

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09831

研究課題名(和文) 感染性心内膜炎のリスクとしてのう蝕病原性細菌の菌体表層タンパクの網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of cariogenic bacteria cell surface proteins for risk of infective endocarditis

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutansのコラーゲン結合タンパク(Collagen-binding protein; CBP)に着目して、動物実験および培養細胞を用いて、感染性心内膜炎に対する病原性の評価を行なった。CBP陽性のS. mutansをラットの口腔に定着させて、重度う蝕を誘発させた状態で心臓弁に傷害を与えることにより心臓検体からS. mutansが分離され、軽度の感染性心内膜炎を生じることが示唆された。また、CBP陽性のS. mutansは血液中のIV型コラーゲン結合することにより血管内皮細胞の表層構造に変化を生じさせ、細胞内に侵入することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、心疾患を有し口腔内にCBP陽性のS. mutansが存在する場合には、重度のう蝕病変を放置することにより軽度の感染性心内膜炎を生じる可能性があることが示された。また、CBP陽性のS. mutansは血管内皮細胞の表層に付着するだけでなく、細胞内にまで侵入して心臓弁に定着する可能性があることが明らかになった。本研究で得られた成果から、感染性心内膜炎の発症を防ぐために、心疾患を有する対象におけるう蝕の予防や早期治療の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the pathogenicity of Streptococcus mutans for infective endocarditis using an animal model and cell culture experiments, with focus on 120-kDa collagen-binding proteins (CBP) on the surface of bacterial cells. S. mutans organisms were isolated from heart valve specimens extirpated from rats with both severe dental caries and heart valve injury, which led to occurrence of mild infective endocarditis. In addition, CBP-positive S. mutans-bound type IV collagen was found to induce cytoskeletal rearrangement of vascular endothelial cells and bacterial internalization.

研究分野：歯学

キーワード：Streptococcus mutans 感染性心内膜炎 コラーゲン結合タンパク う蝕 血管内皮細胞 血清 IV型コラーゲン RhoファミリーGタンパク質

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎 (Infective endocarditis; IE) は、侵襲的な歯科処置によって血液中に侵入した口腔細菌が、心内膜や弁膜において疣腫と呼ばれる塊を形成することで、発症に至るとされている。特に、心疾患患者では心内膜や弁膜に内皮傷害を生じやすいことから、IE 発症リスクが高いことが報告されている。う蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* は IE の起炎菌としても知られている。健常者のうち約 10~20%には菌体表層にコラーゲン結合タンパク (Collagen-binding protein; CBP) を発現する *S. mutans* が存在する。IE に罹患した患者では、口腔内における CBP 陽性 *S. mutans* の検出率が健常者と比較して有意に高いことが明らかになっている。これまでの IE に関する研究では、侵襲的な歯科処置に生じる一過性の菌血症を想定して、人工的に心臓弁を傷害したラットに供試菌を血中投与するモデルが用いられている。一方で、歯髄腔に達するう蝕が存在することによって、露出した毛細血管から口腔細菌が侵入し、持続的な菌血症が生じる可能性については検討されていない。また、CBP 陽性 *S. mutans* が心臓弁を構成する血管内皮細胞に侵入能を有することが明らかになっているものの、その詳細なメカニズムは示されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、IE のリスクファクターとして、*S. mutans* の菌体表層タンパクのうち CBP に着目し、以下の2点について検討することを目的とした。

- (1) 重度のう蝕病変部に存在する CBP 陽性 *S. mutans* が及ぼす IE に対する影響について、ラットモデルを用いて明らかにする。
- (2) CBP 陽性 *S. mutans* の血管内皮細胞への侵入メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 重度のう蝕病変部に存在する CBP 陽性 *S. mutans* の IE に対する病原性の解析

本研究における動物実験は、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行った。18日齢の Sprague-Dawley (SD) 系ラットに、 $1 \times 10^8$  CFU の CBP 陽性 *S. mutans* である SA31 株を1日1回5日間連続して経口投与して口腔内に菌を定着させ、重度う蝕を誘発させるためにスクロース 56%配合う蝕誘発性飼料を常時与えて飼育した。その後、90日齢のラットに、全身麻酔下にて右頸動脈よりカテーテルを挿入して大動脈弁に傷害を与え、1週間後 (A群)、1か月後 (B群) および3か月後 (C群) に屠殺した。これらの群に加えて、大動脈弁に傷害を与えずに3か月後に屠殺する群を設定した (D群)。さらに、*S. mutans* 株を定着させずにスクロース 56%配合う蝕誘発性飼料を与えた後、大動脈弁に傷害を与える群 (E群) と与えない群 (F群) とを設定して3か月後に屠殺した。

屠殺時に摘出した顎骨検体を用いて、実体顕微鏡下にて上下顎骨のう蝕の程度を評価した。また、屠殺時に摘出した心臓検体は、グラム染色および抗 CBP 抗体を用いた免疫染色によって病理組織学的評価を行った。さらに、心臓検体を細分し滅菌生理食塩水を加えて超音波処理した懸濁液を、Mitis-Salivarius 寒天培地にバシトラシン (100 unit/mL) および 15% スクロースを添加した MSB 寒天培地で播種して 37°C で 48 時間培養することにより *S. mutans* 株を分離した。さらに、顎骨および心臓検体由来の株のゲノム DNA を用いて、Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) 法にて遺伝子増幅パターンを比較した。

- (2) CBP 陽性 *S. mutans* の血管内皮細胞への侵入メカニズムの解明

### 1) 血管内皮細胞への侵入能の分析

供試菌として、CBP 陽性 *S. mutans* である TW295 株、TW295 株の CBP をコードする遺伝子を不活性化させた変異株である TW295CND、および CBP をコードする遺伝子を再導入した相補株である TW295comp 株を用いた。血管内皮細胞として、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) を用いた。HUVEC の培養時には、通法に従い血清を添加したものに加え、血清の代わりに血清中の主要な細胞外マトリックスである IV 型コラーゲン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチンのいずれかを添加したのもも準備した。

*S. mutans* の血管内皮細胞への侵入能を評価するために、供試菌を MOI=100 となるように抗菌薬非添加の状態の HUVEC に添加し 37°C で 2 時間反応させ、供試菌を HUVEC に付着侵入させた。2 時間後にメディアムをペニシリン、ストレプトマイシンおよびゲンタマイシン含有のものに交換して、HUVEC の内部に侵入した供試菌以外は全て死滅させた。その後、滅菌蒸留水を添加して HUVEC を破壊し、供試菌を含む細胞溶液を MSB 寒天培地に播種し、37°C で 48 時間培養した。感染させた菌数に対する MSB 寒天培地上に得られた菌数を侵入率として算出した。

*S. mutans* 存在下における HUVEC の遺伝子発現変化を網羅的に解析するために、供試菌を侵入させた HUVEC の細胞溶液を回収後に RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。DNA マイクロアレイ解析の結果、CBP 陽性 *S. mutans* の侵入により発現抑制が認められた遺伝

子に着目し、siRNA を用いたトランスフェクションにより HUVEC におけるこれらの遺伝子をノックダウンした。その後、各遺伝子をノックダウンさせた HUVEC を用いて、TW295 株の侵入能を評価した。

## 2) ラット IE モデルにおける血管内皮細胞の傷害の病理組織学的評価

動物実験は、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行った。10 週齢の SD 系ラットに、全身麻酔下にて頸動脈よりカテーテルを挿入して大動脈弁に傷害を与えるとともに、 $1 \times 10^8$  CFU の供試菌を頸静脈から投与した。その 7 日後に、ラットを屠殺して心臓弁を摘出した。心臓弁を横断して作製した組織切片は、正常な血管内皮細胞に発現する cluster of differentiation 31 (CD31) の特異抗体にて免疫染色し、染色が認められなかった部分を傷害部位として評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 重度のう蝕病変部に存在する CBP 陽性 *S. mutans* の IE に対する病原性の解析

#### 1) 異なる飼育期間における病原性の検討

プラークインデックスは飼育期間が長期になるほど増加が認められ、C 群は A 群および B 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ )。顎骨検体から分離された *S. mutans* 菌数は、C 群は A 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ )。また、顎骨のう蝕は飼育期間が長期化するにつれて歯質の実質欠損が増加し、C 群では歯冠崩壊が認められた。C3 以上の歯数および C4 の歯数は、飼育期間の長さに伴って高い値を示し、C 群は A 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ )。心臓から *S. mutans* が分離された割合は飼育期間の長さに伴って増加し、心臓からは 20~1,000 CFU の *S. mutans* が分離されたが、A から C の各群に有意差は認められなかった。グラム染色による病理組織学的評価により、心臓から *S. mutans* が分離された 5 匹のラットのうち 2 匹ではグラム陽性菌の存在が確認され、CBP 抗体を用いた免疫染色により陽性反応を示した。

#### 2) 重度う蝕の誘発および心臓弁傷害の有無による病原性の検討

SA31 株を口腔内に定着させた C 群および D 群は、定着させていない E 群および F 群と比較して有意に高いプラークインデックスを示し ( $P < 0.001$ )、*S. mutans* は C 群および D 群の顎骨検体のみから分離された。また、C 群および D 群には歯髄に到達し歯冠の崩壊を伴う重度う蝕が多数認められたのに対し、E 群および F 群では主に咬耗や軽度う蝕が認められる程度であった。C3 以上の歯数は、C 群および D 群では E 群および F 群と比較して有意に高い値を示し ( $P < 0.001$ )、C 群は D 群と比較して、C3 以上の歯数と C4 歯数の両方で有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。心臓検体の評価においては、C 群および D 群からは 20~100 CFU の *S. mutans* が分離され、C 群の心臓検体から *S. mutans* が分離される割合は D 群よりも高かった。それに対して、E 群および F 群では *S. mutans* は分離されなかった。また、体重に対する心臓重量比は、C 群では E 群および F 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

#### 3) 重度う蝕と心臓の病態における関連性の検討

RAPD 法により、心臓検体から分離された *S. mutans* 株の遺伝子増幅パターンは、口腔に投与した SA31 株のパターンと全てのプライマーで一致した。顎骨検体から分離された *S. mutans* 数は、心臓検体から *S. mutans* が分離されたラットにおいて、分離されなかったラットと比較して有意に高い値を示し ( $P < 0.05$ )、心臓検体から *S. mutans* が分離されたラットにおける C3 以上の歯数および C4 歯数は、*S. mutans* が分離されなかったラットと比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、C3 以上の歯数が片顎 6 臼歯に 5 本以上存在するラットでは 4 本以下のラットと比較して、心臓検体から *S. mutans* が分離される割合が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。さらに、C4 の歯数が片顎 6 臼歯中に 2 本以下しか存在しないラットと比較して、3 本以上存在するラットでは心臓検体から *S. mutans* が分離される割合が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

### (2) CBP 陽性 *S. mutans* の血管内皮細胞への侵入メカニズムの解明

#### 1) 血管内皮細胞への侵入能の分析

TW295 株は、血清添加時には非添加時と比較して有意に高い HUVEC への侵入率を示した。一方で、TW295CND 株は血清の有無に関係なくほとんど侵入率を示さなかったが、TW295comp 株では TW295 株と同様に血清存在下においてのみ侵入能が認められた。また、血清の代わりに細胞外マトリックスを添加して分析した結果、TW295 株は IV 型コラーゲン存在下において、他の細胞外マトリックス存在下と比較して HUVEC に対して有意に高い侵入率を示した ( $P < 0.01$ )。それに対して、TW295CND 株は IV 型コラーゲンの有無に関係なくほとんど侵入率を示さなかったが、TW295comp 株では TW295 株と同様に IV 型コラーゲン存在下において侵入能が認められた。

DNA マイクロアレイ解析の結果、TW295CND 株感染群および非感染群と比較して TW295 株感染群においては、Rho ファミリー G タンパク質に関連したシグナル伝達分子である ARHGAP9、ARHGEF38、GPR179 の発現の上昇を認めた。そこで、HUVEC の各遺伝子をノックダウンさせ

た上で、TW295 株の侵入率の変化を評価したところ、Rho ファミリーG タンパク質の交換因子で細胞骨格の構造変化に関わる *ARGEF38* がノックダウンされることによって、TW295 株の侵入率は有意な低下を認めた ( $P<0.01$ )。それに対して、*ARHGAP9* や *GPR179* のノックダウンではそのような侵入率の低下は認められなかった。

## 2) ラット IE モデルにおける血管内皮細胞の傷害の病理組織学的評価

ラットの心臓弁の内腔全長に関しては、TW295 株、TW295CND 株および TW295comp 株のいずれにおいても有意差を認めなかった。一方で、傷害を受けた内腔長は TW295CND 株および TW295comp 株と比較して TW295 株において有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nomura R, Kokomoto K, Ohara T, Nakatani S, Ooshima T, Nakano K.	4. 巻 106
2. 論文標題 Current knowledge among Japanese experienced general dentists regarding prevention of infective endocarditis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 297-305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-018-0344-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kokomoto K, Nomura R, Ohara T, Nakatani S, Ooshima T, Nakano K	4. 巻 28
2. 論文標題 Current knowledge among pediatric dentistry specialists in Japan regarding prevention of infective endocarditis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 110-117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakatani S, Ohara T, Ashihara K, Izumi C, Iwanaga S, Eishi K, Okita Y, Daimon M, Kimura T, Toyoda K, Nakase H, Nakano K, Higashi M, Mitsutake K, Murakami T, Yasukochi S, Okazaki S, Sakamoto H, Tanaka H, Nakagawa I, Nomura R, Fujiu K, Miura T, Morizane T.	4. 巻 83
2. 論文標題 JCS 2017 guideline on prevention and treatment of infective endocarditis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1767-1809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-19-0549.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura R, Matayoshi S, Otsugu M, Kitamura T, Teramoto N, Nakano K.	4. 巻 88
2. 論文標題 Contribution of severe dental caries induced by Streptococcus mutans to the pathogenicity of infective endocarditis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00897-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/IAI.00897-19.	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 -

1. 著者名 Nomura R, Otsugu M, Hamada M, Matayoshi S, Teramoto N, Iwashita N, Naka S, Matsumoto-Nakano M, Nakano K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Potential involvement of Streptococcus mutans possessing collagen binding protein Cnm in infective endocarditis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75933-6.	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 又吉紗綾、大継将寿、野村良太、仲野和彦
2. 発表標題 重度齲蝕によって誘発されるラット感染性心内膜炎新規モデルの構築
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nomura R, Otsugu M, Matayoshi S, Nakano K.
2. 発表標題 Evaluation of severe dental caries induced by Streptococcus mutans during development of infective endocarditis in rats.
3. 学会等名 65th ORCA (European Organization of Caries Research) Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matayoshi S, Otsugu M, Nomura R, Nakano K.
2. 発表標題 Streptococcus mutans-induced infective endocarditis in severe dental caries model rats.
3. 学会等名 66th Conference of Japanese Association of Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nomura R, Matayoshi S, Otsugu M, Kitamura T, Ooshima T, Nakano K.
2. 発表標題 Systemic evaluation of rat model of simultaneous dental caries and infective endocarditis.
3. 学会等名 66th ORCA (European Organization of Caries Research) Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matayoshi S, Otsugu M, Nomura R, Nakano K.
2. 発表標題 Streptococcus mutans associated with severe dental caries induces infective endocarditis.
3. 学会等名 97nd IADR (International Association of Dental Research) Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matayoshi S, Otsugu M, Kitamura T, Nomura R, Nakano K.
2. 発表標題 Infective endocarditis in caries-induced model rats with heart valve injury.
3. 学会等名 4th Meeting of International Association of Dental Research-Asia Pacific Region (IADR-APR) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末廣雄登、又吉紗綾、大繼將寿、野村良太、仲野和彦
2. 発表標題 死菌処理したStreptococcus mutansのコラーゲン結合能の評価
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 野村良太、仲野和彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 人工臓器	5. 総ページ数 223-226
3. 書名 齧蝕原性細菌による感染性心内膜炎における病原性の評価モデルの検討	

1. 著者名 野村良太、仲野和彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本化学療法学会雑誌	5. 総ページ数 176-181
3. 書名 齧蝕原性細菌によって引き起こされる感染性心内膜炎	

1. 著者名 野村良太、仲野和彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 生産と技術	5. 総ページ数 64-67
3. 書名 う蝕原性細菌に引き起こされる循環器疾患	

〔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	鋸屋 侑布子  (Ogaya Yuko)  (40803078)	大阪大学・歯学研究科・助教    (14401)	



6. 研究組織（つづき）

	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	大繼 將寿  (Otsugu Masatoshi)  (40803086)	大阪大学・歯学研究科・助教     (14401)	

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