

令和 5 年 10 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10225

研究課題名（和文）歯科領域からの革新的治療法の開発を目指した口腔細菌に起因するIgA腎症の病態解明

研究課題名（英文）Investigation of the pathogenesis of IgA nephropathy caused by oral bacteria for the development of innovative treatment methods from the field of dentistry.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）： IgA 腎症は、検尿で血尿やタンパク尿を認め、腎臓系球体に IgA が沈着し慢性の経過をたどる病変で、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の詳細については不明な点が多い。本研究では、IgA 腎症患者口腔より分離したコラーゲン結合能を有する *Streptococcus mutans* 株を IgA ラット頸静脈投与モデルとラットう蝕モデルの2つのラットモデルを用いて、病態発症メカニズムの検討を行った。その結果、両動物モデルにおいて、腎臓系球体では IgA 腎症に特徴的な病理組織学的所見を認め、IgA腎症様腎炎が発症することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、実際に IgA 腎症患者の口腔から採取した菌株を使用し、動物モデル口腔内に齶蝕を誘発させることによって、一過性に細菌が体内に侵入するモデルではなく、持続的に全身へと侵入する可能性を再現するため、現実が反映できている可能性が高いと想定できるモデルであることも新たな試みの1つと考えている。本研究の結果、口腔細菌や歯科疾患の関連する IgA 腎症のメカニズムの一端が明らかになれば、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 a chronic kidney disease characterized by hematuria and proteinuria, shown by urine analysis, and IgA deposition in the glomeruli of the kidney, which can progress to end-stage renal dysfunction. However, details regarding its causes and mechanisms remain unclear. In the present study, the pathogenesis mechanism were investigated using two rat models; those that underwent jugular vein administration of the *S. mutans* strain and a dental caries model. A *S. mutans* strain isolated from the oral cavity of an IgA nephropathy patient positive for collagen binding protein was administered to rats in both models and kidney histopathological analysis was performed.

The results showed that IgA nephropathy-like nephritis developed in each of the animal models, a characteristic histopathological finding indicating IgA nephropathy in glomeruli in the kidney.

研究分野：小児歯科学

キーワード：IgA腎症 *Streptococcus mutans* コラーゲン結合タンパク ラット動物モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は、わが国で最も多く認められる慢性糸球体腎炎であり、20 年という長い経過の中で約 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、2014 年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最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となっている。IgA 腎症は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もあり、口腔細菌との関連の可能性も考えられてきたが、その具体的な詳細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 腎症の発症および進展に、ある種の歯周病原細菌が関連しているとの報告がされてきているが、齶蝕の主な病原細菌である *Streptococcus mutans* による関連性を扱った研究に関する報告はほとんど存在していない。我々の研究チームがこれまで明らかにしてきたコラーゲン結合能を有する *S. mutans* が様々な全身疾患と関連するという知見をもとに、歯科医と腎臓内科医が連携した研究チームを構築し、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のもと、仮説の検証を行ってきた。その結果、IgA 腎症患者は、口腔内にコラーゲン結合能を有する *S. mutans* 株を高頻度に保有していることが明らかとなり、さらにこれらの菌株を保有する IgA 患者では、齶蝕経験歯数やタンパク尿の値が有意に高いことが明らかとなった。

そこで、本研究の学術的問いは、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* が IgA 腎症発症や病態の進展に関連しているかということである。これまでに我々研究チームが構築した様々な動物モデルや、*in vitro* 系実験を用いて検討し、歯科的・医科的な視点の両面から検討する価値があるという考えに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、実際に IgA 腎症患者の口腔から採取した菌株を使用し、動物モデルにおいて病態の発症を検討することである。菌株を頸静脈から血液中に一過性に投与するモデルと、動物モデル口腔内に齶蝕を誘発させることによって、持続的に菌を全身へと侵入させるモデルの 2 つの動物モデルを用いて検討する点が学術的独自性のある点と考えられる。

また、歯科医と腎臓内科医が連携し、様々な視点からの発想およびアイデアを一つの方向に集約し、研究チームとして構築し、これまでに解決できていない問題にアプローチしていくことは学術的に大変意義あることだと思われる。本研究の結果、口腔細菌や歯科疾患の関連する IgA 腎症のメカニズムの一端が明らかになれば、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。

### 3. 研究の方法

#### 1) 本研究に使用した菌株

聖隷浜松病院腎臓内科において、IgA 腎症と診断を受け同意を得た患者から唾液を採取後、バシトラシン含有 Mitis-salivarius 寒天培地に播種した。培養されたコロニーを釣菌し、Brain Heart Infusion 液体培地にて培養した。得られた菌の DNA を抽出後、コラーゲン結合タンパク (Cnm) の遺伝子をコードする特異的プライマーを用いた PCR を行い、Cnm 陽性を示した *S. mutans* SN74 株を本研究に用いた。

#### 2) ラット頸静脈投与モデルによる検討

Specific pathogen-free (SPF) の Sprague-Dawley (SD) 系ラット (4 週齢オス) の頸静脈から  $1 \times 10^8$  CFU の *S. mutans* SN74 株を 1 回投与した群およびリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) を投与したコントロール群に分け、両群に普通食を与えて飼育した。生後 4, 6, 8, 10 および 12 週における尿を採取し成分分析を行い、屠殺後に摘出した腎臓は組織学的評価として Periodic acid-Schiff (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。

### 3) ラット齲蝕モデルによる検討

*S. mutans* SN74 株をストレプトマイシン (1,500  $\mu\text{g/ml}$ ) 耐性とした SN74R 株を用いた。SPF の SD 系ラット (2 週齢オス) に 2 日間抗生物質を投与し口腔常在細菌を抑制した後、 $10^{10}$  ~  $10^{11}$  CFU の *S. mutans* SN74R 株を 1 日 1 回 5 日間、ピペットにて口腔内に直接投与し定着させた群および菌を投与しないコントロール群を設け、両群にスクロース 56% 含有う蝕誘発性飼料を与えて飼育した。生後 34 週に尿を採取し成分分析を行い、屠殺後に顎骨を摘出してプラークスコアおよびう蝕スコアを算出した。また、屠殺時に摘出した腎臓は組織学的評価として PAS 染色に加え IgA 抗体および C3 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

### 1) ラット頸静脈投与モデルによる分析成果

生後 8 週の SN74 株群の尿タンパク/尿クレアチニン比は、コントロール群と比較して有意に高い値を示した。また、PAS 染色像から生後 8 週および 10 週の SN74 株群においてコントロール群と比較してメサングウム細胞および基質の増殖が認められた。一方で、生後 12 週の SN74 株群においてはこれらの所見は認められなかった。さらに、蛍光免疫染色像から生後 8 週および 10 週の SN74 株群のメサングウム領域において、コントロール群と比較して IgA および C3 の有意な沈着が認められた。

### 2) ラット齲蝕モデルによる分析結果

SN74R 株群のプラークスコアおよびう蝕スコアは、コントロール群と比較して有意に高い値を示した。また、観察されたう蝕はほとんど歯髄に到達していた。SN74R 株群における血尿陽性率は、コントロール群と比較して有意に高い値を示した。SN74R 株群の PAS 染色像では、コントロール群と比較してメサングウム細胞および基質の増殖が観察された。SN74R 株群の蛍光免疫染色像では、コントロール群と比較してメサングウム領域に IgA および C3 の沈着が多く認められた。

本研究の結果より、ラットモデルにおいて IgA 腎症患者の唾液より分離した *S. mutans* 株を頸静脈より 1 回投与した場合には、一過性に IgA 腎症様腎炎の発症を認めた。また、ラット口腔内に同菌株を定着させて重度う蝕を誘発した場合には、長期間ラット体内に持続的に菌が侵入することで IgA 腎症様腎炎が発症する可能性も示唆された。これらの結果から、IgA 腎症患者の唾液より分離した *S. mutans* 株は IgA 腎症様腎炎の発症に関与し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9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Naka Shuhei, Wato Kaoruko, Misaki Taro, Ito Seigo, Matsuoka Daiki, Nagasawa Yasuyuki, Nomura Ryota, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Streptococcus mutans induces IgA nephropathy-like glomerulonephritis in rats with severe dental caries	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85196-4	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 Morikawa Yuko, Morimoto Setsuyo, Yoshida Eri, Naka Shuhei, Inaba Hiroaki, Matsumoto-Nakano Michiyo	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification and functional analysis of glutamine transporter in Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 1797320 ~ 1797320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/20002297.2020.1797320	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 Naka Shuhei, Wato Kaoruko, Misaki Taro, Ito Seigo, Nagasawa Yasuyuki, Nomura Ryota, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Intravenous administration of Streptococcus mutans induces IgA nephropathy-like lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1122 ~ 1131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-020-01961-1	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 Nomura Ryota, Otsugu Masatoshi, Hamada Masakazu, Matayoshi Saaya, Teramoto Noboru, Iwashita Naoki, Naka Shuhei, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Potential involvement of Streptococcus mutans possessing collagen binding protein Cnm in infective endocarditis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75933-6	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 Nagasawa Yasuyuki, Misaki Taro, Ito Seigo, Naka Shuhei, Wato Kaoruko, Nomura Ryota, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Title IgA Nephropathy and Oral Bacterial Species Related to Dental Caries and Periodontitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 725 ~ 725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23020725	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, Nagasawa Yasuyuki, Matsuoka Daiki, Ito Seigo, Nomura Ryota, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 147
2. 論文標題 Simultaneous Presence of Campylobacter rectus and Cnm-Positive Streptococcus mutans in the Oral Cavity Is Associated with Renal Dysfunction in IgA Nephropathy Patients: 5-Year Follow-Up Analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nephron	6. 最初と最後の頁 134 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000525511	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 Naka Shuhei, Matsuoka Daiki, Goto Kana, Misaki Taro, Nagasawa Yasuyuki, Ito Seigo, Nomura Ryota, Nakano Kazuhiko, Matsumoto-Nakano Michiyo	4. 巻 12
2. 論文標題 Cnm of Streptococcus mutans is important for cell surface structure and membrane permeability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 994014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2022.994014	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 Nomura Ryota, Nagasawa Yasuyuki, Misaki Taro, Ito Seigo, Naka Shuhei, Okunaka Mieko, Watanabe Maiko, Tsuzuki Kenzo, Matsumoto-Nakano Michiyo, Nakano Kazuhiko	4. 巻 111
2. 論文標題 Distribution of periodontopathic bacterial species between saliva and tonsils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 719 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-022-00776-8	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, Suzuki Hitoshi, Lee Mingfeng, Aoki Ryosuke, Nagasawa Yasuyuki, Matsuoka Daiki, Ito Seigo, Nomura Ryota, Matsumoto-Nakano Michiyo, Suzuki Yusuke, Nakano Kazuhiko	4. 巻 18
2. 論文標題 cnm-positive Streptococcus mutans is associated with galactose-deficient IgA in patients with IgA nephropathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0282367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0282367	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 松岡大貴, 仲周平, 後藤花奈, 和唐薫子, 野村良太, 仲野和彦, 仲野道代
2. 発表標題 Streptococcus mutans コラーゲン結合タンパクの IgA 腎症発症メカニズムへの関与
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 D. Matsuoka, S. Naka, K. Goto, M. Matsumoto-Nakano
2. 発表標題 Investigation of Streptococcus mutans collagen-binding protein pathogenicity
3. 学会等名 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 2021年

1. 発表者名 松岡 大貴, 仲 周平, 仲野 道代
2. 発表標題 IgA 腎症患者由来 Cnm 陽性 Streptococcus mutans の分子生物学的解析
3. 学会等名 第 40 回日本小児歯科学会中四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tabata K, Naka S, Tonomura S, Nakano K, Matsumoto-Nakano M.
2. 発表標題 Prevalence of Specific Streptococcus mutans harbored by non-alcoholic steatohepatitis patients.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyai Y, Naka S, Matsumoto-Nakano M.
2. 発表標題 Periodontal bacteria distribution in child with early primary tooth loss.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsunoda Y, Naka S, Okawa R, Nakano K, Matsumoto-Nakano M.
2. 発表標題 Effects of anticancer drugs on mouse tooth germ development.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naka S, Wato K, Misaki T, Nagasawa Y, Ito S, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K.
2. 発表標題 IgA nephropathy-like lesion development in rat caries model.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三崎太郎, 清水吉貴, 伊藤大介, 小野雅史, 鈴木由美子, 仲 周平, 和唐 薫子, 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 う蝕ラットモデルにおける IgA 腎症様腎炎を発症する可能性
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田衣里, 松三友紀, 森川優子, 仲 周平, 高島由紀子, 仲野道代.
2. 発表標題 Streptococcus mutans における DnaK の表層タンパク発現への影響と役割
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2020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 ラット齲蝕モデルにおける IgA 腎症様腎炎発症に関する検討
3. 学会等名 第43回 IgA 腎症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長澤康行, 野村良太, 三崎太郎, 仲 周平, 伊藤 誓悟, 和唐 薫子, 仲野道代, 仲野和彦
2. 発表標題 IgA 腎症患者の扁桃における歯周病菌レッドコンプレックスの感染率の検討
3. 学会等名 第43回 IgA 腎症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡大貴, 仲 周平, 後藤花奈, 野村良太, 仲野和彦, 仲野道代
2. 発表標題 Streptococcus mutans コラーゲン結合タンパクCnmの病原性に関する検討
3. 学会等名 第60回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡大貴, 仲 周平, 稲葉裕明, 仲野道代
2. 発表標題 Streptococcus mutans のコラーゲン結合タンパクCnmの構造解析
3. 学会等名 第41回日本小児歯科学会中四国地方会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲 周平, 松岡大貴, 三崎太郎, 後藤花奈, 長澤康行, 伊藤 誓悟, 野村良太, 仲野道代, 仲野和彦 .
2. 発表標題 ラットIgA腎症様腎炎モデルでのStreptococcus mutans 菌体表層タンパクCnmの病原因子の可能性
3. 学会等名 第46回 IgA 腎症研究会学術集会
4. 発表年 2023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・大学院歯学研究科・教授    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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 道代 (松本道代)  (Nakano Michiyo)  (30359848)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	

	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	三崎 太郎  (Misaki Taro)  (20464125)	聖隷クリストファー大学・看護学部・医師   (33804)	
研究 協 力 者	長澤 康行  (Nagasawa Yasuyuki)  (10379167)	兵庫医科大学・医学部・医師   (34519)	

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