

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10265

研究課題名（和文）呼吸器ウイルス感染に及ぼす口腔細菌の影響とその予防法確立に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research on the influence of oral bacteria on respiratory virus infections

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：不良な口腔衛生状態や歯周病が、COVID-19やインフルエンザの発症・重症化のリスクになることが疫学研究により明らかにされている。しかしながらその分子メカニズムは明らかではないため、本研究において検討した。その結果、呼吸器ウイルスを活性化させる宿主因子であるTMPRSS2の発現を歯周病原菌 *Fusobacterium nucleatum* が亢進させ、インフルエンザウイルス感染を促進させることを明らかにした。また、*F. nucleatum* により呼吸器上皮バリアの機能を低下させることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、歯周病原菌が呼吸器ウイルス感染を促進させること、さらにそのメカニズムの一端を明らかにした。また、生体防御において重要となる呼吸器上皮バリア機能を歯周病原菌が低下させることを明らかにした。この上皮バリア機能の低下は呼吸器ウイルス感染の重症化に関わる可能性が考えられる。以上の結果から、健康な口腔環境を維持し、口腔細菌をコントロールすることが、呼吸器ウイルス感染症の発症や重症化の予防につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Poor oral hygiene and periodontal disease are risk factors for respiratory virus infections, such as COVID-19 and influenza. This study explored the effect of periodontopathic bacteria, particularly *Fusobacterium nucleatum*, on respiratory virus infection. Our findings revealed that *F. nucleatum* enhanced influenza virus replication by inducing TMPRSS2 expression. We also found that *F. nucleatum* can affect respiratory epithelial tight junction proteins and potentially cause an increase in paracellular permeability in the alveoli. These results provide a scientific basis to support the importance of maintaining good oral hygiene in effectively preventing the onset and/or progression of respiratory virus infections.

研究分野：微生物学

キーワード：口腔細菌 歯周病 呼吸器ウイルス

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請当時、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が猛威を振るっており、さらにはワクチンも開発段階であった。また、不良な口腔衛生状態や歯周病が COVID-19 発症・重症化リスクになるとの報告が次々とされていた。またインフルエンザにおいては、口腔衛生状態の不良により発症リスクが高くなることや、口腔ケアが発症リスクを低下させると報告されていた。そのため、口腔細菌がこれらの呼吸器ウイルス感染症の発症・重症化のリスクを高めることが考えられるが、その分子メカニズムは不明のままであった。

2. 研究の目的

口腔細菌が呼吸器ウイルスに悪影響を及ぼすと考えられるが、その分子メカニズムは不明のままである。そこで、本研究は、口腔細菌が呼吸器ウイルス感染に及ぼす分子メカニズムを解明し、呼吸器ウイルス感染症の発症・重症化の予防法として、口腔健康管理が重要であることを示すことを目的に実施した。

宿主において発現している II 型膜貫通型セリンプロテアーゼである TMPRSS2 は SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスのスパイクタンパクを開裂させ、これらの呼吸器ウイルス感染において重要な役割を果たしている。そこで口腔細菌が TMPRSS2 の発現を亢進させ呼吸器ウイルス感染を促進させるかについて検討した。

SARS-CoV-2 のスパイクタンパクは、宿主由来のプロテアーゼにより開裂することで宿主細胞内に侵入することができる。口腔細菌の中には、プロテアーゼを産生するものも多い。そこで口腔細菌由来のプロテアーゼにより SARS-CoV-2 のスパイクタンパクを開裂させることができるか明らかにし、口腔細菌が SARS-CoV-2 の感染成立に関わるのかを検討した。

呼吸器上皮のバリア機能が低下することにより、病原体を含めた環境因子が侵入しやすくなる。そこで本研究では、呼吸器上皮のバリアの破綻が呼吸器ウイルス感染症の重症化に関わる可能性があることから、口腔細菌が呼吸器上皮バリアに及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

呼吸器上皮細胞株として Calu-3 細胞、および 16HBE 細胞、またヒト気管支上皮プライマリー細胞を用いた。口腔細菌として、歯周病原菌である、*Fusobacterium nucleatum*、*Porphyromonas gingivalis* の死菌ならびに培養上清を用いた。インフルエンザウイルスは、A/Udorn/72 (H3N2) を使用した。

上皮バリア機能の測定は、トランズウェルを用いて、上部チャンバーに 16HBE 細胞またはヒト気管支上皮プライマリー細胞を播種し、上部チャンバーと下部チャンバーの電気抵抗値を測定し評価した。

各種遺伝子発現状態を real-time PCR により解析した。各種タンパク質発現状態をウエスタンブロットもしくは蛍光免疫染色により解析した。ウイルス力価はプラークアッセイにより評価した。

4. 研究成果

(1) 歯周病原菌が TMPRSS2 の発現に及ぼす影響

歯周病原菌 *F. nucleatum* 培養上清により Calu-3 細胞を刺激し、real-time PCR、ウエスタンブロット、および蛍光免疫染色で検討した結果、TMPRSS2 の遺伝子発現およびタンパク発現が誘導されていた (図 1)。また、*F. nucleatum* 培養上清により処理した Calu-3 細胞にインフルエ

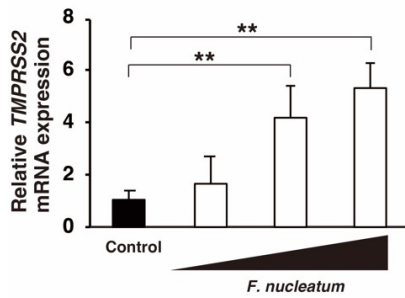


図1 *F. nucleatum* 刺激による TMPRSS2 の発現状態

ンザウイルス感染をさせ、培養上清中のウイルス量をブ
ラークアッセイにて調べた結果、未処理の細胞へ感染さ
せた場合に比べ、有意にウイルス量が増加していた。そ
こで、このウイルス複製促進が *F. nucleatum* が誘導し
た TMPRSS2 の発現亢進によるものかを調べるため、siRNA
を用いて TMPRSS2 をノックダウンした細胞を用いて検討し
た。その結果、TMPRSS2 をノックダウンした細胞では、
ウイルスの複製亢進は認められなかった。以上の結果から

ら、*F. nucleatum* により TMPRSS2 の発現が亢進されたことによりインフルエンザウイルスの複製が促進されることが示唆された。

(2) 歯周病原菌が SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質開裂に及ぼす影響

SARS-CoV-2 は特異的なプロテアーゼによりスパイクタンパクが S1 サブユニットと S2 サブユニットに開裂することにより、感染性を獲得する。そこで、歯周病原菌が産生するプロテアーゼが SARS-CoV-2 のスパイクタンパクを開裂させる能力があるかについて検討した。リコンビナント SARS-CoV-2 全長スパイクタンパク質を歯周病原菌 *P. gingivalis* 培養上清にて処理した結果、スパイクタンパク質の開裂を認めた。以上の結果から、歯周病原菌のプロテアーゼが SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質を開裂させ、感染性獲得に関与することが示唆された。

(3) 歯周病原菌が呼吸器上皮バリアの機能に及ぼす影響

呼吸器上皮バリア機構は、呼吸器ウイルスなどの環境因子の侵入を防ぐ重要な生体防御機構である。そのため、このバリア機能の破綻は、呼吸器ウイルス感染を重症化させる可能性がある。そこで本研究では、歯周病原菌により呼吸器上皮バリア機構が破綻するかについて検討を行った。16HBE 細胞およびプライマリー細胞を *F. nucleatum* 死菌で刺激し、経上皮電気抵抗値を測定した結果、TER は有意に低下した (図2)。上皮バリア機構において重要な役割を果たすタイトジャクソン関連遺伝子の発現を real-time PCR により検討した結果、*F. nucleatum* 刺激により発現が低下していた。

つぎに *in vivo* による検討をおこなった。マウスへ *F. nucleatum* を誤嚥させタイトジャクソン関連遺伝子の発現を調べたところ、発現が低下していた。さらに、*in vivo* における上皮バリア機能の破綻状態を調べるため、安楽死1時間前にデキストランを誤嚥させ、血清中のデキストラン濃度を測定した。その結果、*F. nucleatum* 誤嚥マウスではデキストランの濃度が有意に増加していた。以上の結果から、*F. nucleatum* を誤嚥することにより、呼吸器における上皮バリア機能が破綻することが示唆された。

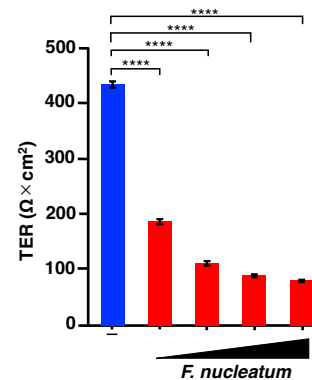


図2 16HBEを *F. nucleatum* で3日間処理した際のTER値

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 3件）

1. 著者名 Murakami Naoki, Yoshikawa Kenji, Tsukada Kohei, Kamio Noriaki, Hayashi Yoshinori, Hitomi Suzuro, Kimura Yuki, Shibuta Ikuko, Osada Ayaka, Sato Shuichi, Iwata Koichi, Shinoda Masamichi	4. 巻 64
2. 論文標題 Butyric acid modulates periodontal nociception in Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 91 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.21-0483	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 Takahashi Yuwa, Cueno Marni E., Kamio Noriaki, Iinuma Toshimitsu, Hasegawa Yoshiaki, Imai Kenichi	4. 巻 589
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Mfa1 fimbria putatively binds to TLR2 and induces both IL-6 and IL-8 production in human bronchial epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 35 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.003	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 Suzuki Ryuta, Kamio Noriaki, Kaneko Tadayoshi, Yonehara Yoshiyuki, Imai Kenichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum exacerbates chronic obstructive pulmonary disease in elastase induced emphysematous mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 638 ~ 648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13369	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 SUZUKI RYUTA, KAMIO NORIAKI, SUGIMOTO KOZUE, MARUOKA SHUICHIRO, GON YASUHIRO, KANEKO TADAYOSHI, YONEHARA YOSHIYUKI, IMAI KENICHI	4. 巻 36
2. 論文標題 Periodontopathic Bacterium Fusobacterium nucleatum Affects Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Alveolar Epithelial Cells and Mouse Lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 649 ~ 656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12749	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 Karahashi Yukihiro, Cueno Marni E., Kamio Noriaki, Takahashi Yuwa, Takeshita Ikuko, Soda Kaori, Maruoka Shuichiro, Gon Yasuhiro, Sato Shuichi, Imai Kenichi	4. 巻 682
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum putatively affects the alveoli by disrupting the alveolar epithelial cell tight junction, enlarging the alveolar space, and increasing paracellular permeability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 216 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.10.026	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 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 神尾 宜昌, 今井 健一
2. 発表標題 歯周病原菌Porphyromonas gingivalisが産生するジンジパインはインフルエンザウイルスのヘマグルチニンを開裂させ感染を促進させる
3. 学会等名 第53回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 神尾 宜昌, 今井 健一
2. 発表標題 口腔に見出されるウイルスの存在意義 - 細菌-ウイルス相互作用 -
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noriaki Kamio, Kenichi Imai
2. 発表標題 Oral bacterial neuraminidase enhances influenza virus infections.
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asia Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------