

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11363

研究課題名(和文) 口腔細菌と生体防御機構との攻防により生じる心内膜炎発症メカニズムの学際的研究

研究課題名(英文) Interdisciplinary research for elucidating mechanisms of infective endocarditis onset and development with focus on oral bacteria and host defense interactions

研究代表者

野村 良太 (Nomura, Ryota)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90437385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutans の120 kDaのコラーゲン結合タンパク(collagen-binding proteins; CBPs)と190 kDa のタンパク抗原であるPAの発現パターンの異なる菌株を用いて、歯髄細胞への付着能および血液成分との反応に着目することにより、S. mutansの感染性心内膜炎に対する病原性について分析を行った。その結果、CBP陽性の S. mutansが歯髄細胞への高い付着能を示すとともに、CBP+/PA-の発現パターンを示すS. mutansが血清と凝集反応を生じ、感染性心内膜炎の病原性に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To analyze the pathogenesis of IE induced by Streptococcus mutans strains with different patterns of expression of a 120-kDa collagen-binding protein (CBP) and 190-kDa protein antigen (PA), we focused on adhesion of the bacterium to human pulp cells and its interaction with liquid components in blood. CBP-positive S. mutans strains had a high level of adhesion to human pulp cells, while CBP+/PA- strains showed aggregation in the presence of serum, which may contribute to the pathogenicity of IE.

研究分野：歯学

キーワード：口腔細菌 感染性心内膜炎 コラーゲン結合タンパク(CBP) タンパク抗原(PA) ex vivo評価系  
ウシ心臓弁 ラット感染性心内膜炎モデル 血清

## 1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎は、歯科領域で最もよく知られている全身疾患の1つであり、う蝕治療や日々のブラッシングにおいて口腔内に出血が生じた際に、口腔細菌が血中に侵入することから生じるとされている。口腔内の出血により生じる菌血症は、健常者では多型核白血球などの免疫系の働きにより速やかに菌が排除されるため一過性であることが多い。一方で、先天性心疾患や人工弁置換術を行った患者では、内皮傷害が生じている心臓弁膜や心内膜において、血小板やフィブリンとともに細菌が付着し、疣腫(ゆうしゅ)と呼ばれる細菌塊を形成することにより、感染性心内膜炎を発症することがある。

う蝕の主要な病原細菌である

*Streptococcus mutans* は、感染性心内膜炎の原因細菌としても知られている。*S. mutans* は菌体表層に存在するグルコースとラムノースのポリマーで構成される多糖抗原の構造の違いにより血清学的にc型、e型、f型およびk型の4型に分類される。口腔における頻度は、c型が約75%、e型が約20%で、f型とk型はそれぞれ5%以下である。このような血清型分布は、日本だけでなくフィンランドやタイでもほぼ同様な傾向であることが明らかになっている。

これまでに、当教室で保有する抜歯後菌血症および感染性心内膜炎患者の血液から分離された*S. mutans* 4株の血清型の特定を行った。その結果、これらの1株ずつが血清型e型およびf型に、残りの2株がk型に分類され、口腔内に高頻度に存在する血清型cに分類される菌株は全く存在しなかった。また、心臓弁置換術の適応となった感染性心内膜炎患者から摘出した多数の心臓弁組織から細菌DNAを抽出し、*S. mutans* 陽性検体においてPCR法により血清型を特定すると、心臓弁組織における血清型分布は健常者の口腔におけるものと著しく異なり、k型株が高頻度に検出されることが分かった。

感染性心内膜炎の発症時に、細菌が病原性を発揮する詳細なメカニズムはあまり明らかになっていないが、病原因子の1つとして病変部組織を構成するコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの細胞外マトリックスに菌が結合する能力が注目されてきた。そこで、口腔においてマイナーな血清型の*S. mutans* が心臓弁検体から高頻度に検出される原因として、これらの菌株に特異的な細胞外マトリックス結合タンパクが存在し、損傷した心臓弁組織に対する菌の付着に参与しているという可能性が考えられた。

2004年になって、*S. mutans* の新規細胞壁アンカータンパクであり、黄色ブドウ球菌などが保有するコラーゲン結合アドヘジンのグループであるコラーゲン結合タンパ

ク(collagen-binding protein; CBP)が*S. mutans* においても同定された。CBPは、口腔において頻度の高いc型株やe型株にあまり認められず、f型株やk型株において高頻度に認められた。また、CBP陽性菌株では歯面への初期付着に關与する分子量約190 kDaのタンパク抗原であるPAを欠失する菌株が存在し、このような菌株は多型核白血球の貪食を受けにくくなり、血中に長期間存在できることも示されてきた。

これまでに、重度のう蝕に対して感染根管治療を行うことにより、根管内の細菌が血液中に侵入し菌血症を生じることが分かっている。そこで本研究では、CBPに着目して*S. mutans* の歯髄細胞における病原性について検討を行うという考えに至った。また、血液成分存在下において、病原細菌により生じる凝集塊が循環器疾患の悪化に關与することが示されているため、*S. mutans* 株の血清存在下での凝集能に着目して分析することを企画立案するに至った。

## 2. 研究の目的

- (1) *S. mutans* を歯髄由来線維芽細胞に感染させた際の*S. mutans* の付着能の評価を行う。
- (2) *S. mutans* を歯髄由来線維芽細胞に感染させた際の歯髄由来線維芽細胞の増殖能の評価を行う。
- (3) 歯髄処置の際に採取した歯髄組織中の*S. mutans* の分離率および分離された*S. mutans* のCBP陽性率を求める。
- (4) *S. mutans* の血清存在下での凝集能について分析を行う。
- (5) *S. mutans* による感染性心内膜炎に対する病原性を簡易的にスクリーニングできるようなex vivo 評価系の構築を試みる。

## 3. 研究の方法

- (1) 供試菌  
CBP陰性の供試菌としてMT8148株、CBP陽性の供試菌としてTW295株を用いた。また、TW295株のCBPをコードする遺伝子を遺伝子操作により欠失させたTW295CND株も使用した。また、*S. mutans* を菌体表層タンパクの発現パターンにより、CBP-/PA+、CBP+/PA+、CBP+/PA-の3パターンに分類し、それぞれの発現パターンを有する*S. mutans* 臨床分離株15株ずつ(合計45株)を分析に使用した。

- (2) *S. mutans* の歯髄由来線維芽細胞への付着能の検討

歯髄由来線維芽細胞は、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会承認後、大阪大学歯学部附属病院にて矯正治療上の理由で便宜抜髄となった下顎左側乳犬歯より、保護者の同意を得て採取した。

歯髄由来線維芽細胞を培養後  $1.0 \times 10^5$

に調整したものに、 $1.0 \times 10^7$  CFU に調整した MT8148 株、TW295 株および TW295CND 株をそれぞれ感染させた。1.5 時間培養後メディアムを取り除き、感染した細胞を PBS にて洗浄し滅菌蒸留水を加え細胞を破碎させた。続いて、段階希釈した細胞溶解液を血液寒天培地に播種し、37 で 48 時間静置培養し、歯髓由来線維芽細胞へ付着した *S. mutans* 菌数を算出した。

### (3) *S. mutans* の感染による歯髓由来線維芽細胞の増殖能の検討

歯髓由来線維芽細胞数を  $1.0 \times 10^5$  に調整し、 $1.0 \times 10^7$  CFU に調整した CBP 陽性 *S. mutans* および CBP 陰性 *S. mutans* をそれぞれ感染させ 37 で 6 時間反応させた。反応後、MTT 液を添加し生細胞を染色した後、吸光度を分光光度計で測定し生細胞の定量化を行った。

### (4) 感染歯髓組織中からの *S. mutans* の分離および CBP をコードする遺伝子の検出

大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認のもと、保護者の同意を得た上で、64 人の小児患者から感染歯髓サンプルを採取した。感染歯髓サンプルは、感染根管治療の際に感染歯髓を綿栓で採取し滅菌生理食塩水に加え、段階希釈したものを Mitis-Salivarius-Bacitracin (MSB) 寒天培地上に播種し、37 で 48 時間培養することにより採取した。培養後、得られたコロニーを Brain Heart Infusion (BHI) 培地にピックアップし、37 で 24 時間培養後 *S. mutans* の染色体 DNA の抽出を行った。感染歯髓より得られた菌が *S. mutans* であることを確認するために *S. mutans* 特異プライマーを用いた PCR を行うとともに、CBP をコードする遺伝子を検出するプライマーを用いて PCR を行った。

### (5) *S. mutans* の血清存在下での凝集能

CBP-/PA+, CBP+/PA+ および CBP+/PA- の発現パターンを有する *S. mutans* 臨床分離株 15 株ずつを分析に使用した。これらの *S. mutans* 株を、PBS で  $OD_{600}=0.6$  となるよう調整し、菌量の 1/10 量のウシ血清を添加し、37 で 6 時間反応させた。凝集率は、(6 時間反応後の血清非添加時の  $OD_{600}$  値) - (6 時間反応後の血清添加時の  $OD_{600}$  値) / (反応前の血清添加時の  $OD_{600}$  値)  $\times 100$  (%) により算出した。

### (6) ex vivo 評価系の構築

ウシの心臓弁組織を 5mm 四方に細断し、ペニシリンおよびゲンタマイシンを含む EBM-2 液体培地を加え無菌化したものを分析に使用した。CBP-/PA+, CBP+/PA+, CBP+/PA- の発現パターンを有する *S. mutans* 臨床分離株 15 株ずつに関して、ウシの血清を 1/10 量含有する PBS で  $1.0 \times 10^9$

CFU/ml となるよう調整した。24 穴プレートに静置したウシの心臓弁組織に、調整した菌液を添加し 37 で 3 時間反応させた。ウシの心臓弁組織に付着した *S. mutans* は、超音波処理を行うことにより剥離し、菌液を MSB 寒天培地に播種した。この菌液を 37 で 48 時間培養後、MSB 寒天培地上のコロニー数をカウントすることによりウシの心臓弁組織に付着した *S. mutans* 数を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) *S. mutans* の歯髓由来線維芽細胞への付着能

TW295 株の歯髓由来線維芽細胞への付着率は約 30% であり、MT8148 株の付着率 (約 1%) と比較して有意に高い値を示した。一方、TW295CND 株の付着率は、MT8148 株の付着率と同程度であった。

### (2) *S. mutans* の感染による歯髓由来線維芽細胞の増殖能

MT8148 株感染群における歯髓由来線維芽細胞の増殖率は、非感染群と同程度であった。一方、TW295 株感染群では、非感染群の 2 倍以上の増殖率を示したのに対し、TW295CND 株では非感染群と同程度の増殖率を示した。

### (3) 感染歯髓組織中の *S. mutans* および CBP の分布

歯髓処置の適応となった 64 人の小児患者のうち、30 名 (46.9%) の感染歯髓サンプルから *S. mutans* が分離された。これらのうち、20% の *S. mutans* において CBP をコードする遺伝子が陽性であった。

### (4) *S. mutans* の血清存在下での凝集能

CBP-/PA+ 群の血清存在下での凝集率の平均値は 2.8% であり、CBP+/PA+ 群では 9.6% であった。一方で、CBP+/PA- 群は 65.9% であり、CBP-/PA+ 群および CBP+/PA+ 群と比較して有意に高い凝集率を示した。

### (5) ex vivo 評価系を用いた *S. mutans* の病原性

CBP-/PA+ 群のウシ心臓弁には  $8.8 \times 10^6$  CFU の菌の付着を認め、CBP+/PA+ 群では  $5.6 \times 10^7$  CFU の付着を認め、CBP-/PA+ 群と比較して有意に高い値を示した。CBP+/PA- 群では  $1.4 \times 10^8$  CFU の菌の付着を認め、CBP-/PA+ 群および CBP+/PA+ 群と比較して有意に高い付着率を示した。

## 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 2 件)

Nomura R, Ogaya Y, Nakano K.  
Contribution of the collagen-binding

proteins of Streptococcus mutans to bacterial colonization of inflamed dental pulp. PLoS One 査読有 11: e0159613.2016, DOI: 10.1371/journal.pone.0159613.

Otsugu M, Nomura R, Matayoshi S, Teramoto N, Nakano K. Contribution of Streptococcus mutans strains with collagen-binding proteins in the presence of serum to the pathogenesis of infective endocarditis. Infect Immun 査読有 e00401-17. 2017, DOI: 10.1128/IAI.00401-17.

[学会発表](計 14 件)

Nomura R, Nakano K. Infective endocarditis caused by Streptococcus mutans, Streptococcus mutans and systemic diseases 2015 -Cutting-edge knowledge and future perspectives-, April 17, 2015, Osaka.

大継将寿、野村良太、仲野和彦. Streptococcus mutans による感染性心内膜炎における E-セレクチンの役割 第 53 回日本小児歯科学会大会 2015 年 5 月 21 日 広島

鋸屋侑布子、野村良太、仲野和彦. Streptococcus mutans のコラーゲン結合タンパクによる歯髄炎への病原性の検討 第 53 回日本小児歯科学会大会 2015 年 5 月 21 日 広島

Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Serum component promotes Streptococcus mutans aggregation and internalization by vein endothelial cells, The 62nd Congress of the European Organization for Caries Research, July 1, 2015, Brussels, Belgium.

Otsugu M, Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Host immune responses mediate infective endocarditis caused by Streptococcus mutans, The 62nd Congress of the European Organization for Caries Research, July 1, 2015, Brussels, Belgium.

鋸屋侑布子、野村良太、仲野和彦. 感染歯髄組織における Streptococcus mutans の存在に関する検討 第 34 回日本小児歯科学会近畿地方会大会 2015 年 10 月 25 日 大阪

Otsugu M, Nomura R, Nakano K. Endothelial Gene Alteration Caused

by Streptococcus mutans with Collagen-binding Protein, The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, October 30, 2015, Fukuoka, Japan.

Ogaya Y, Nomura R, Nakano K. Isolation and characterization of Streptococcus mutans strains with collagen-binding protein from root canal specimens, The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, October 30, 2015, Fukuoka, Japan.

Otsugu M, Nomura R, Nakano K. Contribution of collagen-binding proteins of Streptococcus mutans to pathogenicity of vascular endothelium in rat infective endocarditis model. The 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, May 26, 2016, Tokyo, Japan.

Otsugu M, Nomura R, Nakano K. Upregulation of the host molecule is required for Streptococcus mutans internalization of endothelial cell. 94th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, June 22, 2016, Seoul, Korea.

Nomura R, Otsugu M, Nakano K. Type IV collagen promotes Streptococcus mutans internalization of vein endothelial Cells. The 63rd Congress of the European Organization for Caries Research, July 6, 2016, Athens, Greece.

Otsugu M, Nomura R, Nakano K. Serum component promotes Streptococcus mutans agglutination associated with pathogenesis in infective endocarditis. The 63rd Congress of the European Organization for Caries Research, July 6, 2016, Athens, Greece

Nomura R, Otsugu M, Ooshima T, Nakano K. Aggregation by Streptococcus mutans strains in presence of blood components contributes to pathogenesis of infective endocarditis, The 64th Congress of the European Organization for Caries Research, July 5-8, 2017, Oslo, Norway.

Otsugu M, Nomura R, Nakano K.  
Interaction of collagen-binding  
protein-positive Streptococcus  
mutans strains with liquid  
components of blood contributes to  
pathogenesis of infective  
endocarditis. 65th Annual Meeting of  
the Japanese Division of the  
International Association for Dental  
Research, November 18, 2017, Tokyo.

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pedo/research/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野村 良太 (NOMURA, Ryota)  
大阪大学・歯学研究科・准教授  
研究者番号：90437385

### (2) 研究分担者

仲 周平 (NAKA, Shuhei)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号：10589774