

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14573

研究課題名(和文) 口腔内細菌に起因する出血性脳卒中の病態理解とモデル動物の作成

研究課題名(英文) Study to understand mechanism of hemorrhagic stroke induced by oral bacteria

研究代表者

猪原 匡史 (IHARA, MASAFUMI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長

研究者番号：00372590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン接着性タンパク質Cnmを産生する口腔内の齧蝕原性細菌(ミュータンス菌)と脳内出血との相関を検討した。急性期に頭部MRI画像で評価し得た脳卒中患者165名の検討で、Cnm陽性齧蝕原性細菌保有者は、有意に深部の微小出血が多いことが明らかとなった。現在、Cnm陽性齧蝕原性細菌保有者における脳微小出血の増加を縦断的に観察する多施設共同研究が計画されており、将来の脳出血予防に向けた取り組みを加速する予定である。

研究成果の概要(英文)：We investigated possible associations between collagen-binding protein Cnm-positive Streptococcus mutans and cerebral hemorrhage. We enrolled 165 stroke patients who were assessed with brain MRI in the acute phase and found that those who had Cnm-positive Streptococcus mutans in the oral cavity had significantly greater number of deep microbleeds in the brain. We are planning a prospective clinical research which will longitudinally evaluate possible increase of cerebral microbleeds to promote a new strategy of stroke prevention.

研究分野：臨床神経学

キーワード：口腔内細菌 ミュータンス菌 脳出血

1. 研究開始当初の背景

脳卒中の2大病型である(非心原性)脳梗塞と脳出血の背景病理はいずれも脳血管の動脈硬化性病変であるが、高血圧などの生活習慣病を背景にいずれの病型を発症するかは予測困難である。しかし、申請者らの予備研究で、脳出血患者では口腔内の *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) が産生するコラーゲン結合タンパク質の陽性率が脳梗塞患者に比べて有意に高いことが判明しており、口腔内細菌が脳卒中病型を規定する一つの因子である可能性が高い (Tonomura S, et al. *Sci Rep* 2016)。また、検診コホートを対象とした京府立医科大学との共同研究により、コラーゲン結合タンパク質を産生する *S. mutans* の口腔内保有者は、脳出血の前駆となる微小出血が MRI 上陽性となる確率が 14.4 倍に達することが明らかとなり (Miyatani F, et al. *Oral Dis* 2015)、この細菌が脳卒中に果たす重要な役割が注目されている。

昨今、口腔内・皮膚・腸管内・腔内などヒトを宿主とする細菌の遺伝子情報を解析し、常在菌の多様性や疾病への関与を分析・集積するメタゲノム解析が盛んとなり、臓器毎、個人毎に細菌叢に大きな相違があることが明らかとなっている (The Human Microbiome Project Consortium. *Nature* 2012)。また、歯周病には、単体の細菌のみではなく疾患特異的な細菌叢が関与していることも報告されており (Belda-Ferre P, et al. *ISME Journal* 2012)、かねてより指摘されてきた歯周病が脳卒中の発症リスクを 3 倍に高める (Beck JD, et al. *J Periodontol* 1996) 背景機序が次第に明らかにされつつある。よって、脳卒中患者の口腔内細菌のメタゲノム解析を行うことで疾患特異的な細菌叢の特徴を明らかにし、動脈硬化の進行や脳卒中発症に関与するメカニズムを解明することは、脳卒中に罹患しやすいサブグループを抽出し的確に治療を施す Precision Medicine への第一歩となる。

2. 研究の目的

脳卒中は寝たきりや認知症の主要な要因であり、その予防が健康寿命延伸の根幹をなす。昨今、脳卒中の原因として口腔内細菌叢が注目を集めている。う蝕の主要な病原細菌である *S. mutans* の菌体表層のコラーゲン結合タンパク (Cnm タンパク) が、脳出血の悪化に関与することが明らかとなった。申請者らの脳卒中患者 100 例の調査研究により Cnm 陽性例では微小出血数が有意に多いことも判明した。本研究では、上記 100 例分の唾液・デンタルプラークの保存検体を使用し、特にの出血性脳卒中への Cnm 陽性 *S. mutans* の関与を明らかにする。本研究は脳卒中に罹患しやすい潜在患者を抽出する方法を確立し、Precision Medicine としての脳卒中先制医療の確立を行うことが主要な目的である。

3. 研究の方法

【対象患者】国立循環器病研究センターに入院した 200 名の急性期脳卒中患者。脳梗塞では MRI 画像、脳出血では頭部 CT で病巣が確認できた症例とする。

【具体的な方法】

(1)臨床検体の収集:

うがい等にて食渣を除いた後、スワブにより唾液を採取し検体を 4℃ で保存する (保存済み)。この検体を用いて、細菌培養、PCR の手法を用いて Cnm 陽性 *S. mutans* の検出を行う。

(2)口腔内細菌種と画像所見との相関解析:

発症 7 日目時点での頭部 CT・MRI 画像を以下の方法で評価する。

T2* 画像により BOMBS スコア (Cordonnier et al. *Stroke* 2009) を定量評価する。FLAIR 画像における Fazekas スコアを用いて虚血性白質病変の程度を半定量評価する。これらの定量値を規定する可能性のある口腔内細菌種を多変量解析で同定する。さらに、脳梗塞と脳出血の違いを規定する口腔内細菌種および細菌叢を同定する。

(3)口腔内細菌と神経学的所見との相関解析:

脳卒中の機能予後を退院時と発症 3 カ月後に以下の方法で評価する。

退院時: NIHSS による脳卒中の重症度を評価する。

3 ヶ月後: 修正 Rankin スケールによる脳卒中の予後評価を行う。

(4)脳アミロイド血管症モデル Tg-SwDI マウスを用いた Cnm タンパクチャレンジテスト:

Tg-SwDI マウスは 12 ヶ月齢までは通常微小出血を起こさない。ただし、申請者らの研究で、低灌流侵襲を加えることでアミロイドの沈着が加速し微小出血を起こすことが判明している (Okamoto Y, et al. *Acta Neuropathologica* 2012)。このように Tg-SwDI マウスに微小出血を誘導するには何らかの外的侵襲が必要と考えられることから、その外的因子として本研究では Cnm タンパク質を想定する 1×10^5 個の Cnm 陽性 *S. mutans* をマウスの尾静脈より 3 日間連続投与し、投与後 1, 2, 3, 4 週後の脳組織 (各群 5 匹) の経時的変化を観察する。コントロールとして溶媒投与群を同数準備する。脳組織における微小出血の観察は HE 染色に加え、鉄染色として Perl-Stieda 染色を行う。さらにアミロイドの沈着 (脳アミロイド血管症の重症度) の程度を、6E10 抗体によるアミロイド免疫染色により評価する。

4. 研究成果

(1-3) 前向きコホート研究に登録した 202 人のうち、脳血管障害の急性期に 3 tesla MRI を撮像した 165 名を対象とした。T2*強調画

像で評価した微小脳出血の分布により深部/脳表/混合の3群に分け、「無」群を含む4群間のCnm陽性*S. mutans*保有率の違いをANOVA解析で検討した。31名(18.8%)にCnm陽性*S. mutans*を検出した。Cnm陽性*S. mutans*の保有率は深部群16名(44%)、脳表群0名(9%)、混合群9名(25%)、無群6名(7.3%)と有意差がみられた($p < 0.001$)。Cnm陽性*S. mutans*の保有は深部微小出血の存在と関連した。

また、Cnm陽性*S. mutans*保有者の脳出血は非保有者と比較して脳出血の容積が小さいことが明らかとなり、これまで「高血圧性」脳出血と称していた疾患群に亜型が存在することが示唆された。それにもかかわらず、6か月後の修正ランキンスケールで評価される予後は両群で同程度であることから、Cnm陽性*S. mutans*保有者は脳出血以外の要因で予後が不良となる可能性があり、Cnm陽性*S. mutans*の全身への影響、すなわちこれまで報告されている腎障害やNASHへの関与が背景になるのか、検証が必要である。

以上の結果は、脳微小出血の背景疾患として、高血圧等の生活習慣病のみならず、口腔内細菌という未知の環境要因が関与することを強く示唆している。さらに、コラーゲン接着因子を発現する特定の細菌が脳微小出血と関連することは、今後脳出血の予防戦略を考える上で新たな標的が明らかとなったことを意味している。

(4) Tg-SwDIマウスへのチャレンジテストを行ったが、 1×10^5 個のCnm陽性*S. mutans*の投与のみでは、微小出血の誘導は観察されなかった。菌体量の増量やその他の環境要因の調整を行って、アミロイド血管症による微小出血の誘導が可能か検証する必要がある。しかし、我々の臨床データでは、Cnm陽性*S. mutans*の深部微小出血への関連は見出されるも、CAAに基づく微小出血への関連は認めず、Cnm陽性*S. mutans*による部位特異的な微小出血への関与が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Watanabe I, Kuriyama N, Miyatani F, Nomura R, Naka S, Nakano K, Ihara M, Iwai K, Matsui D, Ozaki E, Koyama T, Nishigaki M, Yamamoto T, Tamura A, Mizuno T, Akazawa K, Takada A, Takeda K, Yamada K, Nakagawa M, Tanaka T, Kanamura N, Friedland RP, Watanabe Y. Oral Cnm-positive *Streptococcus Mutans* Expressing Collagen Binding Activity is a Risk Factor for Cerebral Microbleeds and Cognitive Impairment. *Sci Rep* 2016; 6: 38561. doi: 10.1038/srep38561.

2. Tonomura S, Ihara M, Kawano T, Tanaka T, Okuno Y, Saito S, Friedland RP, Kuriyama N, Nomura R, Watanabe Y, Nakano K, Toyoda K, Nagatsuka K. Intracerebral hemorrhage and deep microbleeds associated with cnm-positive *Streptococcus mutans*; a hospital cohort study. *Sci Rep* 2016;6:20074. doi: 10.1038/srep20074.
3. 殿村修一, 仲野和彦, 猪原匡史. う蝕原因菌と脳出血の関連 - 脳口関連 -. 日本歯科論評 2016; 76(5): 14-15.

〔学会発表〕(計4件)

1. Ihara M. Microbes and vascular disease. Invited lecture in Pre-Conference of AAIC: Vascular Factors In Dementia and Neurodegeneration 2017 (London). Jul 13, 2017
2. Ihara M. Vascular Dementia. Invited lecture in Pre-Conference Symposium II: Bridge Over Troubled Water: Issues in Translational Stroke Research. International Stroke Conference (Houston). Feb 21, 2017.
3. Ihara M. Dental microbes and stroke/dementia. Brain Ageing and Dementia in LIMICS 2016 (Nairobi). Dec 8, 2016.
4. Ihara M, Tonomura S, Saito S. Association of cnm-positive *Streptococcus mutans* with deep but not with lobar microbleeds. International CAA Meeting (Boston). Sep 9, 2016

〔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://www.ncvc.go.jp/hospital/section/scd/cerebrovascular/b-group.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪原 匡史 (IHARA, Masafumi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長

研究者番号: 00372590

(2) 研究分担者

仲野 和彦 (NAKAN0, Kazuhiko)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号：00379083

(3)研究協力者

齊藤 聡 (SAITO, Satoshi)
殿村 修一 (TONOMURA, Shuichi)