



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Fusobacterium nucleatum による炎症惹起メカニズムの解明   |
| Author(s)    | 森田, 真吉  |
| Citation     | 大阪大学, 2025, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/101556">https://hdl.handle.net/11094/101556</a>   |
| rights       |   |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 森田 真吉 )

論文題名

*Fusobacterium nucleatum* による炎症惹起メカニズムの解明

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

*Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) は健常者を含むほとんどのヒトに定着している常在菌である一方、宿主免疫細胞への感染時には炎症性サイトカインの産生を促す。近年では、本菌が大腸癌をはじめとする様々な全身疾患の病変組織より検出されたという報告が相次いでいる。しかしながら、*F. nucleatum* が惹起する炎症に関する詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、自然免疫の最前線で重要な役割を果たすマクロファージに対する *F. nucleatum* 感染時の炎症惹起メカニズムについて検討を加えた。特に、炎症に重要な IL-1 $\beta$  の産生機構インフラマソームに着目し、後半では、自然免疫細胞の活性化において重要な IFN- $\gamma$  とインフラマソーム活性化との相互関係を明らかにすることにも挑戦した。これらにより、*F. nucleatum* 感染による炎症応答の詳細な分子メカニズム解明を目的とした。

## 【材料・方法】

1. *F. nucleatum* が惹起する炎症応答に関する検討1-1. *F. nucleatum* 感染におけるマクロファージの遺伝子発現挙動解析

*F. nucleatum* 感染時の遺伝子発現を包括的に把握するため、RNA-seq 解析を行った。宿主細胞としてヒト単球系白血病細胞株 THP-1 を 100 nM PMA (Phorbol-12-myristate 13-acetate) で 2 日間処理し分化させたヒトマクロファージ様細胞を用いた。このマクロファージ様細胞に *F. nucleatum* (ATCC23726株) および比較として *Porphyromonas gingivalis* (ATCC33277株) を感染多重度 100 (MOI : 100) で感染させ、24 時間後に未処理サンプルとともにトータル RNA を抽出した。これらを RNA-seq 解析に供試し、遺伝子発現を網羅的に解析した。IL-1 $\beta$  の転写発現を他の菌種と比較検討すると、*F. nucleatum* 感染時に特に上昇し、IFN- $\gamma$  刺激により増強されることが明らかとなった。

## 1-2. 定量的逆転写PCR (RT-qPCR) による遺伝子発現変動量の検討

1-1. と同様の実験系で、炎症関連遺伝子について定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) によって遺伝子発現変動定量評価した。また、自然免疫細胞の活性化に重要な IFN- $\gamma$  の影響を検討するため、同様の条件で培養した細胞に感染 24 時間前に 20 ng/mL の IFN- $\gamma$  で刺激後、感染実験を行った。IL-1 $\beta$ については、6 菌種 8 株の細菌を使用し比較検討した。

1-3. ELISA 法によるIL-1 $\beta$ 産生の定量評価

1-2. と同様の実験系で、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : 酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) によって実際に細胞から放出されるサイトカイン量を定量評価した。

## 1-4. 細胞死に関する検討

膜傷害による細胞死を検出する SYTOX™ Orange Nucleic Acid Stain および細胞死に伴い放出される LDH を測定し、インフラマソーム活性化に伴い起こる細胞死について検討を加えた。

2. IFN- $\gamma$  誘導遺伝子群に関する検討

## 2-1. Guanylate - binding proteins (GBPs) の発現に関する検討

GBPsのなかで最も報告が多く、中心的な役割を持つとされる GBP1 について、RT-qPCR およびウェスタンブロットで検討した。また、GBPs が IL-1 $\beta$  の産生へ与える影響を評価するために、GBPs 欠損マクロファージを使用した ELISA を行った。GBPs 欠損マクロファージは、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の

承認を得て調整した（承認番号：動菌 R06-05-021-0、(遺) 05128）。さらに、GBPs の細胞内の挙動を蛍光免疫染色で検討した。

## 2-2. GBPs の二量体化（ダイマー化）に関する検討

2-1. の結果から、*F. nucleatum* 感染時に GBPs がダイマー化する可能性が示唆される。そこで、GBPs のダイマー化に焦点を当て、免疫沈降およびダイマー化を促進する薬剤（NSC756093）を作用させた状態での感染実験を行った。

## 2-3. ヒトGBPs欠損細胞を使用した検討

2-2. の結果をうけ、ダイマー化の報告がある GBPs (GBP1・GBP2・GBP5) を欠損した細胞株を作製し、感染実験を行った。

## 【結果】

### 1. *F. nucleatum* が惹起する炎症応答に関する検討

- 1-1. RNA-seq 解析の結果、*F. nucleatum* 感染時、*P. gingivalis* と比較して多くの炎症性サイトカインが発現上昇した。
- 1-2. IL-1 $\beta$  の転写発現を他の菌種と比較検討すると、*F. nucleatum* 感染時に特に上昇し、IFN- $\gamma$  刺激により増強されることが明らかとなった。
- 1-3. IL-1 $\beta$  の産生を ELISA で定量すると、1-2. の結果と同様に *F. nucleatum* 感染時に強力に誘導され、IFN- $\gamma$  により増強された。
- 1-4. *F. nucleatum* 感染時に顕著な蛍光標識細胞が増加し、死細胞の増加が確認できた。また、それは IFN- $\gamma$  刺激により増強され LDH についても同様の結果となった。

### 2. IFN- $\gamma$ 誘導遺伝子群に関する検討

- 2-1. RT-qPCR にて、*F. nucleatum* 感染時、特に強い GBP1 の発現を認めた。また、GBPsKO マクロファージにおいて、IL-1 $\beta$  の産生はほとんど認められなかった。GBPs の菌体周囲への集積は認めず、ウェスタンブロットで、GBPs の約 2 倍の分子量の特異的バンドが確認された。
- 2-2. 免疫沈降で、*F. nucleatum* 感染時に特異的なダイマー化バンドが検出された。また、THP-1 へ NSC756093 を作用させておくと、*F. nucleatum* 感染時の IL-1 $\beta$  の産生は有意に増加した。
- 2-3. ダイマー化に重要である GBP1・2・5 のうち、GBP1 欠損細胞でのみ、IL-1 $\beta$  の産生が有意に低下した。

## 【考察・結論】

*F. nucleatum* はマクロファージへの感染時、IL-1 $\beta$  産生を強く誘導し、またそれは IFN- $\gamma$  刺激によって増強されることが明らかとなった。また、GBPs 欠損細胞では IL-1 $\beta$  産生が認められないことから、本菌の炎症誘導能は GBPs 依存的であることが示唆された。過去に、他の病原体での報告があるような GBPs の菌体周囲への集積は *F. nucleatum* 感染では認められなかったことから、本菌における GBPs の役割は異なる可能性がある。ウェスタンブロットおよび免疫沈降ではダイマー化特異的バンドが認められ、*F. nucleatum* 感染においては GBPs のダイマー化がインフラマソーム活性化制御に重要であることが示唆された。

GBPs のダイマー化がインフラマソームの活性化に重要であることが近年報告されており、特に GBP1 はその能力が高い。本研究において、GBP1 のダイマー化を促進させることで IL-1 $\beta$  産生が増強され、GBP1 欠損細胞では IL-1 $\beta$  の産生がほとんど認められないことから、*F. nucleatum* 感染において GBP1 を起点としたダイマー化が重要である可能性が示唆された。*F. nucleatum* が検出される全身疾患の病変において GBPs の高発現が報告されており、本研究の成果は、これらの全身疾患における病原性の解明に向けた重要な手掛かりとなることが期待される。

本研究により、インターフェロン誘導遺伝子群の一つである GBPs が、*F. nucleatum* 感染時の IL-1 $\beta$  産生において必須であることが明らかになった。GBPs は、GBP1 のダイマー化を起点として IL-1 $\beta$  の産生を増強することで、歯周炎をはじめとする、本菌がかかわる炎症性疾患に重要であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 森 田 真 吉 )  |     |           |
|--|-----|-----------|
|  | (職) | 氏 名       |
| 論文審査担当者  | 主 査 | 教授 林 美加子  |
|  | 副 査 | 教授 川端 忠重  |
|  | 副 査 | 教授 久保庭 雅恵 |
|  | 副 査 | 講師 村上 旬平  |
| 論文審査の結果の要旨   |     |           |
| <p>本研究では、<i>Fusobacterium nucleatum</i> (<i>F. nucleatum</i>) の炎症惹起メカニズム解明を目的とし、本菌が感染した際の IL-1<math>\beta</math> の産生機構に焦点をあてた検討を行った。</p> <p>その結果、インターフェロン誘導遺伝子群の一つである GBPs が、<i>F. nucleatum</i> 感染時の IL-1<math>\beta</math> 産生において必須であり、特に、GBP1 のダイマー化が重要であることが示された。</p> <p>以上の研究成果は、歯周炎をはじめとする <i>F. nucleatum</i> がかかわる炎症性疾患のメカニズム解明において、重要な知見を提供するものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。</p> |     |           |