

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07124

研究課題名(和文) 口腔レンサ球菌の免疫細胞による殺菌からの回避機構と感染性心内膜炎発症との関連性

研究課題名(英文) Evaluation of the relationship between immune escape of oral streptococci and the pathogenic of infective endocarditis

研究代表者

田代 有美子(浦野有美子)(Urano-Tashiro, Yumiko)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：30434145

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)：Streptococcus gordoniiの高病原性DL1株と病原性の低いSK12株を用いて食胞内で働く各種抗菌物質に対する感受性を比較することでDL1株が貪食細胞による殺菌を回避するメカニズムの解析を試みた。その結果、今回用いた抗菌物質(低pH、H2O2、リゾチーム、ディフェンシン、ラクトフェリン)の中で、リゾチームに対する感受性がDL1株とSK12株で大きく異なっていることが明らかになった。このことより、S. gordonii DL1株はリゾチームに抵抗性を示すことで貪食細胞による殺菌を回避していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によりStreptococcus gordoniiが菌株によりリゾチームの感受性に違いがあることが初めて確認された。感染性心内膜炎を引き起こす菌株でリゾチームへの抵抗性が高いことから、リゾチームに対する感受性の有無がS. gordoniiによる感染性心内膜炎発症の原因の1つになると考えられる。今後リゾチーム抵抗性に関与する分子メカニズムの解析が進むことでS. gordonii感染症の新たな治療法の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We assessed the differences between the sensitivity of Streptococcus gordonii DL1 and S. gordonii SK12 to PMN-dependent killing. S. gordonii DL1 showed a higher survival when treated with PMNs than SK12. Both S. gordonii DL1 and S. gordonii SK12 showed high resistance to low pH condition. Compared to S. gordonii SK12, S. gordonii DL1 was sensitive to hydrogen peroxide. However, the resistance of S. gordonii DL1 to the tested bactericidal agents, especially lysozyme, was higher than that of SK12. These results indicated that S. gordonii DL1 is resistant to bactericidal agents that degrade bacteria in phagolysosomes.

研究分野：口腔微生物

キーワード：口腔レンサ球菌 感染性心内膜炎 免疫回避

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎は異常な血流等により損傷を受けた心臓の内膜に病原体や血小板、フィブリンが付着することで、心内膜での疣贅(いぼ)の形成や菌血症、血管血栓、心障害など多彩な症状を呈する全身疾患である。感染性心内膜炎の原因菌としてもっとも多いのが口腔レンサ球菌で、全体の約40%をしめる。現在、ハイリスクの患者には歯科処置等出血を伴う処置や手術を行う際に、抗菌薬の予防投与が行われているがあまり効果的ではない。そのため、抗菌薬に代わる予防薬の開発が期待されている。

2. 研究の目的

感染性心内膜炎は心内膜の細菌感染症で、約40%は口腔レンサ球菌が原因で起こる。当講座では、感染性心内膜炎の原因菌の一つである *Streptococcus gordonii* の表層タンパク質 Hsa が心内膜への菌の付着に関与していることを明らかにしてきた。感染性心内膜炎の発症には、病原体が心内膜に付着するだけでなく、免疫細胞に殺菌されずに生存していなくてはならない。しかしながら、殺菌回避に関与する遺伝子とその機能に関する報告はこれまでにない。そこで本研究では、*S. gordonii* が菌株により食細胞による殺菌への抵抗性に違いがあることに着目し、殺菌抵抗性に関与するメカニズムの解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) ヒト好中球の単離・貪食試験

健康なドナーから採取した末梢血から、Ficoll を用いた密度勾配遠心法により好中球を単離した。*S. gordonii* DL1 株または SK12 株は被験者自家血清を用いてオプソニン化した。好中球と細菌を細胞数 5 対 1 となるように混合し、37°C の恒温槽内で回転しながら 2 時間反応させた。好中球を滅菌蒸留水で破壊した後、brain heart infusion (BHI) 寒天培地に塗抹し、48 時間培養後の Colony forming unit (CFU) によって *S. gordonii* の生存を評価した。生存率は好中球を混合していない RPMI-1640 培地で 2 時間培養した際の CFU を基準として算出した。

(2) LIVE/DEAD 試験

好中球内の細菌の生死の確認は LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability kit を用いた蛍光染色により行った。先述の方法で単離した好中球とオプソニン化した細菌を細胞数 1 対 10 となるように混合し、37°C の恒温槽内で回転しながら 2 時間反応させた。その後、5 μM の SYTO9 と 30 μM の propidium iodide (PI) で染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。生菌は SYTO9 により緑色に、死菌は PI により赤色に染色される。

(3) 耐酸性試験

S. gordonii DL1 株または SK12 株を pH を 3.0 または 4.0、5.0 に調整した RPMI-1640 培地で 2 時間培養した。*S. gordonii* 菌株の生存は、反応後の培養液を BHI 寒天培地に塗抹し、48 時間培養後の CFU によって評価した。生存率は pH 7.0 に調整した RPMI-1640 培地で 2 時間培養した際の CFU を基準として算出した。

(4) 活性酸素感受性試験

S. gordonii DL1 株または SK12 株を 2.5 mM または 5.0 mM、10 mM で H₂O₂ を含む RPMI-1640 培地 (pH 5.0) で 30 分または 2 時間培養した。*S. gordonii* 菌株の生存は、反応後の培養液を BHI 寒天培地に塗抹し、48 時間培養後の CFU によって評価した。生存率は H₂O₂ を含まない RPMI-1640 培地で 2 時間培養した際の CFU を基準として算出した。

(5) 抗菌物質感受性試験

S. gordonii DL1 株または SK12 株をリゾチム (5 mg/ml) またはディフェンシン (5 μg/ml)、ラクトフェリン (10 μg/ml) を含む RPMI-1640 培地で 2 時間培養した。*S. gordonii* 菌株の生存は、反応後の培養液を BHI 寒天培地に塗抹し、48 時間培養後の CFU によって評価した。生存率は各種抗菌物質を含まない RPMI-1640 培地で 2 時間培養した際の CFU を基準として算出した。

4. 研究成果

(1) ヒト好中球貪食試験

好中球による貪食試験を行った結果、貪食 2 時間後においても DL1 株は 60%以上の生存率があるのに対し、SK12 株では 20%程度の生存率であった (図 1A)。また、貪食 2 時間後の好中球内での菌体の様子を顕微鏡下で観察したところ、DL1 株は好中球内で多数生存しているのが確認されたが、SK12 株はほとんどが死滅していた (図 1B)。このことから DL1 株が好中球による殺菌に抵抗性があるのに対して SK12 株は殺菌されやすいことが確認された。

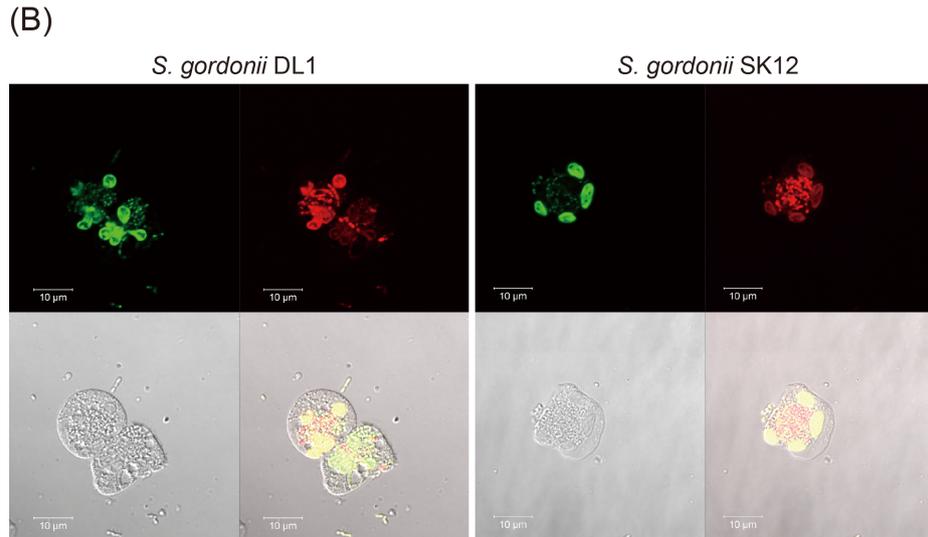
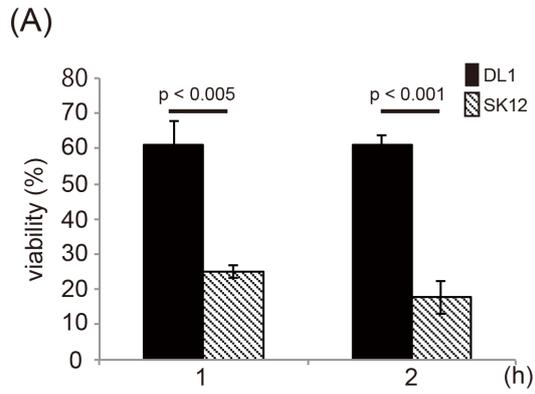


図1: *Streptococcus gordonii* DL1 株は SK12 株に比べ好中球による殺菌に抵抗性がある。(A) DL1 株または SK12 株を好中球に貪食させ、2 時間後の菌の生存率を算出した。(B) DL1 株または SK12 株を好中球に貪食させ、2 時間後の菌体の様子を共焦点顕微鏡により観察した。生菌は SYTO9 により緑色に、死菌は PI により赤色に染色される。

(2) 耐酸性試験

貪食食胞内は酸性条件であることから、*S. gordonii* の耐酸性を確認した。その結果 DL1 株、SK12 株ともに pH 4.0 まで高い生存率を維持していた (図2)。好中球の食胞内は pH 5.0 程度であるため、食胞内の酸性条件下でも生存可能であると考えられる。

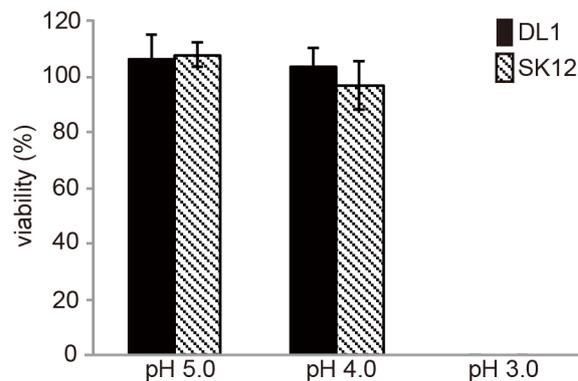


図2: *Streptococcus gordonii* は酸性条件に耐性である。DL1 株または SK12 株を pH 調整した RPMI-1640 培地中で培養し、2 時間後の生存率を算出した。

(3) 活性酸素感受性試験

H₂O₂ に対する抵抗性を確認した。その結果、2.5 mM または 5 mM の H₂O₂ を処理した際、処理後 30 分の時点では DL1 株の方が高い生存率を示していたが、2 時間後には SK12 株の方が高い生存率を示した。10 mM の H₂O₂ 処理では、30 分後には生存が確認できたが、2 時間後には両株ともに生存は認められなかった (図 3)。これらの結果より、DL1 株の方が SK12 株に比べ H₂O₂ への感受性が高いことが明らかとなった。

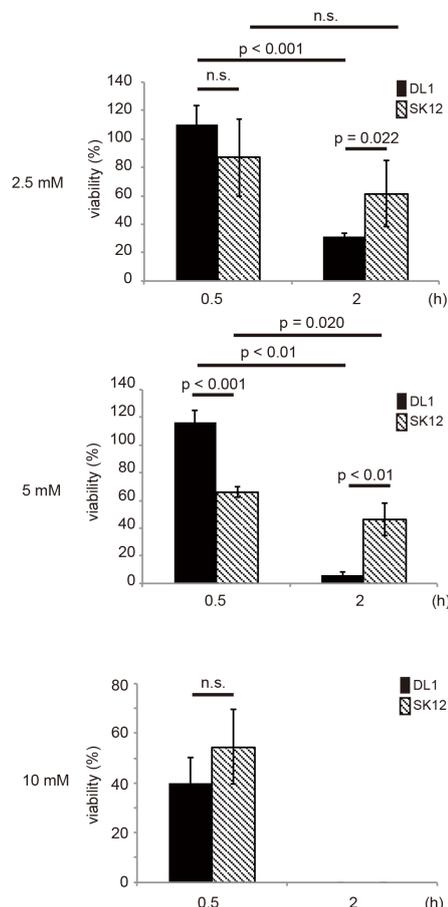


図 3 : *Streptococcus gordonii* DL1 株は SK12 株に比べ H₂O₂ に感受性が高い。DL1 株または SK12 株をさまざまな濃度で H₂O₂ を含む RPMI-1640 培地 (pH 5.0) 中で培養し、2 時間後の生存率を算出した。

(4) 抗菌物質感受性試験

食細胞内における主要な抗菌物質であるリゾチームまたはディフェンシン、ラクトフェリンを用い、*S. gordonii* の抗菌物質に対する感受性を確認した。培地 pH 7.0 の条件下ではいずれの抗菌物質を処理しても DL1 株と SK12 株の生存率に差は見られなかった。しかしながら、培地 pH 5.0 条件下では DL1 株は SK12 株に比べ高い生存率を示し、特にリゾチームを処理した際には DL1 株と SK12 株の生存率に顕著な差が認められた (図 4)。

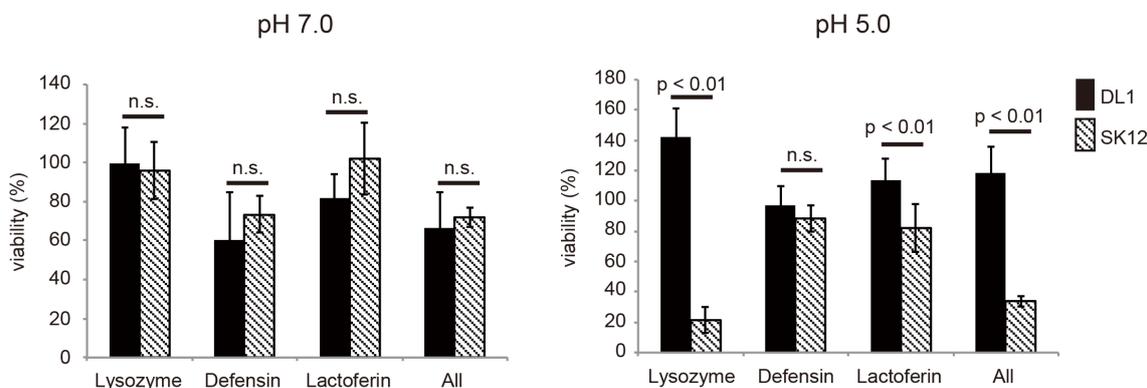


図 4 : *Streptococcus gordonii* の各種抗菌物質に対する感受性の確認。DL1 株または SK12 株をリゾチーム (5 mg/ml)、ディフェンシン (5 µg/ml)、ラクトフェリン (10 µg/ml)、または 3 種類混合で含む RPMI-1640 培地中で培養し、2 時間後の生存率を算出した。

(5) まとめと今後の展望

これらの結果より DL1 株はリゾチームに抵抗性を示すことで食細胞内での殺菌を回避していると考えられる。今回の結果は *S. gordonii* が菌株によってリゾチームの抵抗性に違いがあることを示した初めての論文となる。

レンサ球菌属の *Streptococcus pyogenes* は、食細胞に貪食された後、自ら分泌するストレプトリジン O の作用により食胞を破壊し細胞質内で増殖する。しかしながら、*S. gordonii* にはストレプトリジン O のホモログが存在しない。このことから、*S. gordonii* は *S. pyogenes* とは別の方法で食細胞による殺菌を回避していると考えられる。本研究により *S. gordonii* によるリゾチーム抵抗性が示されたが、その詳細なメカニズムは現在研究中である。今後さらに分子メカニズムの解明が進めばレンサ球菌による新たな殺菌回避メカニズムとして世界で初めての報告になるだろう。

また、口腔細菌によって起こる全身疾患として、感染性心内膜炎だけでなく脳膿瘍、海綿状静脈同門血栓、骨髄炎、人工関節炎など多種多様な疾患が報告されている。したがって、本研究で得られた知見は感染性心内膜炎だけでなく、口腔レンサ球菌によっておこる様々な感染症に対する予防に応用できると期待できる。

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 Urano-Tashiro Y, Saiki K, Yamanaka Y, Ishikawa Y, Takahashi Y.	4. 巻 16
2. 論文標題 Streptococcus gordonii DL1 evades polymorphonuclear leukocyte-mediated killing via resistance to lysozyme.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0261568	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 0件）

1. 発表者名 田代有美子、才木桂太郎、山中 幸、石川結子、林田尚斗、高橋幸裕
2. 発表標題 Streptococcus gordonii DL1 survives PMNs killing through its resistance to lysozyme
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田代 有美子
2. 発表標題 Streptococcus gordoniiの貪食は単球を樹状細胞へと分化誘導する
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------	---------