

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390461

研究課題名(和文) 口腔細菌が誘発する炎症性腸炎悪化における病原メカニズムの解明と高リスク株の特定

研究課題名(英文) Pathogenic mechanism for aggravation of inflammatory bowel diseases caused by oral bacteria and specification of highly virulent strains

研究代表者

仲野 和彦 (Nakano, Kazuhiko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00379083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* は、血液中に侵入し病原性を示すことがあると知られている。本研究では、マウス腸炎モデルを用いた分析等によって *S. mutans* の炎症性腸疾患に及ぼす影響を検討した結果、*S. mutans* は何らかの理由で血液中に侵入すると、菌体表層のコラーゲン結合タンパクにより肝臓組織に局在し、各種サイトカインの分泌を誘導することで、腸炎の悪化が生じることが示された。また、*Streptococcus sanguinis* のような他の口腔レンサ球菌でも同様に腸炎悪化を惹起する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：*Streptococcus mutans*, a pathogen of dental caries, is known to cause several systemic diseases when invading the bloodstream. In this study, analyses of *S. mutans* causing inflammatory bowel diseases in a mouse model revealed that some strains also aggravated colitis. Investigation of that mechanism of aggravation revealed that the strains were localized in hepatic tissue, which secreted several cytokines related to aggravation, while binding was associated with the cell surface collagen-binding protein of strains that had invaded the bloodstream. In addition, other oral streptococcal species including *Streptococcus sanguinis* were also shown to aggravate colitis.

研究分野：小児歯科学

キーワード：*Streptococcus mutans* 炎症性腸炎 マウスモデル 血液 肝臓 サイトカイン *Streptococcus sanguinis* 口腔レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

う蝕の主要な病原細菌として知られている *Streptococcus mutans* は、抜歯などの侵襲的な歯科処置によって血液中に侵入すると、菌血症および感染性心内膜炎を引き起こすことがあるとされている。これまでに、コラーゲン結合タンパクを保有する *S. mutans* 菌株が、マウス中大脳動脈を損傷させた脳出血モデルにおいて、出血を悪化させるメカニズムの一端が示された。その研究の中で、屠殺後にマウス腹腔内を観察すると、コラーゲン結合タンパクを保有する *S. mutans* 菌株を頸静脈より感染させたマウスの多くに、腸管の異常出血を呈していた。このことから、*S. mutans* 菌株と炎症性腸疾患との関連について研究を開始するに至った。

炎症性腸疾患は主として消化管に原因不明の炎症をおこす慢性かつ難治性の腸疾患の総称で、クローン病と潰瘍性腸疾患とに分類される。臨床症状としては、血便、粘液便や腹痛などを特徴とし、寛解と再燃を慢性的に繰り返すことで知られている。根本的な治療法は未だ確立されておらず、厚生労働省によって難病に指定されている。本疾患の原因は、局所的な免疫応答と環境因子の相互作用によるものと考えられているが、その詳細なメカニズムについては依然不明である。最近では、感受性の高まった宿主の粘膜細胞が、正常な腸内細菌に対して免疫応答することが発症の一因になっている可能性も示唆されている。一方で、抗生物質の服用によって罹患患者の臨床症状が改善することのあることから、本疾患と細菌との関連も否定できない。これまでは、主に腸内細菌に焦点が当てられ、腸管の内腔側からの関与が検討されており、口腔細菌と炎症性腸疾患との関連についての検討は行われてこなかった。

2. 研究の目的

S. mutans は、菌体表層の血清型特異多糖であるラムノースポリマーからなる主骨格にグルコースが側鎖として結合する構造の違いによって、*c/e/f* 型に分類される。一方で血清型 *k* は、ラムノースポリマーからなる主骨格は存在するものの、グルコース側鎖を欠いた構造をとっている。これまでの研究により、血清型 *k* を有する菌株は、血液中で多型核白血球による貪食作用に抵抗性を示すことから、何らかの原因で血中に侵入した際に長期間生存し、病原性を発揮しやすいと考えられている。

S. mutans の菌体表層には、その病原性に関与する様々なタンパクが発現しているが、その一つとして、I 型コラーゲンに対する結合能を有する分子量約 120kDa のコラーゲン結合タンパク (Cnm) の存在が明らかにされている。これまでの研究により、Cnm タンパクは、*S. mutans* の血管内皮細胞への付着および侵入に関与することが知られている。

このことから、*S. mutans* の中でも血清型 *k*

に分類され、Cnm タンパクを発現している株のうち、抜歯後菌血症患者の血液より分離された TW295 株を主に用いて検討することにした。本研究では、主にこの菌株による腸炎悪化に対する影響とそのメカニズムを追究することにした。

近年、*S. mutans* の菌体表層にある新規コラーゲン結合タンパクである Cbm が同定された。Cbm 陽性菌株は、Cnm 陽性菌株よりも有意に高いコラーゲン結合能を有していることから、感染性心内膜炎の主要な病原因子の 1 つであると考えられている。そこで、本研究においても、新規コラーゲン結合タンパク Cbm が腸炎悪化に及ぼす影響についても検討を加えることとした。さらに、*S. mutans* 以外の主要な口腔レンサ球菌についても腸炎悪化への関与の可能性について分析を加えることとした。

3. 研究の方法

(1) マウス腸炎モデルにおける検討

7 週齢の C57BL/6J マウスに 2.5% デキストラン硫酸 (Dextran Sulfate Sodium; DSS) 溶液を飲料水として実施期間中自由摂取させ軽度の腸炎を誘発させた後、DSS 摂取 4 日目に、供試菌を頸静脈より 1×10^7 集落形成単位 (Colony Forming Unit; CFU) ほど感染させた。評価方法として、DSS 摂取時より毎日マウスの体重を測定すると同時に、下痢および血便の状態を 0 ~ 3 でスコア化 (Disease Activity Index; DAI) し、菌感染後 11 日目までの生存率を各群で比較した。また、経口感染モデルとして DSS 摂取 4 日目に供試菌を、経口感染用ゾンデを用いて胃腔に感染させ、同様の方法で評価した。

(2) 腸炎悪化のメカニズムの解析

① TW295 株の各種臓器における局在

マウス腸炎モデルにおいて、各種臓器における経時的な供試菌の局在を調べるため、 1×10^7 CFU の TW295 株を頸静脈より感染させ、3 時間後に大腸、小腸、肝臓、肺を摘出し、その組織を破碎し、段階希釈したものを、*S. mutans* の選択培地である Mitis-salivarius-bacitracin (MSB) 寒天培地に播種し、37°C で 48 時間培養した後、コロニー数を計測した。

② ヒト肝臓癌培養細胞への付着能の評価

細胞数が 1×10^5 個になるように調整したヒト肝臓癌培養細胞 (Human hepatoma cells; Huh-7) をプレートに分注し、抗生物質を含まない専用培地で 24 時間培養後、 1×10^8 CFU 供試菌を感染し 30 分間反応させた。その後、PBS で 3 回洗浄し、1.0ml の滅菌水を加えて細胞を破碎した。この細胞破碎物を段階希釈したものを MSB 寒天培地に播種し、37°C で 48 時間培養した後、コロニー数を計測し、総細胞数あたりに付着した菌数を求めた。

(3) 腸炎患者口腔検体における検討

クローン病または潰瘍性腸疾患の診断を受けている患者から唾液の提供を受け、MSB 寒天培地を用いて *S. mutans* を分離した。分離された *S. mutans* 株を培養し、通常にてゲノム DNA を抽出した後、各種血清型特異プライマーを用いた PCR 法にて血清型の確認を行った。また、Cnm タンパクをコードする *cnm* 遺伝子特異プライマーを用いてその存在を検討した。

(4) 新規コラーゲン結合タンパク Cbm の検討

腸炎マウスモデルに、血清型 *k* に分類され、*cbm* 遺伝子を保有し、Cbm タンパクを発現しているフィンランド人の口腔より分離した *S. mutans* SA31 株および SA31 株の Cbm タンパクをコードする *cbm* 遺伝子を不活化した変異株である SA31CBD 株およびその相補株である SA31comp 株をそれぞれ 1×10^7 CFU 頸静脈より感染させ、病態の変化を評価した。

(5) 他の主要な口腔レンサ球菌による腸炎悪化の検討

代表的な口腔レンサ球菌 (*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus gordonii*、*Streptococcus mitis*、*Streptococcus salivarius*、*Streptococcus sobrinus*、*Streptococcus oralis*) の標準株に対して、多型核白血球による食食能の評価およびヒト肝臓培養細胞 Huh-7 への細胞付着能の評価を行い、病原性を評価した。また、それらのうち、病原性の高い菌種に関して、菌血症、敗血症または感染性心内膜炎患者の血液から分離された臨床分離株についてもその病原性を評価し、マウス腸炎モデルにおいてその影響を検討した。

4. 研究成果

(1) *S. mutans* TW295 株によるマウス腸炎モデルの悪化

菌を感染させず DSS のみを摂取させた群 (コントロール群) においては、わずかに腸炎の悪化が認められる程度であった。また、*S. mutans* 標準株として用いた日本人小児の口腔より分離した MT8148 株を頸静脈より感染させた群においても、コントロール群と比較して、体重減少、DAI、生存率に関して有意な差は認められなかった。一方で、TW295 株感染群では、コントロール群および MT8148 株感染群と比較して、体重減少、有意な DAI の増加および有意な生存率の低下が認められた。また、10 日目に屠殺したマウスの腸の組織切片を観察したところ、粘膜上皮だけでなく、粘膜下層への炎症性細胞の浸潤が広範囲で認められた。また、頸静脈からの感染菌量による影響について検討したところ、 1×10^5 CFU 以上の感染群で、有意な腸炎の悪化が認められた。さらに、感染経路による影響を検討したところ、 1×10^7 CFU あるいは 1×10^8 CFU の TW295 株を経口感染さ

せても、腸炎の悪化は認められなかった。

(2) 腸炎悪化のメカニズムの解析

マウス腸炎モデルにおいて、菌感染後、大腸、小腸および肺からは供試菌は分離されなかった一方で、肝臓からは最も多くの供試菌が分離された。また、その肝臓組織サンプルを透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、TW295 株はクッパー細胞だけでなく、肝臓実質細胞に取り込まれていることがわかった。

次に、ヒト肝臓培養細胞 Huh-7 を用いて、供試菌の肝臓への付着能を分析したところ、TW295 株の付着菌数は、MT8148 株よりも有意に高い値を示した。また、TW295 株の Cnm タンパクをコードする *cnm* 遺伝子を不活化した変異株である TW295CND 株の Huh-7 への付着菌数は TW295 株よりも有意に低い値を示し、MT8148 株における付着菌数と同程度であった。

また、腸炎マウスモデルにおいて、 1×10^7 CFU の TW295CND 株を頸静脈より感染させたところ、TW295 株感染群と比較して有意に低い DAI 値および有意に高い生存率を示し、腸炎の悪化は緩和された。

(3) 腸炎患者口腔検体における検討

腸炎患者から分離された *S. mutans* の血清型を調べると、健常者と比べて *c* 型はほぼ同程度であるが、*e* 型が極めて少なく、*f* 型および *k* 型は高い割合を示した。また、TW295 株のような白血球食食能が低く、Cnm タンパクを保有するような *cnm* 陽性かつ血清型が *k* または *f* の *S. mutans* の保菌率は、健常群では 3.5% であるのに対し、腸炎患者群では 12% と増加を示した。

また、腸炎マウスモデルにおいて、腸炎患者より分離した *S. mutans* のうち、Cnm タンパクを保有し、白血球食食能の低い株 1×10^7 CFU を頸静脈より感染させたところ、コントロール群と比較して、DAI の増加および生存率の低下が認められ、腸炎の悪化を示した。

(4) 新規コラーゲン結合タンパク Cbm の検討

マウス腸炎モデルにおいて、SA31 株感染群では、腸炎の悪化が生じ、DAI の増加および生存率の低下が認められた。一方で、SA31CBD 株感染群では、DAI 値の有意な低下および生存率の有意な増加が認められ、腸炎の緩和を示した一方、SA31comp 株感染群では、生存率の有意な減少が認められ、腸炎は悪化した。

(5) 他の主要な口腔レンサ球菌による腸炎悪化の検討

代表的な口腔レンサ球菌の標準株のうち、*S. sanguinis* ATCC 10556 株が最も高い病原性を示した。そこで、*S. sanguinis* の臨床分離株 18 株のうち Huh-7 への細胞付着能の評価を行い、最も高い値を示した TW289 株

(敗血症患者の血液から分離) および最も低い値を示した TW611 株 (感染性心内膜炎患者の血液から分離) を用いてマウス腸炎の悪化を検討した。その結果、TW289 株感染群では、腸炎の悪化が認められ、コントロール群と比較して生存率の有意な低下が認められた。一方、TW611 株感染群では、腸炎の軽度の悪化は認められたが、コントロールと比較して DAI および生存率に有意な差は認められなかった。

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 9 件)

1. Kojima A, Nakano K, Wada K, Takahashi H, Katayama K, Yoneda M, Higurashi T, Nomura R, Hokamura K, Muranaka Y, Matsushashi N, Umemura K, Kamisaki Y, Nakajima A, Ooshima T. Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Sci Rep*. 2012;2:332.
2. Nomura R, Nakano K, Naka S, Nemoto H, Masuda K, Lapidirattanakul J, Alaluuusua S, Matsumoto M, Kawabata S, Ooshima T. Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*. 2012 Aug;27(4):308-23
3. Nomura R, Naka S, Nemoto H, Inagaki S, Taniguchi K, Ooshima T, Nakano K. Potential involvement of collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* in infective endocarditis. *Oral Dis*. 2013 May;19(4):387-93
4. Lapidirattanakul J, Nomura R, Nemoto H, Naka S, Ooshima T, Nakano K. Multilocus sequence typing of *Streptococcus mutans* strains with the cbm gene encoding a novel collagen-binding protein. *Arch Oral Biol*. 2013 Aug;58(8):989-96
5. Nomura R, Naka S, Nemoto H, Otsugu M, Nakamura S, Ooshima T, Nakano K. Potential high virulence for infective endocarditis in *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins but lacking PA expression. *Arch Oral Biol*. 2013 Nov;58(11):1627-34
6. Nomura R, Otsugu M, Naka S, Teramoto N, Kojima A, Muranaka Y, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T, Nakano K. Contribution of the interaction of *Streptococcus mutans* serotype k strains with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis. *Infect Immun*. 2014 Dec;82(12):5223-34
7. 小島あゆち *Streptococcus mutans* が誘発する腸炎悪化メカニズムの解析 小児歯誌 2014;52:471-479.
8. 野村良太 *Streptococcus mutans* における新規コラーゲン結合タンパクの同定と感染性心内膜炎に対する病原メカニズムの解析 小児歯誌 2014;52:471-479.
9. Lapidirattanakul J, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Srisatjaluk R, Ooshima T, Nakano K. Variation of expression defects in cell surface 190-kDa protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Int J Med Microbiol*. (in press)

[学会発表] (計 17 件)

1. 野村良太, 仲野和彦, 仲 周平, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* の引き起こす脳出血増悪における 190kDa Protein antigen (PA) の役割 第 50 回日本小児歯科学会記念大会, 2012. 5. 12, 東京
2. 小島あゆち, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* の引き起こす腸炎悪化における IFN- γ の役割に対する分析 第 50 回日本小児歯科学会記念大会, 2012. 5. 12, 東京
3. 野村良太, 仲 周平, 仲野和彦, 大嶋 隆 コラーゲン結合能を有する *Streptococcus mutans* 菌株の分布と血管内皮細胞への付着侵入能の解析 第 22 回レンサ球菌研究会, 2012. 6. 8, 吹田
4. Nomura R, Nakano K, Naka S, Ooshima T. Contribution of Protein antigen to *Streptococcus mutans*-induced cerebral hemorrhage deterioration. 90th IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2012. 6. 20, Iguacu falls, Brazil.
5. Nakano K. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its association with systemic virulence. - Impact of Oral Health on the Systemic Health; Lessons from Human and Animal Studies - 60th JADR (Japanese Association of Dental Research) Meeting, 2012. 12. 15, Niigata, Japan
6. Nomura R, Nakano K. Cell surface proteins of *Streptococcus mutans* contribute to infective endocarditis. 60th JADR (Japanese Association for Dental Research) Meeting, 2012. 12. 15, Niigata, Japan.
7. Kojima A, Nomura R, Ooshima T, Nakano K. Aggravation of inflammatory bowel diseases by *Streptococcus sanguinis*. 91st IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2013. 3. 20, Seattle, USA.
8. 野村良太 *Streptococcus mutans* における新規コラーゲン結合タンパクの同定と感染性心内膜炎に対する病原性の解析

- 平成 24 年度日本小児歯科学会学術賞受賞講演 2013. 5. 23 岐阜
9. Nomura R, Otsugu M, Nakano K, Ooshima T. Involvement of cell surface protein expression patterns in interaction of *Streptococcus mutans* with vein endothelial cells. 60th ORCA (European Organization of Caries Research) Congress, 2013. 7. 3, Liverpool, UK.
 10. 仲野和彦 口腔細菌による歯科疾患と全身疾患 シンポジウム3「全身性疾患の危険因子としての口腔内常在細菌」第54回日本人間ドック学会, 2013. 8. 30 浜松
 11. 野村良太 小児歯科学研究最前線 「齶蝕原性細菌の関与する全身疾患」 第32回日本小児歯科学会中四国地方会大会 2013. 11. 24 岡山
 12. Nomura R, Nakano K. Collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* and its association with systemic diseases. Kyungpook-Osaka University International Symposium, 2014. 5. 16, Daegu Korea.
 13. 大継將寿, 野村良太, 仲野和彦 *Streptococcus mutans* とフィブリノーゲンとの反応による感染性心内膜炎メカニズムの解析 第52回日本小児歯科学会大会, 2014. 5. 17, 東京
 14. Nomura R, Otsugu M, Nakano K, Ooshima T. Serotype *k* *Streptococcus mutans* strains with Cbm protein contribute to pathogenicity of infective endocarditis. The 61st Congress of the European Organization for Caries Research, 2014. 7. 4, Germany.
 15. Otsugu M, Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Contribution of cell surface proteins of *Streptococcus mutans* in interaction with fibrinogen. The 61st Congress of the European Organization for Caries Research, 2014. 7. 4, Germany.
 16. 大継將寿, 野村良太, 仲野和彦 *Streptococcus mutans* のコラーゲン結合タンパクに対するラット感染性心内膜炎モデルを用いた病原性の評価 第33回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2014. 10. 5, 大阪
 17. Otsugu M, Nomura R, Nakano K. *Streptococcus mutans* strains with fibrinogen-binding activity contribute to infective endocarditis. 62nd Conference of Japanese Association of Dental Research. 2014. 12. 3, Osaka, Japan.

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/%7Epedo/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・教授

研究者番号：00379083

(2) 研究分担者

野村 良太 (NOMURA, Ryota)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90437385

根本 浩利 (NEMOTO, Hiroto)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：80527226