

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390138

研究課題名(和文) う蝕原因菌による頭蓋内出血の増強のメカニズム解明とバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of cerebral hemorrhage by *S. mutans* and search of biomarkers

研究代表者

梅村 和夫 (umemura, kazuo)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40232912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕原因菌(*S. mutans*)の中で、コラーゲン結合蛋白(CBP)を有している菌が頭蓋内出血を悪化させる可能性を示した。本研究では頭蓋内出血を悪化させるメカニズムを検討した。培養内皮細胞に、CBPをもつTW295株とCBPを欠損させたTW295CNDを暴露しmRNA量の変化を比較した。結果、いずれの群においても、MMP-9の有意な上昇は認められなかった。しかし、TW295群において、ケモカイン(CCL2、CXCL1、CXCL2)の有意な上昇が認められた。従って、*in vivo*頭蓋内出血モデルでみられたMMP-9の発現亢進は、ケモカインの発現上昇による二次的な変化であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that infection with *S. mutans* expressing collagen-binding protein (CBP) further aggravates cerebral haemorrhage in a mouse stroke model, which may result from the activation of matrix metalloprotease-9 (MMP-9). In the present study, we investigated the mechanism of upregulation of MMP-9 production. A transformed mouse brain endothelial cell line, b.End3, was exposed to *S. mutans* (TW295) or TW295CND (a CBP-deficient strain generated by inactivation of gene encoding CBP in TW295), or recombinant Cnm protein (CBP). The expression of MMP-9 mRNA was not changed in both TW295 and TW295CND groups. In contrast, the mRNA expression of chemokines CCL2, CXCL1 and CXCL2 was significantly enhanced by the exposure to TW295 but not TW295CND. Recombinant Cnm protein (CBP) itself also upregulated the expression of the chemokines. Thus, the CBP of *S. mutans* TW295 is important for the augmentation of expression of chemokines that may secondarily result in MMP-9 activation.

研究分野：薬理学

キーワード：口腔細菌 う蝕原因菌 コラーゲン結合蛋白質 頭蓋内出血 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

口腔細菌である、う蝕原因菌が頭蓋内出血のリスクファクタの1つである可能性を示した。この成果は Nature Communications のオンライン版に掲載された (Nat Commun. 2011 Sep 27;2:485. doi: 10.1038/ncomms1491.)。この研究では、う蝕原因菌の中に高病原性菌が存在し、その菌は脳血管内皮傷害部位に集積し、matrix metalloproteinase (MMP)-9 の産生・活性を増強し、血管の細胞外マトリックスを融解し、頭蓋内出血を悪化させる可能性を示した。また、この菌の表面にはコラーゲン結合蛋白 (CBP) が発現していることを見出した。(図1)

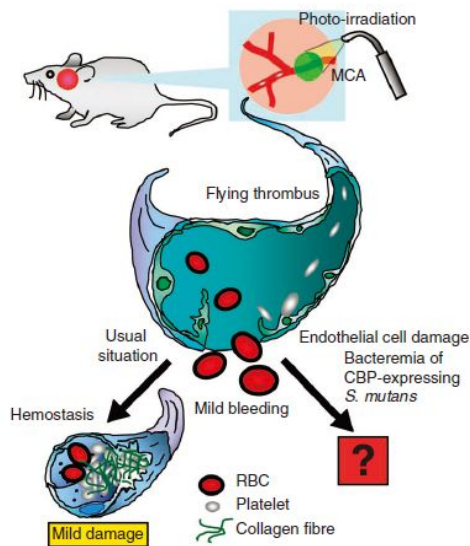


図1: 高病原性う蝕原因菌によるマウス頭蓋内出血の概要

2. 研究の目的

当該研究では、菌およびコラーゲン結合蛋白がどのようなメカニズムで MMP-9 の産生亢進および活性化を行うかを検討する。

3. 研究の方法

培養細胞

細胞には、マウス由来の脳内皮細胞 (b.End3) を用いた。細胞を6ウェルプレートに播種し、Dulbecco's modified Eagle's medium で培養した。約1週間後にコンフルエントになったことを確認した後、滅菌 phosphate-buffered saline で洗浄し、血清フリーの培養液に交換し、実験に用いた。

S. mutans 菌の培養

S. mutans TW295 (serotype k) は抜歯後の歯血症患者から分離した。コラーゲン結合蛋白を欠損する変異株 TW295CND は、遺伝子操作により得た。全ての菌株は brain heart infusion (BHI) broth で培養した。

リアルタイム PCR

トータル RNA をタカラバイオの FastPure RNA Kit を用いて抽出した。cDNA はタカラ

バイオの PrimeScript RT reagent Kit を用いて合成した。プライマー (MMP-9、ケモカイン CCL2 [monocyte chemoattractant protein-1]、機能的に IL-8 と相同である CXCL1/KC および CXCL2/MIP-2) はタカラバイオから購入した。リアルタイム PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System TP850 (Takara Bio) を用いて実施した。

統計解析

データは、mean ± SEM で表示した。統計解析には、unpaired student's t-test または one-way analysis of variance (ANOVA) を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

4. 研究成果

培養細胞に TW295 または TW295CND を暴露してから一定時間後の MMP-9 mRNA 発現量の変化を図2に示す。TW295 または TW295CND を暴露しても MMP-9 mRNA の有意な変化は認められなかった。

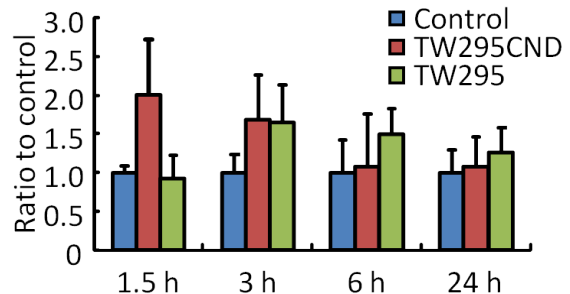


図2. MMP-9 mRNA 発現の変化。発現量はコントロールを1とした相対比で表した。各群 n = 3, mean ± SEM.

培養細胞に TW295 または TW295CND を暴露してから一定時間後の CCL2 mRNA 発現量の変化を図3に示す。暴露から6時間後、TW295 群において、CCL2 mRNA 発現の有意な上昇がみとめられた。24時間後では、TW295 群に加えて、TW295CND 群においても、CCL2 mRNA 発現の有意な上昇がみとめられた。

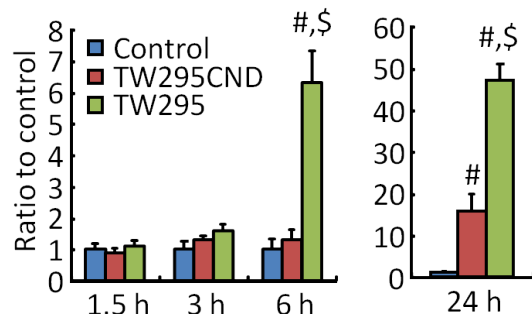


図3. CCL2 mRNA 発現の変化。発現量はコントロールを1とした相対比で表した。各群 n = 3, mean ± SEM. # $p < 0.05$ vs control, \$ $p < 0.05$ vs TW295CND.

培養細胞に TW295 または TW295CND を暴露してから一定時間後の CXCL1 mRNA 発現量の変化を図 4 に示す。暴露から 3 および 6 時間後、TW295 群において、CXCL1 mRNA 発現の有意な上昇がみとめられた。24 時間後では、TW295 群に加えて、TW295CND 群においても、CXCL1 mRNA 発現の有意な上昇がみとめられた。

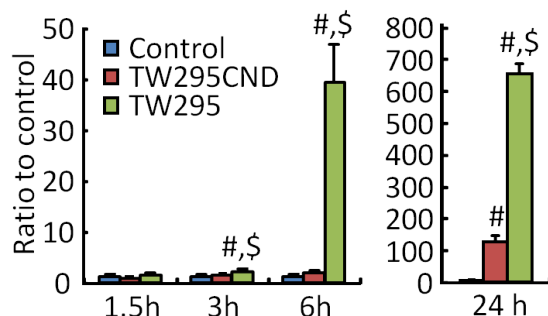


図4. CXCL1 mRNA発現の変化. 発現量はコントロールを1とした相対比で表した. 各群n = 3, mean ± SEM. #p < 0.05 vs control, \$p < 0.05 vs TW295CND.

培養細胞に TW295 または TW295CND を暴露してから一定時間後の CXCL2 mRNA 発現量の変化を図 5 に示す。CXCL1 mRNA の発現と同様、暴露から 3 および 6 時間後、TW295 群において、CXCL2 mRNA 発現の有意な上昇がみとめられた。24 時間後では、TW295 群に加えて、TW295CND 群においても、CXCL2 mRNA 発現の有意な上昇がみとめられた。

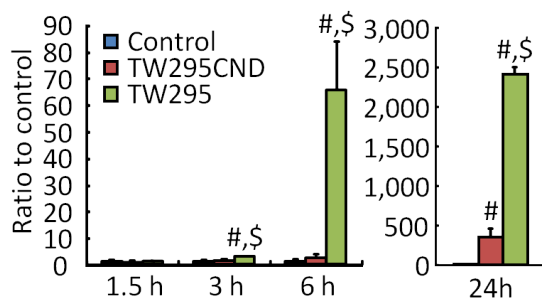
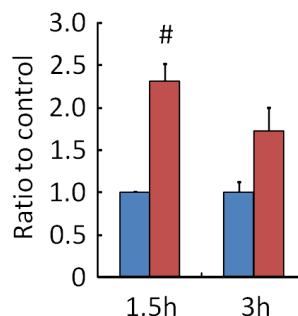


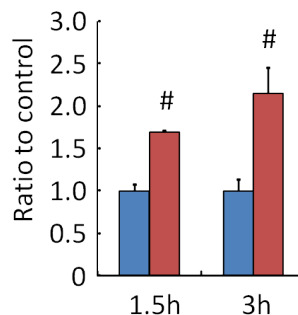
図5. CXCL2 mRNA発現の変化. 発現量はコントロールを1とした相対比で表した. 各群n = 3, mean ± SEM. #p < 0.05 vs control, \$p < 0.05 vs TW295CND.

培養細胞に recombinant Cnm protein を暴露してから一定時間後のケモカイン (CCL2、CXCL1、CXCL2) の mRNA 発現量の変化を図 6 に示す。CCL2 mRNA は暴露から 1.5 時間後、recombinant Cnm 暴露群において、有意な上昇がみとめられた (図 6A)。CXCL1 mRNA は暴露から 1.5 および 3 時間後、recombinant Cnm 暴露群において、有意な上昇がみとめられた (図 6B)。CXCL2 mRNA は暴露から 1.5 時間後、recombinant Cnm 暴露群において、有意な上昇がみとめられた (図 6C)。

A. CCL2



B. CXCL1



C. CXCL2

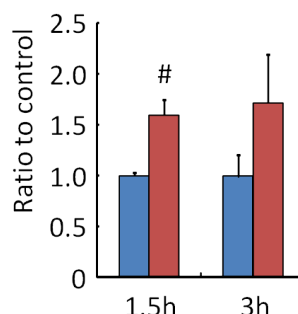


図6. Recombinant Cnm protein暴露時のケモカイン mRNA 発現の変化. 発現量は vehicle を 1 とした相対比で表した. 青カラムは vehicle 群、赤カラムは recombinant Cnm 群を示す. 各群 n = 3, mean ± SEM. #p < 0.05 vs vehicle.

以上のことから、コラーゲン結合タンパクを有する *S. mutans* 菌 TW295 株やコラーゲン結合タンパクのみでもケモカインの発現が上昇することが明らかとなった。菌の暴露によって MMP-9 の発現に有意な変化が認められなかったことから、in vivo 頭蓋内出血モデルでみられた MMP-9 の発現亢進は、ケモカインの上昇による二次的な変化である可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

研究者番号： 80397380

1 . Yuji Matsumoto, Kazuya Hokamura, Ryota Nomura, Kazuhiko Nakano, Takashi Ooshima, Kazuo Umemura. Upregulation of chemokine expression by *Streptococcus mutans* bearing collagen-binding protein in cultured brain endothelial cells. (コラーゲン結合タンパクを有する *Streptococcus mutans* 暴露による培養脳血管内皮におけるケモカインの発現増強)
第 87 回日本薬理学会年会 .2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日 .東北大学百周年記念会館川内萩ホール、仙台国際センター (宮城県・仙台市).

2 . Yuji Matsumoto, Kazuya Hokamura, Kazuo Umemura. Upregulation of chemokine expression by *Streptococcus mutans* bearing collagen-binding protein in cultured brain endothelial cells. (コラーゲン結合タンパクを有する *Streptococcus mutans* 暴露による培養脳血管内皮におけるケモカインの発現増強)
第 88 回日本薬理学会年会 .2015 年 3 月 18 日 ~ 20 日 .名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

〔 図書 〕 (計 0 件)

〔 産業財産権 〕

○ 出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○ 取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔 その他 〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究協力者

松本 祐直 (MATSUMOTO Yuji)
浜松医科大学 医学部・助教