

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19604

研究課題名（和文）口腔細菌叢のメタゲノム解析による非アルコール性脂肪肝炎発症機序解明と新規予防戦略

研究課題名（英文）Oral microbiome analysis for elucidation of non-alcoholic steatohepatitis mechanism and development of preventive strategy

研究代表者

仲野 道代（松本道代）（Nakano, Michiyo）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：30359848

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪肝炎（NASH）患者の口腔内では、コラーゲン結合タンパク（Cnm）および高分子タンパク抗原（PA）を表層に有する *S. mutans* 菌株の検出率が最も高かった。また、これらの *S. mutans* 菌株を用いたラット動物モデルにおいては、肝臓組織では明らかにNASHの病態を示していた。さらに、同じ *S. mutans* 菌株をラットの頸静脈から投与した場合、他の臓器と比較して肝臓から検出される菌量が最も高かった。以上の結果から、CnmおよびPAを表層に有する *S. mutans* の方が血中に侵入した場合、より多くの菌が肝臓に到達し付着することで NASH 発症に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、コラーゲン結合タンパクおよび高分子タンパク抗原をその表層に有している齧蝕病原細菌 *Streptococcus mutans* が非アルコール性脂肪肝炎発症に関連している可能性が示された。このことは、小児期の口腔細菌叢を調べることにより、将来のメタボリックシンドローム予備軍とも言える小児を特定することができ早期予防・治療に着手するシステムの構築につながる可能性があり、成人におけるメタボリックシンドロームの発症を抑制する新たなアプローチの確立にもつながる。さらに、口腔内細菌が遠隔臓器における炎症を惹起するメカニズムの解明につながり、様々な疾患の発症の原因の解明の可能性もある。

研究成果の概要（英文）：Clinical examination findings showed significantly greater numbers of *Streptococcus mutans* organisms in saliva specimens from NASH as compared to NAFL patients, while the percentage of NASH patients possessing Cnm- and PA-positive strains was also significantly larger. Next, C57BL/6J mice (6-week-old males) fed a high-fat diet for 4 weeks were administered Cnm- and PA-positive *S. mutans* strains via the jugular vein. After 12 weeks, HE staining revealed marked lipid accumulation in liver tissues, with lobular inflammation also observed. MT staining showed marked liver fibrosis, indicating a NASH-related pathological condition. Also, the number of organisms was significantly greater in liver specimens obtained after infection with Cnm- and PA-positive strains as compared to those from mice infected with Cnm- and/or PA-negative strains. It is thus suggested that Cnm- and PA-positive *S. mutans* organisms in the bloodstream reach a liver with fat accumulation, with NASH aggravation induced.

研究分野：小児歯科学

キーワード：Streptococcus mutans 口腔細菌叢 コラーゲン結合タンパク 非アルコール性脂肪肝炎

## 1. 研究開始当初の背景

文部科学省の統計調査から、メタボリックシンドロームの有力な危険因子とされる肥満は小児において増加の一途をたどっていることがわかっている。メタボリックシンドロームを基盤とする糖尿病などの全身疾患と歯周病原性細菌との関連についての報告が数多くなされている。これまでにメタボリックシンドロームとの関連が深い疾患の一つである非アルコール性脂肪肝炎の増悪化に、歯周病原性細菌が関与していることを明らかにした。その研究を行った際に、脂肪肝の主原因が肥満であることに着目しており、肥満傾向にある小児が脂肪肝炎を発症し、成人になった際にメタボリックシンドロームに移行する可能性が高いのではないかとという着想に至った。しかしながら、非アルコール性脂肪肝炎は小児期に多いが、小児期は歯周病原性細菌の検出率は低い。そこで申請者らは、小児期にもっとも多く検出される齶蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* に着目し、これまでにコラーゲン結合タンパクを表面に有する *S. mutans* の菌株が非アルコール性脂肪肝炎の増悪化に関与している可能性があることを明らかにした。さらに非アルコール性脂肪肝炎と診断された患者の口腔内では、健常人と比較して、コラーゲン結合タンパクを表面に有する *S. mutans* の検出率が有意に高いことを明らかとした。このように臨床データとの繋がりが明らかとなったため、*S. mutans* の関連についてのさらなる検討が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、NASH 患者の口腔細菌叢から齶蝕に関連する菌のスクリーニングを行い、それらの細菌の非アルコール性脂肪肝炎に対する病原性について *in vitro* 系および動物モデルを用いて分析し、NASH 発症メカニズムについて明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) NAFLD 患者の唾液中に存在する *S. mutans* の分離と同定

市立奈良病院で、生検により NAFLD と診断された 40 名の患者 (NASH は 20 名, NAFL は 20 名) を対象とした。なお本研究は、同病院倫理委員会および岡山大学病院倫理委員会の承諾を得た後、同意の得られた対象から唾液の採取を行い研究に使用した。唾液サンプルを Mitis-Salivarius (MS) 寒天培地に播種し、37 °C で 48 時間培養後、コロニー数をカウントした。また、MS プレートから分離した株を Brain Heart Infusion 液体培地にて 37 °C で 24 時間培養した後、細菌 DNA を抽出し、*S. mutans* の特異的プライマーを用いた polymerase chain reaction (PCR) 法により、菌を同定した。さらに *S. mutans* と同定された菌は、Cnm をコードする遺伝子 *cnm* に特異的なプライマーを用いた。PCR 法によって *cnm* の有無を調べた。また、Western blotting 法により PA の発現の有無を確認した。

### (2) NASH モデルマウスにおける検討

重度の患者の唾液中から分離した IV 型コラーゲンへの結合能が高い Cnm および PA 陽性 *S. mutans* KT3 (Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup>) 株と、感染性心内膜炎患者からの血液分離株である Cnm および PA 陽性 TW871 (Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup>) 株を用いて NASH モデルマウスにおける検討を行った。C57BL/6J マウス (6 週齢オス) に 4 週間高脂肪食を摂取させ、頸静脈より  $1 \times 10^7$  CFU の KT3 株 (n=16) および TW871 株 (n=9) を投与した群と菌非投与群 (n=8) に分け、高脂肪食の摂取を続けた。菌投与 12 週後に 3 群における体重の測定を行った後、屠殺した。その後、肝臓および内臓脂肪を摘出し、各重量の測定を行った。摘出した肝臓では、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色および Masson's-trichrome (MT) 染色により、マウス肝臓組織における脂肪の蓄積、炎症性変化、および線維化の有無について分析した。

### (3) 肝臓および脂肪組織への*S. mutans*の付着の検討

#### 1) 動物実験

*S. mutans* KT3 (Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup>) 株、KT2 (Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>-</sup>) 株、KT4 (Cnm<sup>-</sup>/PA<sup>+</sup>) 株、KT44 (Cnm<sup>-</sup>/PA<sup>-</sup>) 株を、6週齢 C57BL/6J マウスに高脂肪食を4週間給餌後、頸静脈より投与した。菌投与1時間および3時間後に採血し、屠殺後、肝臓、内臓脂肪、および皮下脂肪を摘出した。各臓器を破碎後、Bacitracin 含有 Mitis – Salivarius 寒天培地に播種し、37℃で48時間培養後、培地上のコロニー数を計測した。全ての臓器は重量 (g) で、血液は量 (ml) で換算した。

#### 2) 各供試菌の *cnm* および *pac* の発現量

各供試菌を Brain Heart Infusion 液体培地にて吸光度 550nm で対数増殖期後期まで培養後、全 RNA を回収した。逆転写により合成した cDNA を鋳型として、各供試菌の *cnm* および PA をコードする遺伝子 *pac* の発現量を Real-time Reverse transcription-PCR 法により調べた。

#### 3) 各供試菌の増殖速度

各供試菌を Todd Hewitt 液体培地で 37℃で、12時間培養した後、継代培養し、菌液の濁度を吸光度 550nm で1時間毎に測定した。

### 4. 研究成果

(1) NASH および NAFL 患者における *S. mutans* の検出率はそれぞれ 85.0%と 80.0%で有意差は認められなかった。しかしながら NASH 患者の唾液サンプル中の *S. mutans* の菌数は NAFL 患者と比較して有意に高かった。一方、Cnm および PA を保有する *S. mutans* の割合は NASH 患者において有意に高い値を示した。本研究の結果から、NAFL 患者と比較して NASH 患者から高頻度に Cnm および PA を保有する *S. mutans* が検出されることが明らかとなり、これらの菌株が、NAFL から NASH への病状の増悪化に関与している可能性が示唆された。

(2) 各群における体重および内臓脂肪重量に有意な差は認められなかった。一方で、KT3 株投与群から摘出した肝臓は、非投与群の肝臓と比較して肥大しており、肝臓重量は有意に高い値を示した。また、肝臓組織の HE 染色像では、肝実質における顕著な脂肪の蓄積を認め、KT3 および TW871 投与群の HE 染色像では、炎症性細胞の浸潤が認められた。さらに、MT 染色では、顕著な肝実質および血管周囲に明確な線維化像を認めた。

(3) 全ての菌株が全ての臓器から検出され、そのうち肝臓から検出される菌量が、他の臓器と比較して最も高かった。また菌株別では、KT3 株の菌量がその他の菌と比較して有意に多かった。各菌株の *cnm* 発現量および *pac* 発現量を比較検討したところ、KT3 株の *cnm* 発現量は KT2 株と比較して有意に低く、*pac* 発現量は KT4 株より有意に低かった。また KT3 株の増殖速度は、KT2 株および KT44 株と比較して有意に高いことが明らかとなった。

本研究の結果から、動物モデルにおいて、NASH患者より分離したCnmおよびPAを保有する*S. mutans*が血液中に侵入すると、NASHの病変に類似する病態が生じることが明らかになった。さらに*cnm*発現量および*pac*発現量が低く、増殖能が高い*S. mutans*の方が血中に侵入した場合、より多くの菌が肝臓に侵入し付着することでNASH発症に寄与する可能性が示唆された。今後は、各臓器に到達した *S. mutans*の生物学的変化を比較検討し、さらに詳細なメカニズムを明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Naka Shuhei, Matsuoka Daiki, Goto Kana, Misaki Taro, Nagasawa Yasuyuki, Ito Seigo, Nomura Ryota, Nakano Kazuhiko, Matsumoto-Nakano Michiyo	4. 巻 12
2. 論文標題 Cnm of <i>Streptococcus mutans</i> is important for cell surface structure and membrane permeability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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) 10.3389/fcimb.2022.994014	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 Ryota, Nagasawa Yasuyuki, Misaki Taro, Ito Seigo, Naka Shuhei, Okunaka Mieko, Watanabe Maiko, Tsuzuki Kenzo, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 111
2. 論文標題 Distribution of periodontopathic bacterial species between saliva and tonsils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 719 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-022-00776-8	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中野 聡大, 田畑 佳子, 仲 周平, 仲野 道代
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎患者口腔内から分離した <i>Streptococcus mutans</i> の脂肪酸との結合に関する検討
3. 学会等名 第61回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. TABATA, S. NAKA, M. MATSUMOTO-NAKANO
2. 発表標題 <i>Streptococcus mutans</i> cell surface protein expression profiling in Non-alcoholic Steatohepatitis Patients
3. 学会等名 29th IAPD Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. TABATA, S. NAKANO, S. NAKA, M. MATSUMOTO-NAKANO
2. 発表標題 Association of specific Streptococcus mutans strains with development of non-alcoholic steatohepatitis
3. 学会等名 The 71st Annual Meeting of Japanese Association of Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 S. NAKA, K. TABATA, S. NAKANO, M. MATSUMOTO-NAKANO
2. 発表標題 Streptococcus mutans adhesion to Liver affects Non-alcoholic Steatohepatitis Development
3. 学会等名 102nd General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田畑佳子, 仲 周平, 中野聡大, 仲野道代
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎患者由来Streptococcus mutansの各臓器における分布とその特性に関する検討
3. 学会等名 第62回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中野聡大, 田畑佳子, 仲 周平, 仲野道代
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎発症に関連する鉄存在下でのStreptococcus mutansの性状変化の検討
3. 学会等名 第62回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田畑佳子、仲 周平、仲野道代
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎患者口腔内のStreptococcus mutansのタンパク発現動態の解析
3. 学会等名 第60回日本小児歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田畑 佳子, 仲 周平, 仲野 道代, 殿村 修一
2. 発表標題 Streptococcus mutansコラーゲン結合タンパクの非アルコール性脂肪肝炎発症への関与
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会
4. 発表年 2021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	仲 周平  (Naka Shuhei)  (10589774)	岡山大学・大学病院・講師   (15301)	
研究 分担者	高木 章乃夫  (Takagi Akinobu)  (80359885)	岡山大学・医歯薬学域・教授   (15301)	

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
---------	---------