

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15754

研究課題名(和文) ミュータンスレンサ球菌の小児腎臓病への関与の可能性の追究

研究課題名(英文) Possible involvement of mutans streptococci in development of pediatric kidney disease

研究代表者

仲野 和彦 (Kazuhiko, Nakano)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：00379083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： これまでに、IgA腎症患者の口腔内には、菌体表層にコラーゲン結合タンパク(Cnmタンパク)を発現する *Streptococcus mutans* 株が高頻度で存在することを明らかにした。本研究では、IgA腎症患者の臨床所見を検討した結果、Cnm陽性 *S. mutans* 株保有者では、う蝕経験歯数およびタンパク尿の検出率が有意に高いことが明らかとなった。また、う蝕モデルラットに対して IgA腎症患者より分離した Cnm陽性 *S. mutans* 株を口腔内に定着させて重度のう蝕を誘発後に摘出した腎臓の解析から、Cnm陽性 *S. mutans* 株の IgA腎症との関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We recently reported frequent identification of *Streptococcus mutans* strains with a collagen-binding protein (Cnm protein) on their cell surface in examinations of specimens obtained from the oral cavity of IgA nephritis (IgAN) patients. In the present study, analyses of detailed clinical findings of patients with IgAN revealed significantly increased dental caries scores and rates of proteinuria detection. In addition, histopathological analyses of kidneys extirpated from rats following inoculation with Cnm-positive *S. mutans* strains into the oral cavity, which induced severe dental caries, demonstrated IgAN-like findings. Taken together, our results indicate that Cnm-positive *S. mutans* strains are possibly associated with the pathogenesis of IgAN.

研究分野：小児歯科学

キーワード： *Streptococcus mutans* IgA腎症 コラーゲン結合タンパク う蝕 ラット

### 1. 研究開始当初の背景

小児期に発症する腎疾患として糸球体毛細血管内皮の障害である急性糸球体腎炎が最もよく知られている。急性糸球体腎炎は、主に A 群 溶血性レンサ球菌感染後に起こることが多く一過性で寛解するとされている。一方、慢性糸球体腎炎としてはメサンギウム細胞の障害である IgA 腎症が代表的な疾患であるが、その発症メカニズムは不明である。また、ネフローゼ症候群は、大量のタンパク尿を来す疾患であり、いくつかのグループは糸球体の上皮細胞の異常によるものとされているが、その発症メカニズムも不明である。その他にも、MPO-ANCA 関連腎炎は急速進行性糸球体腎炎を来す膠原病の一種であるが、その発症メカニズムも不明である。

これまでに、血液中に侵入したコラーゲン結合能を有するミュータンスレンサ球菌 (溶血性) が脳出血の悪化や炎症性腸炎の悪化を引き起こすとともに、非アルコール性脂肪肝炎の悪化にも関与することを示した。これらの研究では、ある程度以上の量の菌が何らかの原因で血液中に侵入した際に、脳、腸、肝臓といった遠隔臓器で生じ得る病原メカニズムを明らかにした。

最近になって、感染性心内膜炎モデルにおける動物実験において、コラーゲン結合能を有するミュータンスレンサ球菌を感染させて群では、腎臓に明確な異常所見を認めることが分かった。また、ある種の腎疾患を呈する患者では口腔内にコラーゲン結合能を有するミュータンスレンサ球菌を高頻度で保有していることも見いだした。これらのことから、コラーゲン結合能を有するミュータンスレンサ球菌と腎臓疾患との関連性について検討する価値があるという考えに至った。

### 2. 研究の目的

これまで、ある種の腎疾患を呈する患者の口腔には、コラーゲン結合能を有するミュータンスレンサ球菌が高頻度で存在していることを見いだした。しかし、腎疾患を有する患者の口腔内の齧蝕の状態や、タンパク尿との関連に関する報告はない。

本研究では、慢性糸球体腎炎のうち最も頻度が高いといわれている IgA 腎症患者におけるコラーゲン結合能を有するミュータンスレンサ球菌の存在と、患者口腔内の齧蝕の状態及びタンパク尿との関連を分析することである。さらに、動物モデルを用いて様々な角度から検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) IgA 腎症患者の保有するコラーゲン結合能を有するミュータンスレンサ球菌の解析

聖隷浜松病院腎臓内科で、生検により IgA 腎症と診断を受けた 109 名と腎疾患を有さない健常者 69 名を対象とした。本研究は同病院の倫理審査委員会および大阪大学大学院歯学研究科倫理審査委員会の承認を受け、患

者の同意を得て行った。

Mitis-salivarius-bacitracin(MSB) 寒天培地に各対象より採取した唾液サンプルを播種し、2 日間 37℃ で培養した。培地上のラフな形態のコロニーを選択し、Brain Heart Infusion(BHI)液体培地で培養後、染色体 DNA を抽出し、ミュータンスレンサ球菌に特異的なプライマーを用いた polymerase chain reaction(PCR)法を行った。抽出した染色体 DNA を用いて、コラーゲン結合遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 法によってコラーゲン結合遺伝子陽性株を特定した。また、歯科受診の同意が得られた各対象者 49 名の齧蝕経験歯数(DMFT 値)を評価し、タンパク尿との関連の検討を行った。

(2) ラット齧蝕モデルにおける検討

ミュータンスレンサ球菌の標準株として用いられている日本人小児口腔由来のコラーゲン結合能を有さない MT8148 株と IgA 腎症患者の唾液中から分離したコラーゲン結合能を有する JD74 株を使用した。なお、ラット齧蝕モデルを用いた動物実験には、これら菌株をストレプトマイシン耐性とし標識付けしたものを使用した (それぞれ MT8148R 株および JD74R 株と命名した)。

SPF の Sprague-Dawley 系ラット (15 日齢オス) に 2 日間抗生物質を投与し、口腔常在細菌を抑制した。非感染群は、普通飼育用粉末飼料を摂取させる群とスクロース 56% 含む齧蝕誘発性飼料 2000 を摂取させる群に分けた。感染群は、生後 17 日目より 5 日間供試菌を摂取させ、口腔内に菌の定着を行うと同時に齧蝕誘発性飼料 2000 を与えて飼育した。感染開始後 8、12、16、24 週に各群の体重の測定を行った後、ラットの屠殺を行い、腎臓の摘出を行い重量の測定を行った。病理組織学的評価として Periodic acid-Schiff(PAS)染色および IgA 抗体を用いた免疫染色を行った。また、ラットの顎骨の摘出を行い、全ての群におけるブラークスコアおよび齧蝕スコアの算出を行った。

(3) IgA 腎症自然発症モデルマウスにおける検討

IgA 腎症モデルマウスとして、IgA 腎症の自然発症モデルである HIGA マウスを用いた。HIGA マウスは若週より血中 IgA 値が高く、およそ 25 週齢頃に IgA 腎症の病態発現が明確になってくる。そこで、病状が明確に現れる少し前の時期である 20 週齢の HIGA マウスの頸静脈より IgA 腎症患者より分離したコラーゲン結合能を有するミュータンスレンサ球菌 JD74 株および標準株であるコラーゲン結合能を有さない MT8148 株を投与し、2 週間後に屠殺を行った。屠殺時に採取した尿を用いてタンパク尿の検出を行った。

### 4. 研究成果

(1) IgA 腎症患者の保有するコラーゲン結合能を有するミュータンスレンサ球菌の解析

IgA 腎症患者群の保有するコラーゲン結合

能を有するミュータンスレンサ球菌の保有率(34.4%)は、健常者群(14.2%)と比較して有意に高い値を示した( $P=0.0486$ )。IgA 腎症患者群のうち、コラーゲン結合遺伝子を保有するミュータンスレンサ球菌を保有する患者群のDMFT値( $13.1 \pm 6.9$ (平均値 $\pm$ 標準偏差))は、コラーゲン結合遺伝子を保有しない患者群( $9.6 \pm 5.9$ )と比較して有意に高い値を示した( $P=0.0074$ )。また、IgA 腎症群の *cnm* 陽性群では陰性群と比較して有意に高い DMFT index( $16.3 \pm 4.8$  vs  $11.9 \pm 7.2$ ;  $P=0.04$ )を示すとともにとタンパク尿の所見が有意に高率であった。

#### (2)ラット齧蝕モデルにおける検討

菌感染 24 週後における各群のラットの体重および屠殺時に採取した腎臓の重量を測定したところ、いずれの群においても有意な差は認められなかった。病理組織学的分析として、PAS 染色の結果から、JD74R 株感染群では他の群と比較して、メサングウム領域の基質の有意な増殖が観察された。また、JD74R 株感染群は、他の群と比較して、パラメサングウム細胞領域に IgA の沈着が有意に多く認められる結果となった。

また、屠殺時に摘出した顎骨より、プラークスコアおよび齧蝕の評価を行なったところ、感染群のプラークスコアは、非感染群と比較して有意に高い値を示した。齧蝕スコアは、MT8148R 株感染群が、JD74R 株感染群および非感染群と比較して有意に高い値を示す結果となった。

#### (3) IgA 腎症自然発症マウスモデルにおける検討

IgA 腎症患者唾液より分離したコラーゲン結合能を有する JD74 株を頸静脈より投与した HIGA マウス群では、コラーゲン結合能を有さない MT8148 株を投与した HIGA マウス群と比較して、タンパク尿を高率に検出する傾向を示した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Alves LA, Nomura R, Mariano FS, Harth-Chu EN, Stipp RN, Nakano K, Mattos-Graner RO. CovR regulates *Streptococcus mutans* susceptibility to complement immunity and survival in blood. *Infect Immun* 84, 3206-3219, 2016.
2. Watanabe I, Kuriyama N, Miyatani F, Nomura R, Naka S, Nakano K, Ihara M, Iwaki K, Matsui D, Ozaki E, Koyama T, Nishigaki M, Yamamoto T, Tamura A, Mizuno T, Akazawa K, Takada A, Takeda A, Yamada K, Nakagawa M, Tanaka T, Kanamura N, Friedland RP, Watanabe Y. Oral Cnm-positive *Streptococcus mutans* expressing collagen binding activity is a risk factor for cerebral microbleeds and cognitive impairment.

Sci Rep 6,38561,2016.

3. Naka S, Hatakeyama R, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M, Nomura R, Nakano K. Contributions of *Streptococcus mutans* Cnm and PA antigens to aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep* 6,36886,2016.
4. Misaki T, Naka S, Hatakeyama R, Fukunaga A, Nomura R, Isozaki T, Nakano K. Presence of *Streptococcus mutans* harboring the *cnm* gene correlates with dental caries status IgA nephropathy conditions. *Sci Rep* 6.36455,2016.
5. Nomura R, Ogaya Y, Nakano K. Contribution of the collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* to bacterial colonization in inflamed dental pulp. *PLoS One* 11, e0159613, 2016.
6. Tonomura S, Ihara M, Kawano T, Tanaka T, Okuno Y, Friedland RP, Kuriyam N, Nomura R, Watanabe Y, Nakano K, Toyoda K, Nagatsuka K. Intracerebral hemorrhage and deep microbleeds associated with cnm-positive *Streptococcus mutans*; a hospital cohort study. *Sci Rep* 6, 20074, 2016.
7. Lapidattanakul J, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Srisatjaluk R, Ooshima T, Nakano K. Variation of expression defects in cell surface 190-kDa Protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Int J Med Microbiol* 305, 383-391, 2015.
8. Misaki T, Naka S, Kuroda K, Nomura R, Shiooka T, Naito Y, Suzuki Y, Yasuda H, Isozaki T, Nakano K. Distribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins in the oral cavity of IgA nephropathy patients. *Clin Exp Nephrol* 19.844-850,2015.

[学会発表](計 9 件)

1. Nakano K. *Streptococcus mutans* and IgA nephropathy. 95th Conference of International Association of Dental Research. San Francisco, USA, 2017.3.22-25.
2. Misaki T, Naka S, Hatakeyama R, Fukunaga A, Isozaki T, Nakano K. Comparison of urinary protein levels in IgA nephropathy patients with or without *Streptococcus mutans* strains with *cnm* gene encoding collagen-binding protein in the oral cavity. ASN Kidney Week, Chicago, USA, 2016.11.15-20.
3. Naka S, Misaki T, Takashima Y, Hatakeyama R, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K.

Contribution of Cnm-positive *Streptococcus mutans* strains to IgA nephropathy. 63rd Congress of European Organization of Caries Research, Athens, Greek, 2016.7.7-9.

4. Hatakeyama R, Naka S, Misaki T, Takashima Y, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K. Cnm-positive *Streptococcus mutans* strains causes IgA nephropathy in rats. 94th Conference of International Association of Dental Research, Seoul, Korea, 2016.6.22-25.
5. 三崎太郎、仲 周平、野村良太、仲野和彦、江間智映実、伊藤誓悟、塩岡天平、鈴木由美子、磯崎泰介 ラットう蝕モデルにおけるコラーゲン結合蛋白陽性 *Streptococcus mutans* 株による IgA 腎症様病変の誘発 第 59 回日本腎臓学会総会, パシフィコ横浜, 2016.6.17-19.
6. Misaki T, Naka S, Nomura R, Isozaki T, Nakano K. *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding protein may cause IgA-like glomerulonephritis in rats. ASN Kidney Week, San Diego, USA, 2015.11.5-8.
7. Naka S, Misaki T, Takashima Y, Hatakeyama R, Morita Y, Okawa R, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K. IgA glomerulonephritis-like finding induced by *Streptococcus mutans* in caries-model rats. The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Fukuoka, Japan, 2015.10.30-31.
8. Nakano K. *Streptococcus mutans* and systemic diseases: Current knowledge and future perspective. 4th Asia Pacific Congress & Expo on Dental and Oral Health. Brisbane, Australia, 2015.7.27-29.
9. 黒田景子、仲 周平、野村良太、仲野和彦 . IgA 腎症患者の口腔に存在する Cnm 陽性 *Streptococcus mutans* 株の検討 . 第 53 回日本小児歯科学会大会 , 広島 , 2015.5.21-22 .

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲野 和彦 (NAKANO, Kazuhiko)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号 : 00379083

### (2) 研究分担者

大川 玲奈 (OKAWA, Rena)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号 : 80437384

仲 周平 (NAKA, Shuhei)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号 : 10589774