

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21689052

研究課題名（和文） 口腔細菌の関わる脳血管疾患におけるメカニズムの解明とその予防法の追究

研究課題名（英文） Elucidation of mechanism for development of cerebrovascular diseases associated with oral bacteria and pursuit of preventive approach

研究代表者

仲野 和彦（NAKANO KAZUHIKO）

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：00379083

研究成果の概要（和文）：う蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* 株を、中大脳動脈を損傷したマウスの頸静脈より感染させたところ、脳出血の悪化を誘発する株が存在することが分かった。また、それらの株の菌体表層に共通して存在する分子量約 120kDa のコラーゲン結合タンパク（Cnm タンパク）が、血小板凝集能を阻害していることが示された。さらに、実際に脳出血を引き起こした対象から提供を受けた唾液から分離した *S. mutans* 菌株では、健常者と比較して Cnm タンパク陽性株の割合が高いことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Infection with specific strains of *Streptococcus mutans*, a pathogen of dental caries, by injection into the jugular veins of mice with a photochemically-injured middle cerebral artery resulted in cerebral hemorrhage development. These *S. mutans* strains possess a 120-kDa collagen-binding protein (Cnm protein) on the cell surface, which inhibits platelet aggregation properties. In addition, the detection rate of Cnm-positive *S. mutans* strains in patients with a cerebral hemorrhage has been found to be significantly higher than that in healthy individuals.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 9,000,000 | 2,700,000 | 11,700,000 |
| 2010年度 | 6,800,000 | 2,040,000 | 8,840,000 |
| 2011年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 総計 | 20,200,000 | 6,060,000 | 26,260,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：口腔レンサ球菌，感染性心内膜炎，分子生物学，心臓弁，歯垢

1. 研究開始当初の背景

う蝕の原因細菌である *Streptococcus mutans* は、菌血症や感染性心内膜炎患者の血液から分離されることがある。以前は、*S. mutans* の血清型は c/e/f 型の 3 つに分類され

ており、約 70-80% の人が c 型株を口腔内に保有していることが知られていた。一方で、我々が分析した血液分離株 4 株は、どの株も c 型に属さないうえに、そのうち 2 株 (TW295 株および TW871 株) は、分類が不能であった。

その後、それらの株の血清型特異多糖抗原の組成を明らかにし、新規に *k* 型とした。この *k* 型株は、健常人で口腔内に保有している人は約 2-3%にしか過ぎないことが分かった。

これまでに、*S. mutans k* 型株は、何らかの原因で口腔から血液中に侵入した際に、心内膜炎における病原性が高い可能性を示した。また、*k* 型株の多くは、標準株と比較して菌体表層構造に変異によって抗原性が低下しており、血液中に侵入した際には、免疫反応で排除されにくい性状も有していることを明らかにした。一方で、TW871 株は、心内膜炎にともなう膜下出血を併発した症例から分離された株であり、*k* 型の *S. mutans* 菌株が、心内膜炎だけではなく頭蓋内出血にも何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

最近になって、*S. mutans* の菌体表層に存在する I 型コラーゲンに対する結合能を有する分子量約 120 kDa の Cnm タンパクの存在が示され、それをコードする *cnm* 遺伝子の配列が明らかにされた。一般的に、広く口腔内に存在する株では、約 10%にしか Cnm タンパクを有する株が存在しないことが示されている。しかし、*k* 型株ではコラーゲン結合能を有する株の割合が高く、Cnm タンパクを保有している株が多いことが示された。

2. 研究の目的

本研究では、マウス中大脳損傷モデルを用いて *k* 型株をはじめとした *S. mutans* 菌株の病原性を、Cnm タンパクの有無に焦点をあて検討することにした。また、各種の *in vitro* 系の分析から、*S. mutans* が関連する脳出血の病原メカニズムの一端を明らかにするとともに、実際に脳出血を生じた対象者の口腔内に存在する *S. mutans* 菌株と非罹患者の *S. mutans* 菌株を分離し、それぞれにおける Cnm タンパクの陽性率を検討することにした。

3. 研究の方法

(1) マウス中大脳動脈傷害モデルによる評価

まず、全身麻酔下で露出させた右側頸静脈より挿入したカテーテルから光増感剤を投与するとともに、頭蓋骨を削除して露出させた左側中大脳動脈に光照射して、軽度の脳出血を誘発させた後、頸静脈に留置したカテーテルより 1×10^7 CFU の供試菌を感染させた。供試菌としては、TW295 株や TW871 株などの *k* 型株をはじめ多くの臨床分離株を用いた。また、Cnm タンパクを欠失させた株および Cnm の組換えタンパクを作製し、マウスモデルにおける病原性を検討した。

(2) 脳出血悪化のメカニズムの追究

各血清型株におけるコラーゲンによる血小板凝集能を、マウスおよびヒト全血を用いて、血小板凝集計によって検討した。また、これらの株の表層電荷をレーザー電位計で測定するとともに、菌体表層を電子顕微鏡で観察した。

(3) 脳出血患者から採取した唾液の分析

脳出血の診断のもと加療中の 74 人(平均年齢 68.4 歳)にご協力いただき、唾液の提供を受けた。また、対照群として、全身的既往歴を有さず投薬も受けていない対象 35 人(平均年齢 65.9 歳)に唾液を提供していただいた。これらの検体から *S. mutans* 菌株を分離し、染色体 DNA を抽出後、*S. mutans* 特異プライマーによる PCR 法によって菌種の確認を行った。その後、*cnm* 特異プライマーを用いた PCR 法によって、分離菌株における *cnm* 遺伝子の保有の有無を決定した。

4. 研究成果

(1) マウス中大脳動脈傷害モデルにおける評価

k 型の *S. mutans* 菌株を感染させた群では、血管損傷側において広範囲の出血が認められた。一方で、一般的な口腔分離株を感染させ

た群では、著明な変化は見られなかった。また、*k*型の *S. mutans* 菌株において Cnm タンパクを欠失させた株を感染させても、出血の悪化は生じなかった。一方で、組換え Cnm タンパクを頸静脈より投与すると、濃度依存的に出血の悪化が認められた。

(2) 脳出血悪化のメカニズムの追究

各菌株における I 型コラーゲンによる血小板凝集率を比較すると、*k* 型株が他の血清型株と比較して有意に低いことが明らかになった。また、これらの株の表層電荷は強く負に帯電する傾向があり、電子顕微鏡で観察すると、菌体表層の構造物に変異が生じている可能性が示された。

(3) 脳出血患者から採取した唾液の分析

S. mutans の分離率は、脳出血患者群および対照群で、それぞれ全体の約 6 割程度であった。一方、*cnm* の陽性率に関しては、対照群が 8.5%であったが、脳出血患者群ではその約 3 倍であった。さらに、実際に脳出血患者群からの複数の分離株の病原性を、前述のマウスモデルで検討すると、脳出血を悪化させることが明らかになった。

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 18 件)

- ① Nomura R, Nakano K, Naka S, Nemoto H, Masuda K, Lapirattanakul J, Alaluuusua S, Matsumoto M, Kawabata S, Ooshima T. Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*(in press) (査読有)
- ② Masuda K, Nemoto H, Nakano K, Naka S, Nomura R, Ooshima T. Amoxicillin-resistant oral streptococci identified in dental plaque specimens from healthy Japanese adults. *J Cardiol* (in press)

(査読有)

- ③ Nemoto H, Nakano K, Masuda K, Wada K, Ardin AC, Nomura R, Ooshima T. Distribution of oral streptococci highly resistant to amoxicillin in dental plaque specimens from Japanese children and adolescents. *J Med Microbiol* 60, 1853-1859, 2011. (査読有)
- ④ Lapirattanakul J, Nakano K, Nomura R, Leelataweewud P, Chalermarp N, Klaophimai A, Srisatjaluk R, Hamada S, Ooshima T. Multilocus sequence typing analysis of *Streptococcus mutans* strains with the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesin. *J Med Microbiol* 60, 1677-1684, 2011. (査読有)
- ⑤ Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K, Kudo C, Nomura R, Kojima A, Naka S, Muranaka Y, Thura M, Nakajima A, Masuda K, Speziale P, Shimada N, Amano A, Kamisaki Y, Tanaka T, Umemura K, Ooshima T. The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nat Commun* 2, 485, 2011. (査読有)
- ⑥ Nomura R, Nakano K, Mäkelä K, Vaara M, Salo E, Alaluuusua S, Ooshima T. Isolation and characterization of *Streptococcus mitis* from blood of child with osteomyelitis. *Int J Paediatr Dent* 21, 192-199, 2011. (査読有)
- ⑦ Nakano K, Wada K, Nomura R, Nemoto H, Inaba H, Kojima A, Naka S, Hokamura K, Mukai T, Hata H, Toda K, Nakajima A, Umemura K, Kamisaki Y, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Characterization of aortic aneurysm of cardiovascular diseases patients

- harboring *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Dis* 17, 371-378, 2011. (査読有)
- ⑧ Nakano K, Ooshima T. Common knowledge regarding prevention of infective endocarditis among general dentists in Japan. *J Cardiol* 57, 123-130, 2011. (査読有)
- ⑨ Nomura R, Naka S, Nakano K, Taniguchi N, Matsumoto M, Ooshima T. Detection of oral streptococci with collagen-binding properties in saliva specimens from mothers and their children. *Int J Paediatr Dent* 20, 254-260, 2010. (査読有)
- ⑩ Taniguchi N, Nakano K, Nomura R, Naka S, Kojima A, Matsumoto M, Ooshima T. Defect of glucosyltransferases reduces platelet aggregation activity of *Streptococcus mutans*: Analysis of clinical strains isolated from oral cavities. *Arch Oral Biol* 55, 410-416, 2010. (査読有)
- ⑪ Hokamura K*, Inaba H*, Nakano K*, Nomura R, Yoshioka H, Taniguchi K, Ooshima T, Wada K, Amano A, Umemura K. Molecular analysis of aortic intimal hyperplasia caused by *Porphyromonas gingivalis* infection in mice with endothelial damage. *J Periodontal Res* 45, 337-344, 2010. (*equally contributed) (査読有)
- ⑫ Nakano K, Nomura R, Taniguchi N, Lapidattanakul J, Kojima A, Naka S, Senawongse P, Srisatjaluk R, Grönroos L, Alaluusua S, Matsumoto M, Ooshima T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesin. *Arch Oral Biol* 55, 34-39, 2010. (査読有)
- ⑬ Lapidattanakul J, Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Kojima A, Senawongse P, Srisatjaluk R, Ooshima T. Detection of serotype *k* *Streptococcus mutans* in Thai subjects. *Oral Microbiol Immunol* 24, 431-433, 2009. (査読有)
- ⑭ Maruyama F, Kobata M, Kurokawa K, Nishida K, Sakurai A, Nakano K, Nomura R, Kawabata S, Ooshima T, Nakai K, Hattori M, Hamada S, Nakagawa I. Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. *BMC Genomics* 10, 358, 2009. (査読有)
- ⑮ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapidattanakul J, Nemoto H, Grönroos L, Alaluusua S, Ooshima T. Molecular and clinical analyses of the gene encoding collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol* 58, 469-475, 2009. (査読有)
- ⑯ Inaba H*, Hokamura K*, Nakano K*, Nomura R, Katayama K, Nakajima A, Yoshioka H, Taniguchi K, Kamisaki Y, Ooshima T, Umemura K, Murad F, Wada K, Amano A. Upregulation of S100 calcium-binding protein A9 is required for induction of smooth muscle cell proliferation by a periodontal pathogen. *FEBS Lett* 583, 128-134, 2009. (*equally contributed) (査読有)
- ⑰ Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol* 24, 64-68, 2009. (査読有)

読有)

- ⑱ Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Mukai T, Hata H, Toda K, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Molecular analyses of bacterial DNA in extirpated heart valves from infective endocarditis patients. *Oral Microbiol Immunol* 24, 43-49, 2009. (査読有)

[学会発表] (計20件)

- ① 野村良太, 仲野和彦, 仲 周平, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* のコラーゲン結合タンパクについて 第113回大阪大学歯学会例会 2012.1.12, 吹田.
- ② 仲野和彦, 野村良太, 外村和也, 大橋寿彦, 細井泰志, 田中篤太郎, 梅村和夫, 大嶋 隆 脳出血における増悪因子としてのう蝕病原細菌 *Streptococcus mutans* 第36回脳卒中学会総会 2011.7.31, 京都.
- ③ 梅村和夫, 外村和也, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆, 大橋寿彦, 細井泰志, 田中篤太郎 高病原性う蝕原因菌 *Streptococcus mutans* は脳出血を増悪させる 第36回脳卒中学会総会 2011.7.31, 京都.
- ④ 田中篤太郎, 細井泰志, 大橋寿彦, 外村和也, 梅村和夫, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 コラーゲン結合能と血小板凝集抑制能を有する“う蝕”(虫歯)菌は脳卒中のリスクファクターとなり得るか? 第36回脳卒中学会総会 2011.7.31, 京都.
- ⑤ Nomura R, Nakano K, Naka S, Matsumoto M, Ooshima T. Distribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding activities and their adhesion properties to endothelial cells. 59th Congress of European Organization of Caries Research, 2011.7.6, Kaunas, Lithuania.
- ⑥ Naka S, Nakano K, Nomura R, Ooshima T.

Distribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding properties. 23rd Meeting of International Association of Paediatric Dentistry, 2011.6.15, Athens, Greece.

- ⑦ Nakano K, Nomura R, Taniguchi N, Wada K, Ooshima T. Relationship of *Streptococcus mutans* collagen-binding properties with cerebral hemorrhage deterioration. 89th Meeting of International Association of Dental Research, 2011.3.16, San Diego, USA.
- ⑧ Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Characterization of novel collagen-binding protein of *Streptococcus mutans*. 89th Meeting of International Association of Dental Research, 2011.3.16, San Diego, USA.
- ⑨ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Wada K, Matsumoto M, Ooshima T. Contribution of collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans* to cause deterioration of cerebral hemorrhage. 58th Congress of European Organization of Caries Research, 2010.7.7, Montpellier, France.
- ⑩ 谷口奈穂, 仲野和彦, 野村良太, 松本道代, 大嶋 隆 マウス大脳動脈損傷モデルにおける *Streptococcus mutans* コラーゲン結合タンパクの病原性への関与 第48回日本小児歯科学会大会, 2010.5.19, 名古屋.
- ⑪ 野村良太, 仲野和彦, 小島あゆち, 松本道代, 大嶋 隆 小児大腿骨髄炎患者血液より分離した *Streptococcus mitis* 株の性状の分析 第48回日本小児歯科学会大会, 2010.5.19, 名古屋.
- ⑫ 仲 周平, 野村良太, 仲野和彦, 大嶋 隆

小児唾液中に存在するコラーゲン結合能を有する菌株の分析 第28回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2009.10.18, 大阪.

⑬ 谷口奈穂, 仲野和彦, 野村良太, 松本道代, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* 臨床分離株におけるグルコシルトランスフェラーゼの発現と血小板凝集能への関与 第28回日本小児歯科学会近畿地方会大会 2009.10.18, 大阪.

⑭ 小島あゆち, 野村良太, 大川玲奈, 仲野和彦, 大嶋 隆 大腿骨骨髓炎を呈した小児の病変部及び口腔から分離した菌株の性状の分析 第28回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2009.10.18, 大阪

⑮ Lapidattanakul J, Nakano K, Senawongse P, Leelataweewud P, Srisatjaluk R, Ooshima T. Genes concerning adhesion to extracellular matrix in *Streptococcus mutans* from Thai subjects. 5th Congress of International Dental Collaboration of the Mekong River Region, 2009.10.14, Hanoi, Vietnam.

⑯ 中川一路, 仲野和彦, 川端重忠, 大嶋 隆, 浜田茂幸 *Streptococcus mutans* ゲノム解析に基づく種レベルでの進化機構の解析 第51回日本歯科基礎医学会大会 2009.9.10, 新潟.

⑰ Nakano K, Taniguchi N, Kojima A, Nomura R, Wada K, Ooshima T. Presence of serotype *k* strains of *Streptococcus mutans* is a potential risk factor for cerebral hemorrhage. 56th Congress of European Organization of Caries Research, 2009.7.1, Budapest, Hungary.

⑱ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Kojima A, Naka S, Ooshima T. Molecular analyses of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding properties. 56th

Congress of European Organization of Caries Research, 2009.7.1, Budapest, Hungary.

⑲ 仲 周平, 野村良太, 仲野和彦, 大嶋 隆 唾液中に含まれる口腔レンサ球菌のコラーゲン結合能に関する分析 第47回日本小児歯科学会大会, 2009.5.14, 吹田.

⑳ 谷口奈穂, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 マウス大脳動脈損傷モデルにおける *S. mutans* の病原性の検討 第47回日本小児歯科学会大会, 2009.5.14, 吹田.

[図書] (計1件)

① Nakano K, Taniguchi K, Ooshima T. Oral bacteria detected in the hearts of patients with valvular diseases. In: Bennington EH editor. Horizons in World Cardiovascular Research. Vol. 2, Nova Science Publishers, pp. 143-163, 2010.

[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

仲野 和彦 (NAKANO KAZUHIKO)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号: 00379083

(2) 研究協力者

大嶋 隆 (OOSHIMA TAKASHI)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号: 80116003

梅村 和夫 (UMEMURA KAZUO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40232912

田中 篤太郎 (TANAKA TOKUTARO)
聖隷浜松病院・脳神経外科・部長
研究者番号: 90283366