

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09915

研究課題名(和文) 口腔細菌による動脈硬化発症における先天性免疫因子gp-340の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of gp-340 involved in atherosclerosis caused by oral bacteria

研究代表者

於保 孝彦(OH0, Takahiko)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：50160940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔細菌による動脈硬化発症において、先天性免疫因子gp-340が担う機能を調べた。齲蝕細菌であるStreptococcus mutansを用いてヒト動脈内皮細胞を刺激したところ、gp-340の産生誘導が認められた。またsiRNAを用いてgp-340の産生を抑制した内皮細胞へのS.mutansの付着および侵入は、いずれも対照に比べて増大した。さらにgp-340の産生を抑制した内皮細胞をS.mutansで刺激した際のサイトカイン産生は、対照に比べて増大した。これらの結果は、S.mutans刺激により内皮細胞から産生されたgp-340が、菌体の内皮細胞への付着を抑制したためと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化病巣から口腔細菌が検出されることから、同疾患発症における口腔細菌の関与が注目されている。先天性免疫因子gp-340は、身体の様々な組織で発現するタンパク質であり様々な機能を担っている。今回、齲蝕細菌Streptococcus mutansの刺激によりヒト動脈内皮細胞からgp-340が産生され、菌体の内皮細胞への付着や侵入を抑制し、炎症性サイトカインの産生を阻害することが認められた。本結果は、gp-340がS.mutansによる動脈硬化誘発の過程において保護的な役割を担うことを示唆している。すなわち口腔細菌による動脈硬化発症における新たな生体防御機構を示したことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans, a causative organism of dental caries, has been reported to be associated with the development of atherosclerosis. gp-340 belongs to the scavenger receptor cysteine-rich superfamily and has multiple functions. We investigated gp-340 expression in human aortic endothelial cell (HAECs) stimulated with S. mutans and examined the role of gp-340 in the interaction between S. mutans and HAECs. All of the tested S. mutans strains induced higher production levels of gp-340 in HAECs than those in unstimulated HAECs. More S. mutans cells adhered to gp-340 knock down HAECs than to control (gp-340-producing) HAECs. Invasion of gp-340 knock down HAECs by S. mutans was stronger than that of control HAECs. Cytokine production by gp-340 knock down HAECs by S. mutans stimulation was higher than that by control HAECs. These phenomena seemed to be due to the effect of released gp-340, namely, the inhibition of bacterial adherence to HAECs by gp-340.

研究分野：予防歯科学

キーワード：Streptococcus mutans ヒト動脈内皮細胞 gp-340 菌体付着 サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔内には無数の細菌が棲息しており、齶蝕・歯周疾患のみならず様々な全身疾患を誘発することが明らかにされている。そのうち動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞など日本人の死亡原因の多くを占める疾病の原因となる血管の病変である。これまでに、ヒト動脈硬化病巣 (Lehtiniemi *et al.*, *Eur J Clin Invest*, 2005; Nakano *et al.*, *J Clin Microbiol*, 2006) や血栓 (Pessi *et al.*, *Circulation*, 2013) から口腔バイオフィルム細菌が検出されており、口腔細菌感染と動脈硬化との関係が注目されている。申請者らは、口腔バイオフィルム細菌の中でも量的に多くを占め、また日常のブラッシングやフロッシング時に起こる一時的な菌血症に際して、もっとも多く検出される口腔レンサ球菌がヒト動脈内皮細胞への侵入および炎症誘導能力を持つことを示し、内皮細胞からのサイトカイン誘導機序を解明するなど、同菌種の動脈硬化発症への関与を報告した (Nagata *et al.*, *Mol Oral Microbiol*, 2011 & 2017)。

先天性免疫因子 gp-340 は scavenger receptor cysteine-rich protein の一種で、様々な病原体と相互作用をする特徴を持ち、呼吸器や消化器などの頻りに病原体と接する臓器の上皮で顕著に発現することが知られている (Mollenhauer *et al.*, *Cancer Res*, 2000)。gp-340 は感染に際して発現が上昇し、広範囲の細菌に結合して凝集塊を作ることによって感染予防に寄与している。唾液中に分泌される salivary agglutinin (唾液凝集素) は gp-340 と同等のタンパク質であり、申請者らは、gp-340 が齶蝕細菌である *Streptococcus mutans* を凝集させる能力を有することを報告した (Oho *et al.*, *Infect Immun*, 1998)。また、その他多くのレンサ球菌や黄色ブドウ球菌との凝集反応が報告されている (Kukita *et al.*, *Infect Immun*, 2013)。しかしながら近年の研究報告では、gp-340 の持つ菌体凝集能力は感染予防に寄与するのみでなく、状況によっては疾病を促進する可能性があることが示唆されている。感染性心内膜炎病巣から多くの口腔レンサ球菌が検出されることはよく知られている (Douglas *et al.*, *J Med Microbiol*, 1993)。Müller ら (*J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009) は、感染性心内膜炎患者の組織を検索し、gp-340 の発現上昇と疣贅や血栓形成につながる赤血球、血小板への gp-340 の結合を報告しており、このことは gp-340 が疾病促進作用をもつことを示唆している。

申請者は、これまでの研究でヒト動脈内皮細胞を *S. mutans* 等の口腔細菌と共培養すると、gp-340 の mRNA 発現が誘導されることを発見した。従って、この gp-340 が口腔細菌による動脈硬化発症においてどのような役割を担うかを解明することが、本研究課題の核心となる。

2. 研究の目的

本研究では口腔バイオフィルムを形成する細菌およびヒト動脈内皮細胞を用いて、以下のことを明らかにする。

- (1) 菌の刺激によるヒト動脈内皮細胞からの gp-340 のタンパク発現
- (2) 菌のヒト動脈内皮細胞への付着に及ぼす gp-340 の作用
- (3) 菌のヒト動脈内皮細胞への侵入に及ぼす gp-340 の作用
- (4) 菌の刺激によるヒト動脈内皮細胞からの炎症関連物質誘導に及ぼす gp-340 の作用

これらの検索により、細菌感染によってヒト動脈内皮細胞における gp-340 タンパクの発現およびこの gp-340 が、内皮細胞の炎症誘導にどのような機序で関与しているかを知り、口腔細菌による動脈硬化発症における gp-340 の役割を明らかにすることができる。gp-340 は菌体凝集能力を持つことから gp-340 の発現を契機に動脈内皮細胞表面では菌の排除または集積が進み、様々な炎症関連物質の産生にも影響を及ぼすことが予想される。この結果をもって次のステップである動脈内皮細胞の炎症を抑制する方法の検討に進むことができる。

3. 研究の方法

これまでに動脈硬化病巣から検出されている口腔レンサ球菌の一種であり、我々がヒト動脈内皮細胞の炎症を強く誘導することを確認した *Streptococcus mutans* を用いた。ヒトの口腔内から検出される *S. mutans* の血清型は、c、e、f の3つが知られているが、それぞれの血清型を数株用いた。ヒト血管内皮細胞としては、大動脈内皮細胞を用いた。また gp-340 およびアミラーゼをヒト安静時唾液から精製した。

(1) *S. mutans* の刺激によるヒト動脈内皮細胞からの gp-340 タンパク発現

- ①菌体と内皮細胞を、混合比率 MOI=1 で様々な時間、共培養した後、培養上清を回収した。
- ②抗 gp-340 モノクローナル抗体を用いたドットプロットアッセイで gp-340 のタンパク定量を行った。

(2) *S. mutans* OMZ175 のヒト動脈内皮細胞への付着に及ぼす gp-340 の作用

siRNA を導入して gp-340 の発現を抑制した内皮細胞を作製した後、菌と共培養し、菌体の血管内皮細胞表面への付着を対照 (non-targeting siRNA 導入内皮細胞) と比較した。

- ①あらかじめサイトカラシンで内皮細胞を処理した後、菌と共培養した。次に非付着菌体を洗浄除去した後、内皮細胞を回収し、付着菌数を培養法で調べた。

②菌と内皮細胞を共培養し、パラホルムアルデヒドで固定後、抗 PAc 抗体および蛍光標識 2 次抗体で菌を染色した後、蛍光顕微鏡観察を行った。

(3) *S. mutans* OMZ175 のヒト動脈内皮細胞への侵入に及ぼす gp-340 の作用

①siRNA を導入して gp-340 の発現を抑制した内皮細胞を用いて、antibiotic protection assay により菌体の血管内皮細胞への侵入を調べ、対照 (non-targeting siRNA 導入内皮細胞) と比較した。

②siRNA を感染させ gp-340 の発現を抑制した内皮細胞と菌を共培養する際に精製 gp-340 を反応系に加えて、菌の侵入に及ぼす影響を調べた。

(4) *S. mutans* OMZ175 の刺激によるヒト動脈内皮細胞からの炎症性サイトカインの産生

①siRNA を導入して gp-340 の発現を抑制した内皮細胞を菌体と共培養して培養上清を回収した。

②各サイトカインに対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法でサイトカイン定量を行い、対照 (non-targeting siRNA 導入内皮細胞) と比較した。

4. 研究成果

図表中の HAECs はヒト動脈内皮細胞を意味する。

(1) *S. mutans* の刺激によるヒト動脈内皮細胞からの gp-340 タンパク発現

S. mutans 血清型 c、e、f それぞれ 2 株を用いて内皮細胞と共培養をしたところ、すべての株において非刺激内皮細胞と比べてより高い gp-340 タンパク発現が認められた。特に *S. mutans* OMZ175 と *S. mutans* MT3940 を用いた場合、高い gp-340 の産生が認められた (図 1)。

次に *S. mutans* OMZ175 で内皮細胞を刺激した場合のタイムコースを調べたところ、gp-340 の発現量は共培養時間依存性に増加することが認められた (図 2)。

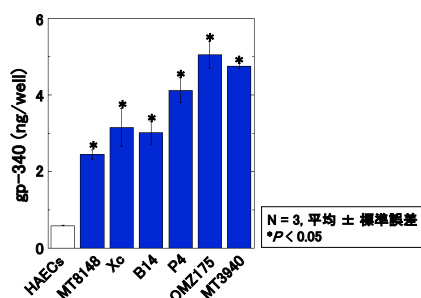


図1 *S. mutans* 刺激によるHAECsからのgp-340の誘導

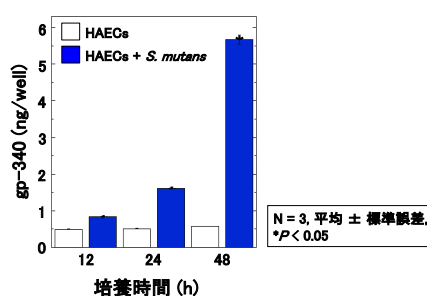


図2 *S. mutans* OMZ175刺激によるHAECsからのgp-340の誘導

(2) *S. mutans* のヒト動脈内皮細胞への付着に及ぼす gp-340 の作用

S. mutans OMZ175 と内皮細胞を共培養した場合の内皮細胞表面へ付着した菌の付着を調べたところ、対照 (non-targeting siRNA 導入内皮細胞) に比して、gp-340 の発現を抑制した内皮細胞への付着率は約 2 倍であることが認められた (表 1)。

蛍光顕微鏡観察では、対照 (non-targeting siRNA 導入内皮細胞) に比して、gp-340 の発現を抑制した内皮細胞表面により多くの菌が付着していることが認められた (図 3)。

表1 *S. mutans* OMZ175のHAECsへの付着

HAECs	付着率 (%)
Normal HAECs (gp-340 +)	5.6 ± 0.6
HAECs (gp-340 +) (non-targeting siRNA導入)	5.5 ± 0.5
HAECs (gp-340 -) (gp-340 siRNA導入)	10.2 ± 1.4

MOI = 100, 2 h N = 3, 平均 ± 標準誤差, *P < 0.05

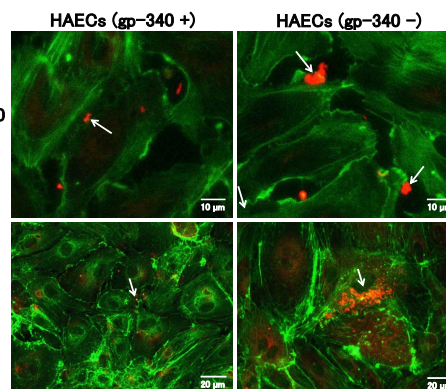


図3 *S. mutans* OMZ175のHAECs表面への付着

(3) *S. mutans* のヒト動脈内皮細胞への侵入に及ぼす gp-340 の作用

antibiotic protection assay により *S. mutans* OMZ175 菌体の血管内皮細胞への侵入を調べたところ、対照 (non-targeting siRNA 導入内皮細胞) と比較して、gp-340 の発現を抑制した内皮細胞への侵入率は約 2 倍であることが認められた (表 2)。

次に、*S. mutans* OMZ175 と gp-340 の発現を抑制した内皮細胞との共培養系に精製 gp-340 を加えたところ、加えた gp-340 の用量依存性に菌の侵入が抑制された。対照として唾液アミラーゼを加えて内皮細胞への菌の侵入を調べたが、影響は認められなかった (図 4)。

表2 *S. mutans* OMZ175のHAECsへの侵入

HAECs	侵入率 (%)
Normal HAECs (gp-340 +)	32.1 ± 3.2
HAECs (gp-340 +) (non-targeting siRNA導入)	27.1 ± 1.7
HAECs (gp-340 -) (gp-340 siRNA導入)	57.6 ± 2.0

MOI = 1, 24 h N = 3, 平均 ± 標準誤差, *P < 0.05

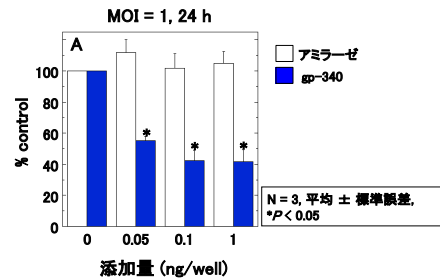


図4 *S. mutans* OMZ175のHAECs (gp-340-)への侵入に及ぼす gp-340の作用

(4) *S. mutans* のヒト動脈内皮細胞刺激による炎症性サイトカインの産生

S. mutans OMZ175 刺激による内皮細胞からのサイトカインの産生を調べたところ、対照 (non-targeting siRNA 導入内皮細胞) と比較して、gp-340 の発現を抑制した内皮細胞からはより多くの IL-6、IL-8、MCP-1 が産生されることが認められた (図 5)。

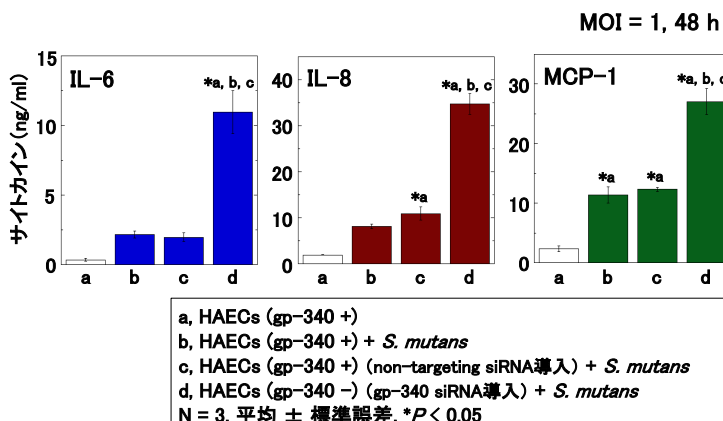


図5 *S. mutans* OMZ175刺激によるHAECsからのサイトカイン産生

gp-340 は身体の様々な腺組織や非腺組織で発現することが知られているが、今回の研究によりヒト動脈内皮細胞は gp-340 を発現する能力を持ち、齶蝕細菌である *S. mutans* はその刺激因子となりうることを示された。*S. mutans* とヒト動脈内皮細胞との相互作用における gp-340 の機能については、菌体の付着および侵入を抑制し、内皮細胞からの炎症性サイトカインの産生を抑制することが認められた。この現象は、*S. mutans* の刺激によってヒト動脈内皮細胞から gp-340 が産生・放出され、菌体凝集を生じて菌の排除をしたためと考えられる。これらの結果は、gp-340 が *S. mutans* によって誘導される動脈硬化発症の過程において保護的な役割を担うことを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oho Takahiko, Nagata Emi	4. 巻 34
2. 論文標題 DMBT1 involvement in the human aortic endothelial cell response to Streptococcus mutans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 108 ~ 117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/omi.12257	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 於保孝彦、長田恵美
2. 発表標題 Streptococcus mutansによるヒト動脈内皮細胞の炎症誘導におけるDMBT1の機能
3. 学会等名 第68回日本口腔衛生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 於保孝彦、長田恵美
2. 発表標題 Streptococcus mutans刺激によるヒト動脈内皮細胞からのDMBT1の誘導
3. 学会等名 第67回日本口腔衛生学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Oho T., and Nagata E
2. 発表標題 Streptococcus mutans induces DMBT1 in human aortic endothelial cells
3. 学会等名 96th General Session and Exhibition of International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018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	長田 恵美 (NAGATA Emi) (00304816)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------