

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592459

研究課題名(和文) 新規リスクファクター候補口腔バイオフィルム細菌による動脈硬化誘発機序の実験的解明

研究課題名(英文) Experimental analysis of the induction mechanism of atherosclerosis by oral biofilm bacteria as a possible new risk factor

研究代表者

長田 恵美 (NAGATA EMI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00304816

研究成果の概要(和文)：口腔レンサ球菌は、健康な人の口の中に住んでいる細菌であるが、動脈硬化の患者さんにおいては、動脈硬化病巣からこの細菌が発見されている。我々は口腔レンサ球菌が、ヒト動脈内皮細胞(動脈の内側の細胞)に侵入すること、むし歯の原因菌を含む4種類の口腔レンサ球菌は、侵入した動脈内皮細胞にサイトカイン(動脈硬化を引き起こす物質)を作らせることを明らかにした。この結果から、口腔レンサ球菌は動脈硬化誘発に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral viridans group streptococci are the major commensal bacteria of the supragingival oral biofilm and have been detected in human atheromatous plaque. The oral streptococci tested were capable of invading HAECs. HAECs invaded by one of four kinds of oral streptococci including cariogenic bacterium produced more cytokine(s) than non-invaded HAECs. These results suggest that oral streptococci may participate in the pathogenesis of atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2006年度 | | | |
| 2007年度 | | | |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：予防歯科学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口腔細菌、バイオフィルム、感染症、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞などの日本人の死亡原因の多くを占める疾病の原因とな

る血管の変化である。動脈硬化の成因は血管内皮細胞の機能的傷害であるという“傷害反応仮説”によって説明されているが、現在も

なお高血圧、脂質代謝異常、喫煙、肥満、年齢といった古典的リスクファクターだけでは説明できない動脈硬化患者が存在する。近年、疫学研究では歯周疾患の有無と心臓脈管系疾患の罹患率との間に関連性があること (Mattila KJ *et al.*, Br Med J, 1989)、臨床細菌学的にはヒトの動脈硬化病巣から口腔細菌が分離されたこと (Lehtiniemi J *et al.*, Eur J Clin Invest 35, 2005) が報告されている。口腔細菌の中でも歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に関しては、侵入能力を持つ *P. gingivalis* はヒト動脈内皮細胞の障害因子として働くこと (Chou *et al.*, Infect. Immun., 2005)、また動物実験モデルにおいて *P. gingivalis* が動脈硬化をより重篤にすること (Li *et al.*, Circulation, 2002) が明らかにされている。しかしながら、常在菌であり口腔バイオフィーム細菌の中でも量的に多くを占める口腔レンサ球菌のヒト動脈内皮細胞への侵入能力および障害因子としての働きを検討したものはない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔バイオフィーム中で量的に最も多い口腔レンサ球菌を用いて (1) 菌のヒト動脈内皮細胞への侵入能力の検討、(2) 菌のヒト動脈内皮細胞への侵入を阻害することが予想されるサイトカラシン D を用いて、菌のヒト動脈内皮細胞への侵入が内皮細胞の障害に必須であるかの検討、(3) 菌の侵入によって誘導されるヒト動脈内皮細胞の炎症関連物質 (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, IL-6, IL-8, MCP-1) のタンパクおよび遺伝子発現の解析を行う、である。

3. 研究の方法

(1) 口腔レンサ球菌のヒト動脈内皮細胞 (HAEC) への侵入能力の検討

① 細菌培養法での検討

HAEC を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。嫌氣的に培養した口腔レンサ球菌 (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*) それぞれを HAEC 培養上清に加え共培養後、培地および HAEC 表面に存在する菌をゲンタマイシンおよびペニシリン G で処理した。HAEC に侵入し抗生剤の影響を受けずに生き残った菌を、0.1% Tween 20 で HAEC を処理することによって回収後、BHI 寒天培地にて嫌氣的に培養した。48 時間後に菌のコロニー数を計測し、[検出さ

れた菌数 (CFU) / 最初に HAEC 培地に加えた菌数 (CFU)] をもってその菌の HAEC への侵入率として算出した。

② 共焦点レーザー顕微鏡による口腔バイオフィーム細菌の HAEC への侵入の観察

口腔バイオフィーム細菌の HAEC への侵入を確認するために、免疫染色法で HAEC に侵入した菌あるいは侵入していない菌を異なる蛍光色素で染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) カタラーゼおよびサイトカラシン D による菌の HAEC への侵入抑制の検討

カタラーゼあるいはサイトカラシン D を培地に添加し、前記と同様に菌の HAEC への侵入能力を検討した。

(3) 菌の侵入によって誘導されるヒト動脈内皮細胞の炎症関連物質 (IL-6, IL-8, MCP-1) のタンパクおよび遺伝子発現の解析

① ELISA 法によるタンパク定量

前記の条件で HAEC に菌を侵入させて、さらに一定時間培養後、培地を回収して ELISA 法にて培地中の IL-6、IL-8 および MCP-1 タンパクの量を測定し、非感染 HAEC の産生量と比較した。

② リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の定量

前記の条件で HAEC に菌を侵入させて、さらに一定時間培養後、HAEC を回収して Total RNA を抽出した。リアルタイム RT-PCR 法にて IL-6、IL-8、MCP-1 mRNA の増幅を行い、非感染 HAEC を対照として相対定量解析を行った。

4. 研究成果

今回検討した口腔レンサ球菌は全て HAEC への侵入能力を有していた。菌と HAEC との共培養時間が長くなる程、HAEC に侵入する菌の数は増加した (図 1 : A-C は *S. mutans* Xc、D と E は *S. gordonii* ATCC 10558 の HAEC への侵入を示す。共培養時間は A と D は 4 時間、B と E は 8 時間、C は 24 時間であった。細胞内に侵入した菌は赤 (矢印)、細胞外の菌は紫 (矢頭) に染色されている。)。共培養時間が一定の時間を越えると HAEC に対して細胞毒性を示す菌も存在した。カタラーゼとサイトカラシン D は菌の HAEC への侵入を抑制した (図 2)。 *S. gordonii* ATCC 10558 (図 3 の a)、 *S. mutans* Xc (図 3 の b)、 *S. salivarius* ATCC 13419 (図 3 の c) あるいは *S. gordonii* DL1 (Challis) (図 4) が侵入した HAEC は菌が侵入していない HAEC (図 3 と 4 の open bar) と比較して、有意に多くの量のサイトカイン (IL-6、IL-8、MCP-1) を産生した。そ

のうち *S. mutans* Xc が侵入した HAEC はもつとも多くの量のサイトカインを産生しており、培地中のサイトカイン量は時間の経過とともに増加した (図 5: open bar は菌が侵入していない HAEC、solid bar は菌が侵入した HAEC)。さらに *S. mutans* Xc が侵入した HAEC におけるサイトカイン mRNA の発現も菌が侵入していない HAEC と比較して有意に増加していた (図 6: open bar は菌が侵入していない HAEC、solid bar は菌が侵入した HAEC)。これらの結果から、口腔レンサ球菌は動脈硬化の病原因子の一つである可能性が示唆された。

口腔レンサ球菌がヒト動脈内皮細胞に侵入して炎症反応を誘導するという報告は国内外において初めてである。またこの研究では HAEC に対して感染させる菌の数を *S. gordonii* DL1 (Challis) 以外は同数 (MOI: 感染多重度=1) に設定しており、日々のブラッシングやフロッシングで低レベルの感染が慢性的に起こる口腔細菌感染モデルの再現に適しているといえる。低い感染多重度で HAEC と接触し、細胞内に侵入しても宿主である HAEC を傷害しない細菌が、HAEC からのサイトカイン産生を誘導し続けるという結果は、慢性炎症である動脈硬化の病態と一致する。以上のことから、本研究は口腔細菌の動脈硬化発症あるいは増悪への関与に新たな知見を示したといえる。今後は、血管内皮細胞内に侵入した口腔レンサ球菌がどのように細胞に認識されて炎症反応が進行するかというメカニズムを解明することによって、口腔バイオフィルム細菌の動脈硬化への関与を明らかにしていきたい。

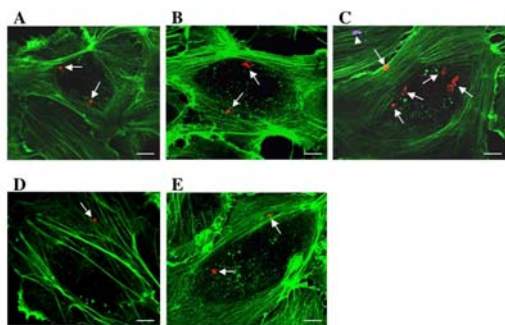


Fig. 1

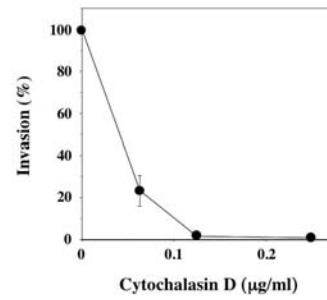


Fig. 2

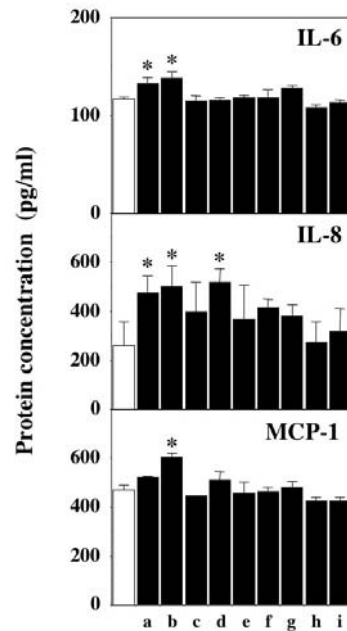


Fig. 3

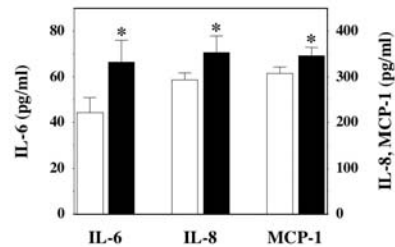


Fig. 4

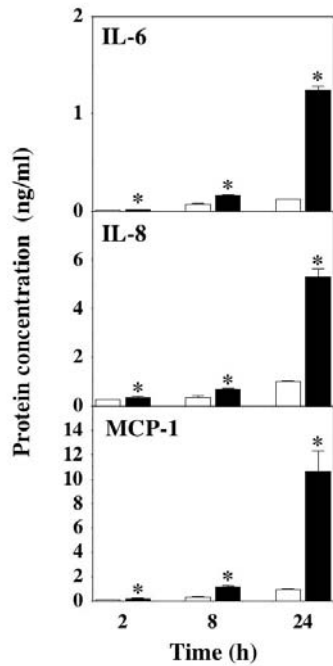


Fig. 5

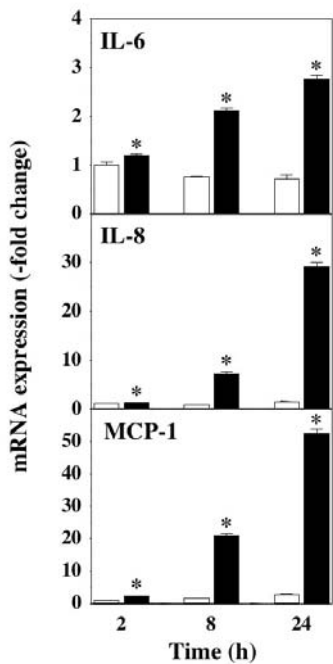


Fig. 6

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5件)

- ① Nagata E., de Toledo A., Oho T.: Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production. 査読有、Mol. Oral Microbiol. , 26: 78-88, 2011.
- ② Takahashi Y., Yoshida A., Nagata E., Hoshino T., Oho T., Awano S., Takehara T., Ansai T.: *Streptococcus anginosus* L-cysteine desulhydrase gene expression is associated with abscess formation in BALB/c mice. 査読有、Mol. Oral Microbiol., in press, 2011.

〔学会発表〕(計10件)

- ① Nagata E., de Toledo A., Oho T.: Production of inflammatory cytokines by HAECs invaded by oral streptococci. 88th General Session & Exhibition of International Association for Dental Research. 2010年7月16日, Barcelona (Spain).
- ② 長田恵美, de Toledo A., 於保孝彦: ヒト動脈内内皮細胞に侵入した口腔レンサ球菌のサイトカイン産生誘導能の検討. 第59回日本口腔衛生学会総会. 2010年10月8日, 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県).
- ③ 長田恵美, de Toledo A., 於保孝彦: 口腔レンサ球菌のヒト動脈内皮細胞への侵入および炎症反応誘導について. 第58回日本口腔衛生学会総会. 2009年10月11日, 長良川国際会議場 (岐阜県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 恵美 (NAGATA EMI)
鹿兒島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 00304816

(2) 研究分担者

於保 孝彦 (OHO TAKAHITO)
鹿兒島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 50160940