

令和 3 年 4 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22610

研究課題名(和文) コラーゲン結合蛋白産生性齧蝕原性細菌の脳出血誘導機序の解明と治療法開発への挑戦

研究課題名(英文) A study to elucidate the mechanism of intracerebral hemorrhage induced by collagen-binding *Streptococcus mutans* and to develop a novel preventive therapy

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中で当センターに入院した患者から同意を得て歯垢を採取し、その中に含まれるミュータンス菌を培養し、cnm陽性ミュータンス菌と経時的な微小脳出血の出現率の関係を調査した。その結果、cnm陽性ミュータンス菌が歯垢中から検出された患者では、そうでない患者と比較して、微小脳出血の出現率が4.7倍高いことが明らかになった。この「悪玉むし菌」は、生活習慣や年齢の影響によってほころびが出た脳血管のコラーゲンに接着し、炎症を起こし、出血を止める血小板の働きを抑制することで脳出血を引き起こすのではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、cnm陽性ミュータンス菌と脳出血との関係を明らかにできたことから、脳卒中の機序の解明に寄与するものと考えられる。現在、cnm陽性ミュータンス菌によって脳出血が引き起こされるメカニズムを探索する基礎研究や、国内15施設と協力して進めている多施設前向き研究、アフリカ、東南アジアを含む世界中の他人種・地域における本菌の役割を検討する国際共同観察研究を実施している。我が国では欧米諸国と比べてまだまだ脳出血が多く、口腔内の悪玉むし菌を減らすために、口腔内環境を整えることが有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We retrospectively investigated patients with stroke receiving oral microbiological examination and head 3T magnetic resonance imaging evaluations twice in the period 2014 to 2019, allowing >180-day interval.

A total of 111 patients were identified; 21 (19%) with cnm-positive *S. mutans* and 90 (81%) without. Clinical history, including blood pressure and the use of antithrombotic agents, were comparable between the 2 groups. New CMB were more commonly observed in patients with cnm-positive *S. mutans* (52% versus 23%; $P=0.008$). The incidence of CMB was significantly higher in the group with cnm-positive *S. mutans*, especially in deep areas, (incidence rate ratios [95% CI], 5.1 [1.9-13.6] for CMB in any brain region; 15.0 [5.4-42.0] for deep CMB), which persisted after adjusting for age, sex, hypertension, and renal impairment (4.7 [1.8-11.9] for CMB in any brain region; 13.9 [4.3-44.5] for deep CMB).

研究分野：脳神経内科

キーワード：脳内出血 ミュータンス菌 脳微小出血 コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

脳出血の新規発症者は約5万人/年であり、脳梗塞より予後不良である。「高血圧性脳出血」という病名が物語るように、脳出血やその前駆段階である脳微小出血の多くは高血圧などの生活習慣病による細動脈硬化(脳小血管病)を経て引き起こされると考えられてきた。しかし、高血圧の病歴の長い脳卒中患者が必ずしも脳微小出血を呈するわけではない。さらに、脳微小出血と並ぶ細動脈硬化の画像マーカーである虚血性大脳白質病変においては、その2%程度しか生活習慣病によって説明されない(Wardlaw JM, et al. *Neurology* 2014)。すなわち、脳出血の病態には未知の因子の関与が大きく、その診断・治療法の開発にもパラダイムシフトが必要であることが広く知られるようになった(Ihara M, Yamamoto Y. *Stroke* 2016; Ihara M, et al. *Future Neurol* 2018)。しかし、脳出血にはそもそも特異的な分子標的が知られておらず、治療を見据えた研究開発がこれまで困難であった。

申請者らは、脳微小出血が、コラーゲン結合蛋白(Cnm 蛋白)を菌体表層に発現する齶蝕原性細菌(以下、Cnm 陽性齶蝕原性細菌)の口腔内常在化により有意に増加することを見出した。齶蝕原性細菌は、食物中の糖質の代謝・酸産生を介した齶蝕や歯髄炎を経て、口腔のバリア機能の破綻から菌血症を引き起こすことが知られているが、齶蝕原性細菌の10-20%を占めるCnm 陽性株は脳血管壁に直達し付着侵入することで脳出血を増悪させる(Nakano K, et al. *Nat Commun* 2011)。Cnm 陽性齶蝕原性細菌の脳微小出血の有無にかかるオッズ比は、循環器疾患の様々なリスク因子で補正しても、検診コホートで14.4倍(Miyatani F, et al. *Oral Dis* 2015)と高値であり、さらに脳卒中コホートでは出血性発症のオッズ比を7.1倍(Tonomura S, et al. *Sci Rep* 2016)に高めた。

2. 研究の目的

脳科学研究には、生命の維持に不可欠な4要素、すなわち、恒常性、自己組織化、場(脳科学研究では「脳」)、そして共生系を対象とした研究の融合が必要である。既存課題では、これまで前3者が主な研究対象となり、共生系に対する研究は重点対象とはなっていない。しかし、ヒトを宿主とする常在細菌叢と、免疫系を介した生体防御の安定的な相互作用を基盤とした共生系、その破綻(dysbiosis)による疾病メカニズムの解析とその治療法の開発は、メタゲノム解析や統計学的手法の発達により、多くの内科疾患の分野で重視され、脳科学研究においても新たな視点を賦与し得るものである。世界中で脳卒中の新薬開発がほとんど頓挫した今、先進国の中で、脳卒中・脳内出血罹患率が高い日本における挑戦的研究こそがパラダイムシフトに繋がる可能性が高い。

そこで、本申請課題では、脳科学/臨床神経学(国循)と歯学(大阪大学)が学際的連携を行い、脳内出血の病態を口腔内共生系の破綻として捉え、特定の齶蝕原性細菌が脳内出血の発症に関与する機序を解明することで、脳内出血の革新的治療法(分子標的予防法)の創生に繋がる基盤を整えることを目標にする。

3. 研究の方法

1) 病態を反映したモデル動物の作成(担当:猪原・殿村)

疫学研究の結果より、Cnm 陽性齶蝕原性細菌が、高血圧性脳内出血発症に関連すること

が示されたが、この病態を的確に反映するモデル動物の作成がこれまで急務であった。

申請者らの予備研究で、Stroke-prone spontaneous hypertensive rat (SHR-SP) に塩分を負荷し、Cnm 陽性齧蝕原性細菌を経静脈的に投与すると、*cnm* 遺伝子ノックアウト株を投与した群と比較して、若齢で脳内出血を発症し、脳微小出血が多数認められることが明らかとなった。

本研究では、予備実験の結果を基に、Cnm 陽性齧蝕原性細菌による脳内出血モデルラットを実験系として確立するとともに、*in vitro* では、コラーゲン結合アッセイ・血管内皮細胞への浸潤能を用いて脳内出血発症における Cnm 蛋白の作用機序の検討、補体結合アッセイを用いた宿主免疫の回避システムの検討を行う。さらに *in vivo* では、モデルラットの血液脳関門破綻部位をエパンスブルー法により標識し、血管壁に付着（もしくは、血管外に浸潤）した Cnm 陽性齧蝕原性細菌を含む血管の微細構造を電子顕微鏡により観察し、脳内出血のメカニズムの一端を明らかにする。

2) うさぎ免疫による抗Cnm抗体の作成（担当：猪原・殿村）

Cnm タンパクの一部あるいは全配列を抗原として、うさぎ免疫により抗 Cnm 抗体を数種類作成する。Western blotting と吸収試験を行い、抗原—抗体反応が強い抗 Cnm 抗体を選別する。

4. 研究成果

1) 病態を反映したモデル動物の作成

In vivo 研究では、Cnm 陽性齧蝕原性細菌 (TW295) および *cnm* 発現欠損株 (TW295CND) の両細菌株を 5 回に分けて繰り返し静脈投与する「慢性感染モデル」と、細菌の血流を介した全身臓器への直達を明らかにする「単回投与モデル」を作成し、病態解析に使用した。「慢性感染モデル」においては、血圧・体重の経過に影響は及ぼさなかったが、比較的早期に脳卒中に関連する神経症状が出現し、病理所見では特徴的な分布で脳内出血が認められた。また、単回投与モデルにより、グラム染色・*Streptococcus mutans* 細菌壁ペプチドグリカンに対するポリクローナル抗体・2) で作成した特異的なペプチド抗体を使用することで、脳内における細菌の分布を観察でき、毛細血管周囲の脳内ミクログリア活性化が Cnm 陽性ミュータンス菌関連の脳内出血発症病態に関連することを明らかにした。

In vitro 実験では、TW295・TW295CND に加え Cnm 発現相補株 (TW295Comp) を使用し、コラーゲン結合アッセイおよびヒト脳毛細血管内皮細胞を用いた細胞内寄生率を解析した。結果、コラーゲン結合能は TW295 に比較して TW295CND では抑制され、TW295Comp では回復することが明らかになった。さらに、ヒト脳毛細血管内皮細胞に対する寄生率も同様に TW295 に比較して TW295CND で抑制され TW295Comp で回復することが明らかになり、齧蝕原性細菌において宿主 (ヒト) 細胞外基質であるコラーゲンに対する結合蛋白が、脳血管内皮細胞への浸潤・細胞内寄生における病原分子であることが確認できた。さらに、申請者らは、感染細胞の RNA シークエンス解析により Cnm 陽性齧蝕原性細菌の細胞内寄生に関わる分子経路を予測し、阻害薬等を用いた追加検討を行った。

2) うさぎ免疫による抗 Cnm 抗体の作成

本研究では Cnm ペプチド抗体作製を行った。複数の *In silico* 解析をもとに抗原予測値・荷電残基、高次構造を複合的に評価し 3 種類 (6 羽) を作成した。2 種類 (4 羽) では、5 回の感作後 ELISA 測定で免疫前のコントロールと比較し、高い希釈倍率においても十分な測定値が得られた。1 種類 (2 羽) では、十分な反応が得られず 4 回目以降の感作時にアジュ

バントを変更し、5 回感作後には反応性の改善が確認された。次に、Cnm 陽性齧蝕原性菌 (TW295) および、Cnm 陰性の齧蝕原性細菌をプレパラート上に熱・エタノール固定し、免疫染色を行ったところ、3 種類の抗血清および精製後抗体のいずれにおいても 500 倍以上の倍率において免疫染色で染色されることが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tonomura Shuichi, Ihara Masafumi, Friedland Robert P	4. 巻 40
2. 論文標題 Microbiota in cerebrovascular disease: A key player and future therapeutic target	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 1368 ~ 1380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X20918031	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 該当する
1. 著者名 Uemura Maiko T., Maki Takakuni, Ihara Masafumi, Lee Virginia M. Y., Trojanowski John Q.	4. 巻 12
2. 論文標題 Brain Microvascular Pericytes in Vascular Cognitive Impairment and Dementia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnagi.2020.00080	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 該当する
1. 著者名 猪原匡史, 齊藤聡, 服部頼都, 細木聡, 山本由美, 殿村修一	4. 巻 37
2. 論文標題 齶歯・歯周病と脳卒中・認知症の関連 (RAMESSES研究)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 神経治療学	6. 最初と最後の頁 379-384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Hosoki Satoshi, Saito Satoshi, Tonomura Shuichi, Ihara Masafumi, et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Oral Carriage of Streptococcus mutans Harboring the Gene Relates to an Increased Incidence of Cerebral Microbleeds cmm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 3632 ~ 3639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.120.029607	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 猪原匡史
2. 発表標題 虫歯・歯周病と脳卒中・認知症の関連（RAMESSES研究）
3. 学会等名 日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masafumi Ihara
2. 発表標題 Collagen-binding Streptococcus mutans tied to intracerebral hemorrhage
3. 学会等名 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪原匡史
2. 発表標題 脳内出血発症における齧蝕原性細菌の病的意義
3. 学会等名 日本脳卒中学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 被験者の脳微小出血の重症化リスクを予測する方法、脳微小出血の重症化リスクの高い被験者をスクリーニングする方法、及びそれらに用いるキット	発明者 猪原匡史，齊藤聡， 服部頼都，湯原悟 志，西脇森衛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-170952	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

国立循環器病研究センター 脳神経内科
<http://www.ncvc.go.jp/hospital/section/scd/cerebrovascular/b-group.html>

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)	

	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 協力者	殿村 修一 (Tonomura Shuichi)		

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
---------	---------