

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21792067  
 研究課題名（和文） *S. mutans* コラーゲン結合タンパクの循環器疾患における病原性の解析  
 研究課題名（英文） Analyses of pathogenicity of collagen-binding protein of *S. mutans* for cardiovascular diseases  
 研究代表者  
 野村 良太（NOMURA RYOTA）  
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号：90437385

研究成果の概要（和文）：う蝕の主要な原因細菌である *Streptococcus mutans* は感染性心内膜炎の原因菌としても知られている。最近、ブドウ球菌などのコラーゲン結合タンパクと相同性を有する分子量約 120-kDa の Cnm タンパクが発見された。我々はこのタンパクが *S. mutans* の約 10～20% に存在し、口腔内での分離頻度が低いとされる血清型 *f* 型株や *k* 型株に多く存在することを明らかにした。Cnm を有する *S. mutans* は、何らかの原因により露出したコラーゲンを主成分とする組織への結合能を有することが考えられることから、循環器疾患における重要な病原因子の1つである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus mutans* is known as a major pathogen of dental caries and also to cause infective endocarditis. Recently, an approximately 120-kDa Cnm protein with binding properties to type I collagen was identified and we found that Cnm-positive *S. mutans* strains have a prevalence of approximately 10-20%. Furthermore, Cnm-positive strains were predominantly identified among serotype *f* and *k* stains, even though those are considered to be minor serotypes in the oral cavity. Cnm positivity may be an important virulence factor for vascular diseases because of the ability of such strains to bind to exposed collagen tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：*S. mutans*, コラーゲン結合タンパク, 循環器疾患, 血清型

#### 1. 研究開始当初の背景

う蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* は感染性心内膜炎の原因菌としても知られている。これまでに、循環器疾患患者から手術の際、摘出した心臓弁検体や動脈瘤検体が

ら細菌 DNA を抽出し分析したところ、*S. mutans* の細菌 DNA が最も高い頻度で検出されることを明らかにした。一方で、*S. mutans* が循環器疾患において病原性を発揮するメカニズムについてはほとんどわかっていな

い。最近、分子量 120-kDa のコラーゲン結合タンパクである Cnm タンパクが *S. mutans* において同定された。心臓や脳をはじめとする全身の臓器は I 型コラーゲンに富んでいることから、何らかの原因により損傷した循環器組織に Cnm を有する *S. mutans* が付着し病原性に関与する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

### (1) コラーゲン結合遺伝子の分子生物学的解析

これまでに多数の *S. mutans* 臨床分離株を分離し、Cnm タンパクをコードする *cnm* 遺伝子を有する菌株が約 10-20 %であることを明らかにした。一方で、*cnm* 遺伝子と血清型との関連や、*cnm* 遺伝子が *S. mutans* の全ゲノム上のどの位置に挿入されているかなどについては明らかとなっていない。また、Cnm タンパクが I 型コラーゲンへの結合に関与していることを検証するためには、*cnm* 遺伝子を不活化した株が必要である。これらの点について分子生物学的手法を用いて分析する。

### (2) 動物モデルにおける病原性の評価

全身疾患を有する患者において、様々な物理化学的要因により血管内皮の損傷が生じる。その結果、内部のコラーゲン層が露出し、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* が結合し病原性に関与する可能性が考えられた。そこで、血管内皮を損傷し、コラーゲン層が露出する動物モデルを用いて病原性の評価を行う。

### (3) 国内外における *S. mutans* 菌株の比較

これまでに、日本人口腔における *cnm* 遺伝子を有する菌株を中心に研究を行ってきた。

本研究では、フィンランド・ヘルシンキ大学とタイ・マヒドン大学から *S. mutans* 臨床分離株を提供いただき、日本と緒外国におけるコラーゲン結合遺伝子の局在に関して比較を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) コラーゲン結合遺伝子の分子生物学的解析

*cnm* 遺伝子を有する *S. mutans* から抽出したゲノム DNA を用いて、血清型特異プライマーを用いた PCR 法により血清型を決定する。また、*cnm* 遺伝子配列から inverse PCR 法を用いて、*cnm* 遺伝子の上流および下流の遺伝子配列を特定し、*cnm* 遺伝子の存在部位を明らかにする。さらに、*cnm* 遺伝子配列内に抗生物質耐性遺伝子を挿入することにより、*cnm* 遺伝子を不活化した株を作製する。

### (2) 動物モデルにおける病原性の評価

血管内皮が剥離しコラーゲン層が露出する病態モデルである光化学損傷マウスモデルのうち、本研究ではまず中大脳動脈の血管内皮を損傷させる脳出血モデルによる分析を行う。そのモデルに *S. mutans* 菌株を感染させ、出血面積の測定を画像解析により行い、病原性の評価を行う。

### (3) 国内外における *S. mutans* 菌株の比較

国外の *S. mutans* 臨床分離株の分析として、フィンランド・ヘルシンキ大学とタイ・マヒドン大学から約 100 株の *S. mutans* 臨床分離株を提供いただき、ゲノム DNA を抽出する。これらの DNA を用いて、日本人の臨床分離株を用いた分析ですでに確立している *cnm* 遺伝子検出プライマーを用いた PCR 法により、各国の *cnm* 遺伝子の存在の有無および検出頻度の比較を行う。

#### 4. 研究成果

(1) コラーゲン結合遺伝子の分子生物学的解析

*cnm* 遺伝子を有する *S. mutans* 菌株は口腔内では極めて分離頻度の低い血清型 *f* 型および *k* 型（それぞれ口腔内での頻度は 5 %以下）に集中していることが明らかとなった。また、*cnm* 遺伝子は、すでに全ゲノムがわかっており *cnm* 遺伝子を持たない *S. mutans* UA159 株の SMU.1876 遺伝子と SMU.1877 遺伝子の間に挿入されていることがわかった。さらに、*cnm* 遺伝子を不活化した変異株ではコラーゲン結合能が失われたことから、Cnm がコラーゲン結合能を担うことが示された。

(2) 動物モデルにおける病原性の評価

マウス脳出血モデルにおいて、*cnm* 遺伝子保有 *S. mutans* 菌株を感染させた群では、*cnm* 遺伝子を持たない *S. mutans* 菌株を感染させた群や、*cnm* 遺伝子欠失変異株を感染させた群と比較して、有意な脳出血の悪化が認められた。

(3) 国内外における *S. mutans* 菌株の比較

フィンランド、タイのいずれの国からも *cnm* 遺伝子保有 *S. mutans* 株が分離され、その分離頻度は日本における頻度とほぼ同程度であった。また、これらの国で分離された *cnm* 遺伝子保有株は日本と同様に血清型 *f* 型および *k* 型株に集中する傾向が認められた。

#### 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 16 件)

① Nomura R, Nakano K, Mäkelä K, Vaara M,

Salo E, Alaluusua S, Ooshima T. Isolation and characterization of *Streptococcus mitis* from blood of child with osteomyelitis. *Int J Paediatr Dent* (in press, 2011), 査読有.

② Kato Y, Shirai M, Murakami M, Mizusawa T, Hagimoto A, Wada K, Nomura R, Nakano K, Ooshima T, Asai F. Molecular detection of human periodontal pathogens in oral swab specimens from dogs in Japan. *J Vet Dent* (in press, 2011), 査読有.

③ 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 with *P. gingivalis* occurrence. *Oral Dis* (in press, 2011), 査読有.

④ 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.

⑤ 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.

⑥ 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, 査読有.
- ⑦ 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* clinical strains with gene encoding collagen-binding adhesin. *Arch Oral Biol* 55, 34-39, 2010, 査読有.
- ⑧ Nakano K, Nomura R, Matsumoto M, Ooshima T. Cell-surface structures of novel serotype *k* *Streptococcus mutans* strains and correlation to virulence. *J Pharmacol Sci* 113, 120-125, 2010, 査読有.
- ⑨ Naka S, Yamana A, Nakano K, Okawa R, Fujita K, Kojima A, Nemoto H, Nomura R, Matsumoto M, Ooshima T. Distribution of periodontopathic bacterial species in Japanese children with developmental disabilities. *BMC Oral Health* 9, 24, 2009, 査読有.
- ⑩ 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.
- ⑪ 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.
- ⑫ 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.
- ⑬ Miyamoto E, Nakano K, Fujita K, Nomura R, Okawa R, Matsumoto M, Ooshima T. Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva specimens from Japanese subjects. *Arch Oral Biol* 54, 374-379, 2009, 査読有.
- ⑭ 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 human smooth muscle cell proliferation by a periodontal pathogen. *FEBS Lett* 583, 128-134, 2009, 査読有.
- ⑮ 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.
- ⑯ 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 Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Characterization of novel collagen-binding protein of *Streptococcus mutans*. 89th IADR meeting, 2011.3.16, San Diego, USA.
- ② Nakano K, Nomura R, Taniguchi N, Wada K, Ooshima T. Relationship of *Streptococcus mutans* collagen-binding properties with cerebral hemorrhage deterioration. 89th IADR meeting, 2011.3.16, San Diego, USA.
- ③ Nemoto H, Nakano K, Masuda K, Nomura R, Ooshima T. Prevalence of amoxicillin-resistant Streptococci in dental plaque of young Japanese. 89th IADR meeting, 2011.3.16, San Diego, USA.
- ④ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 小児デンタルプラーク中に存在するアモキシシリン耐性口腔細菌種の特定 平成 22 年度日本小児歯科学会秋季大会, 2010.12.2, 郡山.
- ⑤ 小島あゆち, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 感染性心内膜炎予防に対する歯科医師における意識調査 第 29 回日本小児歯科学会近畿地方会, 2010.10.17, 枚方.
- ⑥ Nemoto, Nakano K, Nomura R, Wada K, Ooshima T. Detection of amoxicillin-resistant streptococcal species in dental plaque specimens. 88th IADR meeting, 2010.7.14, Barcelona, Spain.
- ⑦ Nakano K, Wada K, Nomura R, Inaba H, Amano A, Ooshima T. Characterization of Aortic Aneurysm in Patients Harboring *Porphyromonas gingivalis* 88th IADR meeting, 2010.7.14, Barcelona, Spain.
- ⑧ 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 ORCA congress, 2010.7.7, Montpellier, France.
- ⑨ 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, 2010.5.19, 名古屋.
- ⑩ 小島あゆち, 仲野和彦, 野村良太, 松本道代, 大嶋 隆 マウス腸炎モデルにおける *Streptococcus mutans* の病原性の検討 第 48 回日本小児歯科学会, 2010.5.19, 名古屋.
- ⑪ 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, 2010.5.19, 名古屋.
- ⑫ 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, 2009.10.18, 大阪.
- ⑬ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 松本道代, 大嶋 隆 小児プラーク中に存在するアモキシシリン耐性菌の分布に関する

検討 第28回日本小児歯科学会近畿地方会, 2009. 10. 18, 大阪.

- ⑭ 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, 2009. 10. 18, 大阪.
- ⑮ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Kojima A, Naka S, Ooshima T. Molecular analyses of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding properties. 56th ORCA congress, 2009. 7. 1, Budapest, Hungary.
- ⑯ Nakano K, Taniguchi N, Kojima A, Nomura R, Wada K, Ooshima T. Presence of serotype *k* strains of *Streptococcus mutans* strains is a potential risk factor for cerebral hemorrhage. 56th ORCA congress, 2009. 7. 1, Budapest, Hungary.
- ⑰ 宮本えり子, 仲野和彦, 野村良太, 松本道代, 大嶋 隆 唾液サンプルにおける口腔レンサ球菌・歯周病原性細菌の分布の検討 第47回日本小児歯科学会, 2009. 5. 14, 吹田.
- ⑱ 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, 2009. 5. 14, 吹田.
- ⑲ 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, 2009. 5. 14, 吹田.
- ⑳ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 心臓血管系疾患患者の病変部およびデンタルプラーク検体における口腔細菌種の検出 第47回日本小児歯科学会, 2009. 5. 14, 吹田.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野村良太 (NOMURA RYOTA)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：90437385