

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12015

研究課題名（和文）口腔バイオフィルムによる動脈硬化誘発機序の解明—菌種の多様性が導く病原性—

研究課題名（英文）Analysis of induction mechanism of atherosclerosis by oral biofilm bacteria—virulence caused by the mixture of diverse bacterial species

研究代表者

長田 恵美（Nagata, Emi）

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：00304816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：口腔細菌による動脈硬化誘発における菌種の多様性が導くヒト口腔バイオフィルムの病原性を明らかにするために、ヒト口腔バイオフィルムでヒト動脈内皮細胞を刺激した時の、内皮細胞におけるサイトカイン、パターン認識受容体および細胞接着因子の産生を検討した。ヒト唾液より採取した口腔バイオフィルムはヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン、パターン認識受容体および細胞接着因子の産生を誘導したが、用いた条件では単独の口腔細菌は誘導しなかった。以上より、口腔バイオフィルムは、菌種の多様性が導く病原性によって内皮細胞における炎症誘発能を増大させていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞などの日本人の死亡原因の多くを占める疾病の原因となる血管の変化であり、ヒト動脈硬化病巣や血栓からは、口腔バイオフィルム細菌が検出されている。ヒト心臓脈管系疾患誘発における多菌種集合体をもつ病原性の解明は、口腔バイオフィルムの持つ潜在的病原性をさらに明確にし、また動脈硬化予防のために口腔衛生が重要であることを国民にアピールするための実験的検証となることから、本研究の学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to examine the production of cytokines, pattern-recognition receptors, and cell adhesion molecules in human aortic endothelial cells (HAECs) invaded by the mixture of oral biofilm bacteria. We have tried to clarify the virulence of the mixture of oral biofilm bacteria in terms of bacterial species diversity in the pathogenesis of atherosclerosis caused by oral bacteria. The production of cytokines, pattern-recognition receptors, and cell adhesion molecules in HAECs invaded by the mixture of oral biofilm bacteria collected from human saliva increased markedly compared with those in non-invaded HAECs. On the other hand, HAECs invaded by a single bacterial species did not show any inflammatory reaction in this experimental condition. Greater inflammation in HAECs by the mixture of oral bacteria may be due to the virulence induced by the bacterial species diversity.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔バイオフィルム 口腔細菌 動脈硬化 内皮細胞 サイトカイン パターン認識受容体 細胞接着因子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞などの日本人の死亡原因の多くを占める疾病の原因となる血管の変化であり、ヒト動脈硬化病巣 (Lehtiniemi *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.*, 2005; Nakano *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 2006) や血栓 (Pessi *et al.*, *Circulation*, 2013) から口腔バイオフィーム細菌が検出されている。我々は、今までに動脈硬化の新たなリスクファクター候補として、ヒト口腔バイオフィーム細菌の中で量的に多くを占める口腔レンサ球菌に着目し、口腔レンサ球菌が動脈硬化のリスクファクターとなりうるかを実験的に検証した。その結果、調べた口腔レンサ球菌 10 菌種は全てヒト動脈内皮細胞に侵入し、その内 4 菌種は侵入した内皮細胞からサイトカインの産生を誘導した。ヒト動脈内皮細胞に口腔レンサ球菌が侵入しサイトカイン産生を誘導するという報告は、世界で初めてである (Nagata *et al.*, *Mol. Oral Microbiol.*, 2011)。次に我々は *Streptococcus oralis* の coaggregation receptor polysaccharides はヒト動脈内皮細胞に炎症反応を誘導することを報告した (Toledo *et al.*, *Mol. Oral Microbiol.*, 2012)。さらに *Streptococcus mutans* がヒト動脈内皮細胞に付着および侵入すると、内皮細胞のパターン認識受容体である TLR2 および NOD2 の発現が上昇しサイトカイン産生が誘導されること、及び菌刺激による細胞質内のパターン認識受容体の増加から、菌の細胞内侵入がサイトカインの産生誘導に重要であることを明らかにした (Nagata *et al.*, *Mol. Oral Microbiol.*, 2017)。

ヒト口腔バイオフィームは約 700 種の多様な菌種から構成されている。我々は、ヒト口腔バイオフィームの動脈硬化における炎症反応誘発能を理解するためには、ヒト口腔バイオフィームの「菌種の多様性」によって生まれる病原性の解明が不可欠であるという発想に至り、本研究に着手することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多様性のある菌の集合体であるヒト口腔バイオフィームによって誘導される動脈硬化誘発機序を解明するために、ヒト刺激唾液から回収した口腔バイオフィームでヒト動脈内皮細胞を刺激した時の、内皮細胞における 1) サイトカイン (IL-6、IL-8、MCP-1)、2) パターン認識受容体 (TLR2、NOD2) 3) 細胞接着因子 (ICAM-1、VCAM-1、E-selectin、P-selectin) 発現を検討することである。本研究で得られる成果が「動脈硬化予防のために口腔衛生が重要である」ことを国民にアピールするための実験的確認となり、今回新規に展開する「多様性」の研究が、多菌種の集合体であるヒト口腔バイオフィーム誘発疾患の制御、予防法の開発に役立つことを期待している。

3. 研究の方法

(1) 単独の口腔細菌刺激によるヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生

ヒト動脈内皮細胞を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。次に 5 種類の口腔細菌 (*S. mutans* Xc、*Streptococcus parasanguinis* ATCC 15911、*Streptococcus sanguinis* ATCC 10556、*Streptococcus mitis* ATCC 6249、*S. oralis* ATCC 35037) をそれぞれヒト動脈内皮細胞と 24 時間共培養後、培地および内皮表面に存在する菌を抗生剤で処理した。細菌が内皮細胞に侵入した状態でさらに 24 時間培養後、培地を回収し、ELISA 法にて IL-6、IL-8、MCP-1 タンパク量を計り、非感染内皮細胞の産生量と比較した。

(2) ヒト口腔バイオフィーム刺激によるヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生

多様な菌種の混合体であるヒト口腔バイオフィームとして、異なる 3 人のヒト唾液から回収したヒト口腔バイオフィーム (Mixture of oral bacteria A、B、C) を、また単独の口腔細菌としては前記の条件下で内皮細胞におけるサイトカイン産生誘導能の高かった *S. mutans* Xc を用いた。ヒト口腔バイオフィームは 24 時間の共培養時間では内皮細胞を障害したため、以下の実験では障害しない 4 時間の共培養時間を用いることとした。

ヒト動脈内皮細胞を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。ヒト口腔バイオフィームあるいは *S. mutans* Xc と内皮細胞を 4 時間共培養後、培地および内皮表面に存在する菌を抗生剤で処理した。細菌が内皮細胞に侵入した状態でさらに 24 時間培養後、培地を回収し、ELISA 法にて内皮細胞における IL-6、IL-8、MCP-1 タンパク産生量を計り、非感染内皮細胞における産生量と比較した。

(3) ヒト口腔バイオフィーム刺激によるヒト動脈内皮細胞におけるパターン認識レセプター発現

ヒト動脈内皮細胞を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。ヒト口腔バイオフィームあるいは *S. mutans* Xc と内皮細胞を 4 時間共培養後、培地および内皮表面に存在する菌を抗生剤で処理した。細菌が内皮細胞に侵入した状態でさらに 24 時間培養後、内皮細胞を回収後、total RNA を抽出した。

リアルタイム RT-PCR 法にて内皮細胞における TLR2 および NOD2 mRNA 発現を定量し、非感染内皮細胞における発現量と比較した。

(4) ヒト口腔バイオフィルム刺激によるヒト動脈内皮細胞における細胞接着因子発現

ヒト動脈内皮細胞を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。ヒト口腔バイオフィルムあるいは *S. mutans* Xc と内皮細胞を 4 時間共培養後、培地および内皮表面に存在する菌を抗生剤で処理した。細菌が内皮細胞に侵入した状態でさらに 24 時間培養後、内皮細胞における細胞接着因子 (ICAM-1、VCAM-1、E-selectin、P-selectin) タンパクの発現を cell ELISA 法で検討し、非感染内皮細胞における発現量と比較した。

4. 研究成果

(1) 単独の口腔細菌刺激によるヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生

ヒト動脈内皮細胞を 5 種類の口腔細菌とそれぞれ 24 時間共培養後、抗生剤処理して口腔細菌が内皮細胞に侵入した状態でさらに 24 時間培養した場合、*S. mutans* Xc に刺激された内皮細胞は非刺激内皮細胞と比べて有意に多くの IL-6、IL-8、MCP-1 タンパクを産生した ($P < 0.05$) (図 1)。一方、他の 4 菌株は内皮細胞において IL-6、IL-8、MCP-1 タンパク産生を誘導しなかった。この条件では、ヒト動脈内皮細胞は口腔細菌によって障害されなかった。

(2) ヒト口腔バイオフィルム刺激によるヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生

ヒト口腔バイオフィルムあるいは *S. mutans* Xc と内皮細胞を 4 時間共培養後、培地および内皮表面に存在する菌を抗生剤で処理し、細菌が内皮細胞に侵入した状態でさらに 24 時間培養した場合の内皮細胞における IL-6、IL-8、MCP-1 タンパクの産生を調べたところ、用いたヒト口腔バイオフィルムは、全て非刺激内皮細胞と比べて有意に多くの IL-6、IL-8、MCP-1 タンパクを産生した ($P < 0.05$)。一方この条件では、*S. mutans* Xc は内皮細胞における IL-6、IL-8、MCP-1 タンパク産生を誘導しなかった。

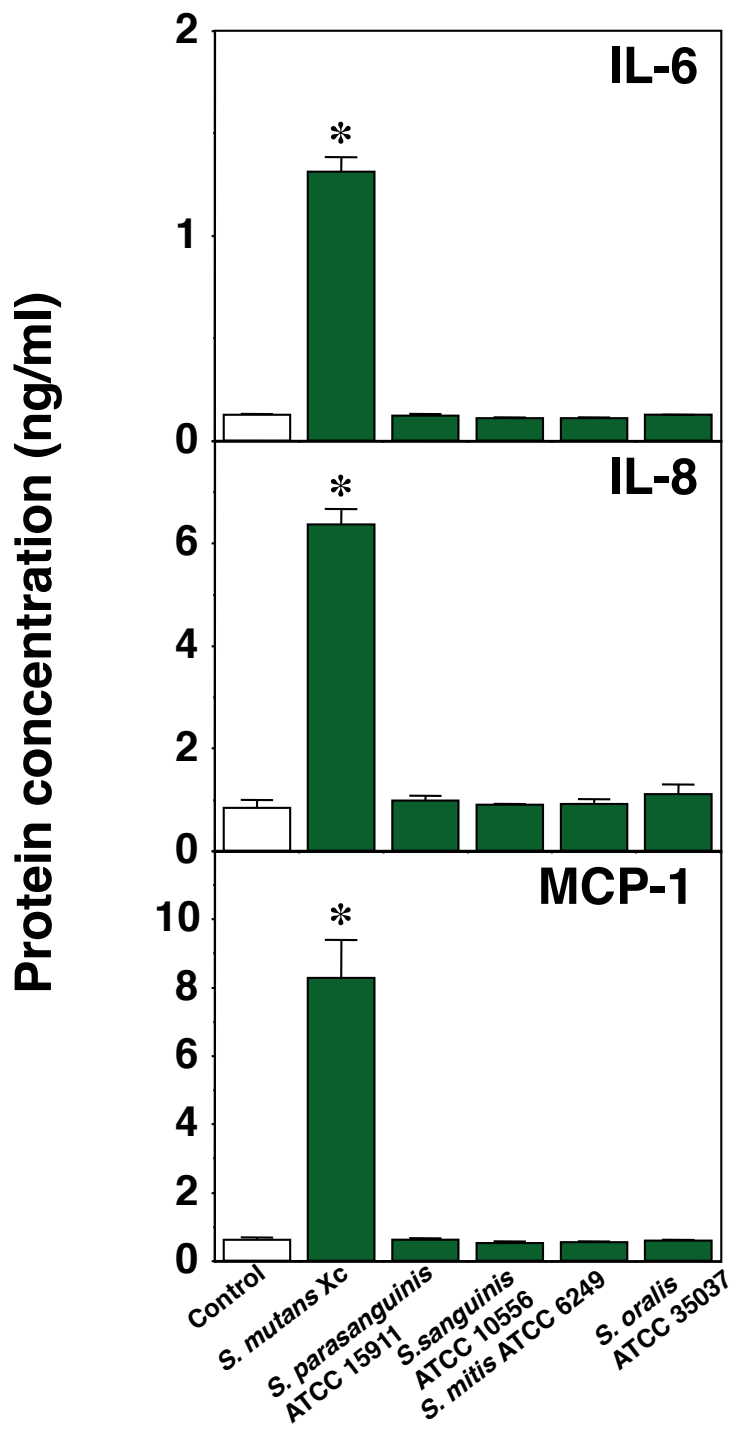
(3) ヒト口腔バイオフィルム刺激によるヒト動脈内皮細胞におけるパターン認識レセプター発現

ヒト口腔バイオフィルムあるいは *S. mutans* Xc と内皮細胞を 4 時間共培養後、培地および内皮表面に存在する菌を抗生剤で処理し、細菌が内皮細胞に侵入した状態でさらに 24 時間培養した場合の内皮細胞における TLR2 および NOD2 mRNA 発現を調べたところ、用いたヒト口腔バイオフィルムは、全て刺激した内皮細胞から有意に多くの TLR2 および NOD2 mRNA の発現を誘導した ($P < 0.05$)。一方この条件では、*S. mutans* Xc は内皮細胞における TLR2 および NOD2 mRNA 発現を誘導しなかった。

(4) ヒト口腔バイオフィルム刺激によるヒト動脈内皮細胞における細胞接着因子発現

ヒト口腔バイオフィルムあるいは *S. mutans* Xc と内皮細胞を 4 時間共培養後、培地および内皮表面に存在する菌を抗生剤で処理し、細菌が内皮細胞に侵入した状態でさらに 24 時間培養した場合の内皮細胞における ICAM-1、VCAM-1、E-selectin、P-selectin タンパク発現を調べたところ、用いたヒト口腔バイオフィルムの全てあるいは一部は、刺激した内皮細胞から有意に多くの ICAM-1、VCAM-1、E-selectin、P-selectin タンパク発現を誘導した ($P < 0.05$) (図 2)。一方この条件では、*S. mutans* Xc は内皮細胞における ICAM-1、VCAM-1、E-selectin、P-selectin タンパク産生を誘導しなかった。

以上、ヒト口腔バイオフィルムは、刺激したヒト動脈内皮細胞におけるパターン認識レセプター、サイトカイン、細胞接着因子の産生を高め、その能力は単独の口腔細菌よりも高かったことから、「菌種の多様性」がヒト口腔バイオフィルムの潜在的病原性に関与していることが示唆された。



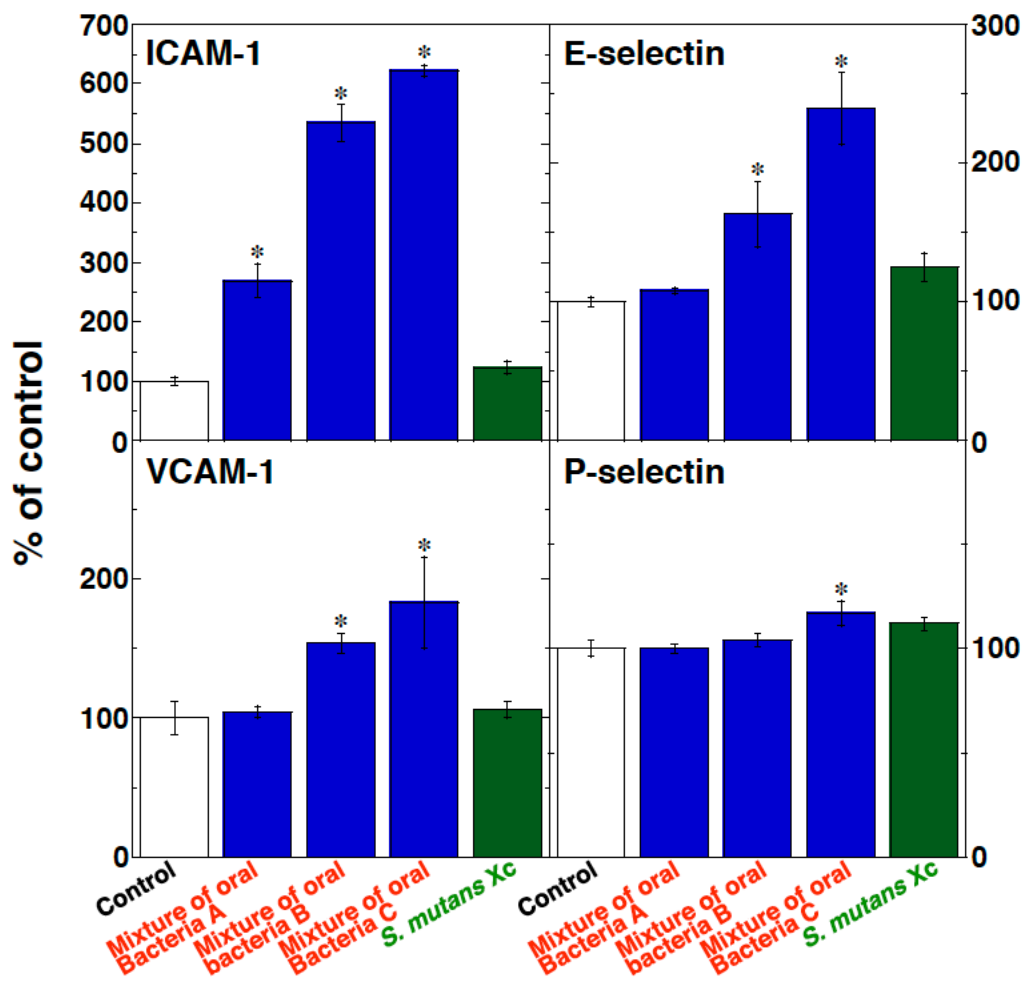


图 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagata E., Nishiyama T., Yamashita M., Ishigami T., Oho T.	4. 巻 65
2. 論文標題 A primary canine and an impacted permanent canine with infection potentially induced an intracranial abscess.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Australian Dental Journal	6. 最初と最後の頁 96-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/adj.12731	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nagata E. and Oho T.
2. 発表標題 An oral bacteria mixture induces inflammation in endothelial cells.
3. 学会等名 96th General session and Exhibition of the International Association for Dental Research（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長田恵美、於保孝彦
2. 発表標題 ヒト歯垢のヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生誘導能の検討
3. 学会等名 第66回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2017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
研究分担者	於保 孝彦 (Oho Takahiko) (50160940)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	