質や飢餓状態に耐え得る表現型の細菌と定義されている[Hobby et al., 1942]。Persisterは突然変異等により薬剤耐性を獲得した細菌とは異なり、遺伝的变化はない。ゆえにPersisterを形成する細菌は常にランダムである。さらにバイオフィーム中では細菌はPersister状態に移行しやすい[Kwan et al., 2013]。口腔内細菌は、歯周ポケットや歯面でバイオフィームを形成し、これが歯周病や齲蝕を惹起する。そのため、デンタルプラーク中の口腔内細菌はPersister化し易いと考えられ、これらが歯周病の病原性に関与しているのではないかと考える。しかしながら、歯周病原性細菌や齲蝕原性細菌に対して、Persisterの観点に立った研究はほとんど行われていない。そこで、本申請研究では、「口腔内細菌のPersister化」に着目した新規の研究領域を開拓することで、歯周病を始めとする口腔内の感染症の病態解明や治療・予防戦略の確立に繋がる研究を展開していく。

2. 研究の目的

歯周病は慢性的に進行し、しばしば治療に抵抗性を示すが、その原因として、物理的・化学的障壁としてのバイオフィーム、そして個々の歯周病原性細菌が有する歯周組織局所での生体の免疫反応からの多種多様なエスケープ機構があり、それらを中心とした研究が展開されてきた。今回は、新たなエスケープ機構として、口腔内細菌のPersister化という観点に基づいた研究に着手していく。これまでのPersisterに関して、口腔内細菌を取り扱った先行研究はなく、本申請研究は極めて独創的で新規性が高い研究であると考えている。

また、本申請で明らかにしていくPersister化やそれを通常のアクティブな状態に移行させる“目覚め”のメカニズムを明らかにしていくことで、口腔内、特に歯面や歯周ポケットに形成されたバイオフィーム中のPersisterをターゲティングした、より効果的な歯周病の予防法や治療法の確立が期待される。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌 Persister の“目覚め”のメカニズム解明

これまでの研究で、Persister化のメカニズムは進められており徐々に解明しつつある。しかし、Persister状態の細菌がどのような遺伝メカニズムで通常状態、つまり“目覚め”するのかは明らかにされていない。これを明らかにするため、Persisterが特に重要とする炭素源を調べた。増殖に必要不可欠であるアミノ酸や糖を1つずつ添加した寒天培地上でPersisterの目覚めの速度や効率を調べた。その中で、重要な炭素源を決定し、次に遺伝子欠損株すべてをスクリーニングしてどの遺伝子がPersisterの“目覚め”に重要なのかを、顕微鏡を使ったリアルタイムでの増殖を観察することで明らかにした。

(2) 活性酸素種による Persister の殺菌

活性酸素種を高濃度・連続的に産生することが出来る、ラジカルペーパーリアクター(RVR)を用いて、Persisterに対する殺菌効果を検証した。大腸菌をリファンピシン(100 µg/mL、30分処理)で人工的にPersisterに誘導し、M9 minimal agar上に播いてRVR処理(5 s~120 s)し、その後LBを添加することで生存した菌数から殺菌効果を求めた。

4. 研究成果

(1) 大腸菌 Persister の“目覚め”のメカニズム解明

単一細胞の観察を用いて大腸菌のパーシスターは、自発的にはなく、主に特定の炭素源(アラニンまたはグルコース)を与えられたときに蘇生することを明らかにした。また、パーシスター細胞が目覚めるメカニズムは、化学走化性とリン酸転移酵素の膜タンパク質による栄養感知であることがわかった。これは走化性に関連する遺伝子(Trg、Tar、Tsr、Tap、AerやCheファミリーなど)の欠損株を用いると増殖の著しい遅延や増殖能の欠損が観察されたためである。逆にこれらの関連遺伝子を過剰発現させたもの(pCA24Nにそれぞれの遺伝子を組み込んだものを付与)を用いると、増殖すなわち“目覚め”は促進されることを明らかにした。

さらに、栄養分の輸送は、酵素IIAを介してセカンドメッセンジャーであるcAMPのレベルを低下させ、このcAMPレベルの低下がリボソームの蘇生と救出につながることで、そして蘇生した細菌は、すぐに栄養分に向かって走化性を開始するが、覚醒には鞭毛の動きは必要ないことを明らかにした。つまり、パーシスターは、膜の受容体を介して栄養素を感知し、セカンドメッセンジャーのcAMPを介してリボソームに信号を伝えることで覚醒し、覚醒したパーシスターは走化性

を利用して栄養素を獲得する（図2）。

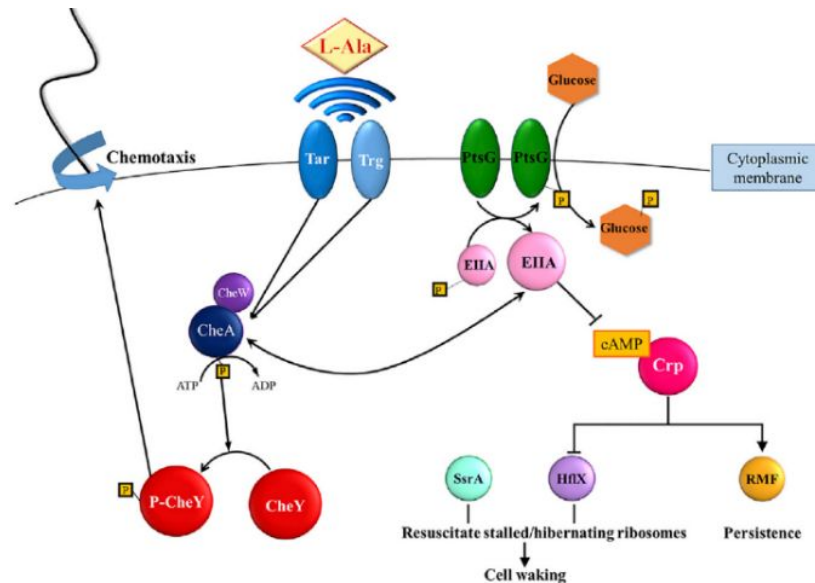


図2 . アラニンとグルコースを介した Persistor”目覚め”の遺伝子メカニズム。

(2) 活性酸素種による Persistor の殺菌

Persistor 化した細菌と通常のアクティブな状態の細菌に対して同等の条件で RVR 処理を 120 sec 行った結果、活性酸素種は、パーシスターに対して、通常のアクティブな状態の細菌よりも大きな殺菌効果を与えることがわかった（図3）。また、湿度を制御することで産生される活性酸素種の量がコントロールできることを電子スピン共鳴法で明らかにし、どの活性酸素種が Persistor に効果的かを解析した結果、ヒドロキシルラジカルが最も殺菌効果が高いことを明らかにした。UV の照射のみでも Persistor やバイオフィルムに対して高い殺菌効果があることが示されたが、UV が直接当たらない場合では著しくその効果は減少した。ここで RVR による UV と活性酸素種の同時暴露がそれらの殺菌効果を強力にすることも明らかにした。

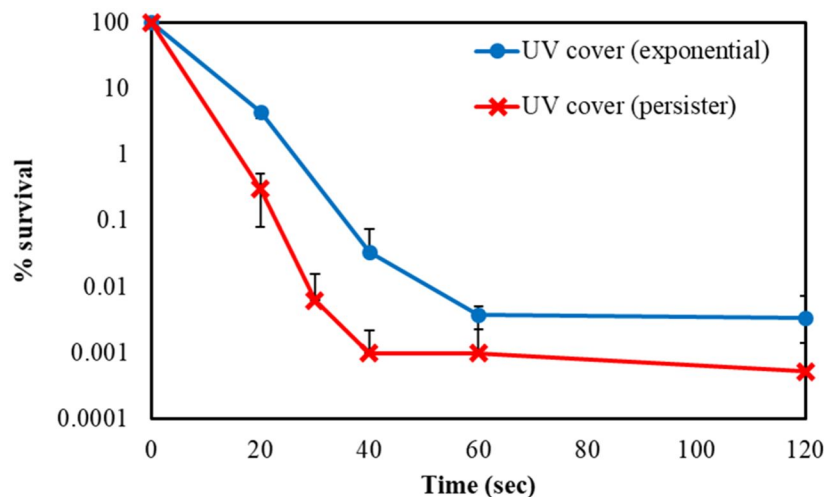


図3 . Persistor と通常状態の細菌に対する活性酸素種の殺菌効果

引用文献

1. Hobby, G. L., Meyer, K., and Chaffee, E. (1942). Observations on the mechanism of action of penicillin. *Exp. Biol. Med.* 50, 281-285.
2. Kwan, B. W., Valenta, J. A., Benedik, M. J., and Wood, T. K. (2013). Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1468-1473.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamasaki, R., Song, S., Benedik, M. J., Wood, T. K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Persister Cells Resuscitate Using Membrane Sensors that Activate Chemotaxis, Lower cAMP Levels, and Revive Ribosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.100792	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 該当する

1. 著者名 Yamasaki Ryota, Kawano Aki, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru	4. 巻 20
2. 論文標題 Rhamnolipids and surfactin inhibit the growth or formation of oral bacterial biofilm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12866-020-02034-9	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 Kawano Aki, Yamasaki Ryota, Sakakura Tatsuya, Takatsuji Yoshiyuki, Haruyama Tetsuya, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru	4. 巻 10
2. 論文標題 Reactive Oxygen Species Penetrate Persister Cell Membranes of Escherichia coli for Effective Cell Killing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.00496	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎亮太、川野亜希、吉岡香絵、有吉渉
2. 発表標題 菌液上清による口腔細菌が形成するバイオフィルムの抑制
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2020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
---------	---------