

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11959

研究課題名(和文) ミュータンスレンサ球菌の引き起こすIgA腎症悪化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Mechanism of aggravation of IgA nephropathy by mutans streptococci

研究代表者

仲 周平 (Naka, Shuhei)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：10589774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症は、慢性糸球体腎炎の中で最も頻度が高く、末期腎不全に進展しうる予後不良な腎臓疾患である。しかし、その原因やメカニズムに関する詳細については不明な点が多い。本研究では、IgA腎症患者口腔サンプルより分離したコラーゲン結合能を有する *Streptococcus mutans* 株がIgA腎症の発症に関連している可能性についてラットう蝕モデルを用いて検討した。その結果、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* 株により重度のう蝕が誘発されると、腎臓糸球体において、IgA腎症の病態に特徴的な病理組織学的所見を認め、IgA腎症様腎炎が引き起こされ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

これまでに、口腔細菌と腎臓疾患との関連性を検討した報告はほとんどなく、う蝕原性細菌とIgA腎症の関連性の報告はない。本研究における腎臓疾患メカニズムを唾液中の細菌を用いて分析した点は、*S. mutans*の全身への影響に関する研究の一環と位置づけて遂行するところが学術的な特色であるとも言える。さらに、口腔細菌や歯科疾患に関連するIgA腎症のメカニズムの一端が明らかになることで、新規治療の開発につながる可能性もあり、画期的なアプローチによって当該患者に対する利益に加えて、医療経済的にも大きな社会貢献が期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：IgA nephropathy is the most common type of chronic glomerulonephritis and affected patients with a poor prognosis can progress to terminal-stage renal failure. However, the details of the causes and associated mechanisms remain unclear. *Streptococcus mutans* strains with a collagen-binding property are frequently detected in the oral cavity of IgAN patients. We investigated IgA nephropathy caused by such strains using a rat caries model. Rats were inoculated once daily for 5 consecutive days with a cell suspension containing an *S. mutans* strain with collagen binding property isolated from the oral cavity of an IgA nephropathy patient. At 32 weeks after inoculation, severe dental caries were observed and histopathological examinations of renal glomeruli revealed characteristic findings of IgA nephropathy-like nephritis. These results suggest that severe caries induced by *S. mutans* with collagen binding may be associated with induction of IgA nephropathy-like nephritis.

研究分野：小児歯科学

キーワード：IgA腎症 う蝕 *Streptococcus mutans* コラーゲン結合タンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性糸球体腎炎の中で最も頻度が高い IgA 腎症は、20 年の経過で約 40% が末期腎不全に陥る予後不良な腎臓疾患である。疾患発症の解明と治療法の確立が求められており、平成 26 年度に厚生労働省の特定疾患に指定されている。また、小児期や思春期においても発症頻度が高い腎炎であり、その長期予後は不良であることも明らかになっている。急性上気道炎を契機として発症もしくは増悪するとの報告があり、口腔細菌との関連の可能性も考えられてきたが、その具体的なメカニズムに関する研究はこれまでほとんどなされていなかった。最近になって、IgA 腎症の発症および病状の進行に、ある種の歯周病原性細菌が関連しているとの報告や、扁桃腺炎が関連しているなどの報告があるが、う蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* の関連についての報告はほとんど存在していない。これまでに、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* の保有者は、潰瘍性大腸炎の発症リスクが 4 倍になるとの報告がある。潰瘍性大腸炎は IgA 腎症の合併症であるとの報告などから、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* が、IgA 腎症の発症および進展に関与しているのではないかという発想に至った。

はじめに、IgA 腎症患者と健常者の唾液を比較検討したところ、IgA 腎症患者は、口腔内にコラーゲン結合能を有する *S. mutans* 株を高頻度で保有していることが明らかとなった。また、血液中に侵入したコラーゲン結合能を有する *S. mutans* が脳出血、炎症性腸炎および非アルコール性脂肪肝炎の悪化に関与することを示した。さらに、感染性心内膜炎モデルにおける動物実験において、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* を感染させた群では、腎臓に明確な炎症を認めることが分かった。これらの知見から、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* と IgA 腎症との関連性について検討する価値があるという考えに至った。

2. 研究の目的

これまでに、う蝕の主要な病原細菌である *S. mutans* の中で、コラーゲン結合能を有する菌株が、感染性心内膜炎の発症、脳出血の悪化、炎症性腸炎の悪化および非アルコール性脂肪肝炎の悪化を引き起こすメカニズムの一端を明らかにしてきたが、腎臓への影響に関しては未検討であった。IgA 腎症は慢性糸球体腎炎の中で最も頻度が高く、小児期・思春期でも生じる疾患であるが発症機序は不明な点が多い。最近になって、IgA 腎症を呈する患者の口腔内の唾液中には、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* が高頻度で存在していることが認められた。そこで、本研究の目的は、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* に焦点を当て、動物モデルを用いて検討し、IgA 腎症発症のメカニズムの詳細を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 条件設定

IgA 腎症患者の唾液中より分離したコラーゲン結合能を有する *S. mutans* SN74 株のストレプトマイシン耐性株を作製して SN74R 株と命名した。SN74R 株は、10 mL の BHI 液体培地にて 37 で 18 時間培養後に、PBS を用いて $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ CFU/mL 相当の菌液を準備した。最初に、SPF の SD 系ラット (2 週齢オス) に対して、滅菌蒸留水にペニシリン (4,000 単位/mL) を添加し自由に摂取させ、普通食 (Rodent Diet CE-2) にはテトラサイクリン塩酸塩 (4 mg/g) を混合して 2 日間与えた。その後、菌自体を投与しない群 (菌非定着群) と、SN74R 株の濃縮菌液を 1 日 1 回 5 日間、ピペットを用いて口腔内に直接投与することで菌を定着させる群 (SN74R 群) とに分けた。全てのラットに対して、スクロース 56% 含有う蝕誘発性飼料 (Diet 2000) を与えて、34 週齢まで飼育して経時的に体重を測定した。

2) 尿中成分および血清成分の分析

34 週齢の時点でラットを滅菌プラスチック容器内に移し、排泄された尿をピペットにて滅菌エッペンチューブに採取した後、遠心分離を行い沈殿物と上清に分けた。血尿の有無を評価するために、沈殿物に 10 μ L の滅菌蒸留水を添加して混合させた後、スライドガラスに塗抹して 100%メタノールによる固定を行い、乾燥させた後にギムザ希釈液にて 10 分間の染色を行った。染色後にスライドガラスを流水で洗浄して乾燥させ、光学顕微鏡の強拡大 400 倍で観察した。血尿の評価には Hara ら (1995) の方法を用い、1 視野における赤血球が 10 個以上認められたものを陽性とした。次に、屠殺時に採血を行い、遠心分離を行って血清を回収した。採取した尿検体の上清および血清の成分分析を行った。

4) 腎臓の組織学的評価

屠殺後に採取した腎臓組織から 3 μ m の組織切片を作製後、PAS 染色、IgA 抗体および C3 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。その後、PAS 染色像は光学顕微鏡を用いてメサングウム細胞および基質の増殖を観察し、蛍光免疫染色像に関してはオールインワン蛍光顕微鏡にてメサングウム細胞への IgA および C3 の沈着を評価後、各沈着の陽性率を百分率で算出した。

5) 顎骨のプラークスコアおよびう蝕スコアの算出

摘出した上顎骨は、歯垢染色液を用いてデンタルプラークを染め出して水洗した。その後、Ooshima ら (1981) の方法を用いて実体顕微鏡下において顎骨を観察し、頬側面、咬合面および口蓋側面のデンタルプラークの付着を 0~3 のスコアにて評価して平均を算出した。また、上顎骨および下顎骨をオートクレーブにて 121 $^{\circ}$ C、2 気圧でそれぞれ 3 分間および 1 分間の加熱処理を行った後、軟組織を除去した。その顎骨のう蝕の程度を、Ooshima ら (1981) の方法に従って評価した。

4. 研究成果

1) 体重、血清および尿中成分の評価

34 週齢時の体重、血清 Alb 値、BUN 値、血清 Cr 値および尿タンパク/尿クレアチニン比は両群間に有意差は認めなかった。また、菌非定着群のすべてのラットにおいて血尿は認められなかった。一方、SN74R 群では 29 匹中 9 匹で血尿を認め、菌非定着群よりも有意に高い血尿陽性率 (31.0%) を示した。

2) 顎骨の状態

SN74R 群の歯頸部および咬合面には、菌非定着群と比較して多くのデンタルプラークの付着が認められた。また、菌非定着群の顎骨では咬耗および軽度う蝕が観察された程度であったが、SN74R 群では歯髄に到達する重度なう蝕を呈した。さらに、SN74R 群のプラークスコアおよびう蝕スコアは、菌非定着群よりも有意に高い値を示した。

3) 腎組織の病理組織学的評価

菌非定着群でメサングウム細胞および基質の増殖を認めなかったが、SN74R 群ではこれらの増殖が観察された。また、SN74R 群のメサングウム細胞では、IgA および C3 の沈着が認められた。さらに、SN74R 群の IgA 沈着陽性率は菌非定着群よりも有意に高く SN74R 群の C3 沈着陽性率も菌非定着群と比較して有意に高い値を示した。

本研究の結果から、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* 株によって齶蝕を誘発させ、長期間飼育を行ったラットにおいて何らかの免疫異常を生じていることは、菌が血液中に持続的に侵入することにより IgA 腎症様腎炎の発症に関わっている可能性が示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Naka Shuhei, Wato Kaoruko, Hatakeyama Rina, Okawa Rena, Nomura Ryota, Nakano Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Longitudinal comparison of Streptococcus mutans-induced aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 1428005 ~ 1428005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20002297.2018.1428005	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 Misaki Taro, Naka Shuhei, Wato Kaoruko, Hatakeyama Rina, Nagasawa Yasuyuki, Ito Seigo, Inaba Hiroaki, Nomura Ryota, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Campylobacter rectus in the Oral Cavity Correlates with Proteinuria in Immunoglobulin A Nephropathy Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nephron	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) 10.1159/000487103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 和唐薫子、仲周平、畠山理那、野村良太、仲野道代、仲野和彦
2. 発表標題 ラット齲蝕モデルにおける腎臓の免疫組織学的評価
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Wato, S. Naka, T. Misaki, R. Hatakeyama, Y. Nagasawa, S. Ito, H. Inaba, R. Nomura, M. Matsumoto-Nakano, K. Nakano.
2. 発表標題 Intravenous Administration of Streptococcus mutans induces IgA Nephropathy in Rats.
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 (JADR) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲周平、和唐薫子、三崎太郎、伊藤誓悟、野村良太、長澤康行、仲野道代、仲野和彦
2. 発表標題 Streptococcus mutans による腎炎の誘導：感染関連腎炎？or IgA 腎症？
3. 学会等名 第42回IgA腎症研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和唐薫子、仲周平、野村良太、仲野和彦
2. 発表標題 ラット 齲蝕モデルにおける Streptococcus mutans 株の IgA 腎症発症への影響の検討
3. 学会等名 第55回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Naka, R. Hatakeyama, Y. Takashima, R. Nomura, M. Matsumoto-Nakano, T. Ooshima, K. Nakano.
2. 発表標題 Long-term observations of non-alcoholic steatohepatitis aggravated by Streptococcus mutants infection in mice.
3. 学会等名 The 64th Congress of the European Organization for Caries Research (ORCA)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. NAKA, K. WATO, R. KAJIWARA, Y. TAKASHIMA, R. OKAWA, R. NOMURA, M. MATSUMOTO-NAKANO, K. NAKANO.
2. 発表標題 Long-term observations of Streptococcus mutans-induced aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice.
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research
4. 発表年 2017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	仲野 和彦 (Nakano Kazuhiko) (00379083)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	