

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10271

研究課題名（和文）口腔バイオフィルムの動脈硬化誘発における病原性獲得メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenicity acquisition mechanism of oral biofilm in induction of atherosclerosis

研究代表者

長田 恵美（Nagata, Emi）

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：00304816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：口の中には多くの種類の細菌が生息しており、口腔バイオフィルムと呼ばれる細菌の集団を形成している。口腔バイオフィルム細菌は心臓や血管の病気の原因となっている。2種類の口腔バイオフィルム細菌を組み合わせると、互いの増殖能力、ヒト動脈内皮細胞への侵入能力、およびヒト動脈内皮細胞における TRL2、NOD2、および IL-6 の産生誘導能力に影響を及ぼした。口腔バイオフィルム細菌は相互に影響し合い、集団として病原性を獲得する可能性があると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、口腔バイオフィルムの病原性を明らかにし、動脈硬化や心臓病の予防のために、毎日の丁寧な歯磨きや定期的な歯科医院での専門的口腔清掃によって、口腔バイオフィルム細菌をコントロールすることが重要であることを、科学的に証明した。また性質の異なる口腔バイオフィルム細菌が互いの能力に影響し合っていたことから、細菌の相互作用をコントロールすることが、口腔バイオフィルムの病原性のコントロールに繋がって、病気の予防や治療法の糸口となることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Many types of bacteria live in the mouth, forming a population of bacteria called an oral biofilm. Oral biofilm bacteria are responsible for heart and blood vessel disease. Combining the two types of oral biofilm bacteria affected each other's ability to proliferate, invade human arterial endothelial cells, and induce the production of TRL2, NOD2, and IL-6 in human arterial endothelial cells. It was speculated that oral biofilm bacteria may influence each other and acquire pathogenicity as a population.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔バイオフィルム Streptococcus mutans Streptococcus oralis 内皮細胞 動脈硬化 病原性過酸化水素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 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。ヒト動脈硬化病巣 (Lehtiniemi *et al.*, Eur. J. Clin. Invest., 2005; Nakano *et al.*, J. Clin. Microbiol., 2006)、心筋梗塞や脳梗塞患者の血栓 (Pessi *et al.*, Circulation, 2013; Patrakka *et al.*, J Am Heart Assoc. 2019) から口腔バイオフィーム細菌が検出されている。中でも口腔レンサ球菌はもっとも高頻度に検出されることから、これらの疾患との関与が注目されている。

申請者はヒト口腔バイオフィーム細菌の中で量的に多くを占める口腔レンサ球菌を用いて、口腔レンサ球菌が動脈硬化のリスクファクターとなりうるかを実験的に検証した。その結果、調べた口腔レンサ球菌 10 菌種は全てヒト動脈内皮細胞に侵入し、その内 4 菌種は侵入した内皮細胞からサイトカインの産生を誘導した (Nagata *et al.*, Mol. Oral Microbiol., 2011)。さらに菌の侵入により内皮細胞の細胞質に存在するパターン認識受容体が増加したことから、菌の細胞内侵入が内皮細胞におけるサイトカインの産生誘導に重要であることが示された (Nagata *et al.*, Mol. Oral Microbiol., 2017)。

ヒト口腔バイオフィームは約 700 種の多様な菌種から構成されている。口腔バイオフィームによる動脈硬化誘発機序を探求していくためには、今まで得られた個々の口腔バイオフィーム細菌の知見を活かして、集合体としての口腔バイオフィームの病原性獲得過程を解明することが必須である。そこで申請者は「炎症反応誘発能はあるが過酸化水素を産生しない菌が、炎症反応誘発能はないが過酸化水素を産生する菌と共存した場合、他の菌が産生した過酸化水素を利用して自らのヒト動脈内皮細胞への侵入能を高め、内皮細胞における炎症反応を増大させ、同時に後者の菌は他の菌に過酸化水素を提供することによって炎症反応増大に寄与し、集合体としての病原性を獲得する」という仮説を立て本研究を実施することとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症反応誘発能はあるが過酸化水素を産生しない口腔レンサ球菌と炎症反応誘発能はないが過酸化水素を産生する口腔レンサ球菌が共存した場合の (1) 菌のヒト動脈内皮細胞殺傷能、(2) 菌の増殖能、(3) 菌の内皮細胞への侵入能、(4) 内皮細胞のサイトカイン (IL-6、IL-8、MCP-1) 産生、(5) 内皮細胞のパターン認識受容体 (TLR2、NOD2) 発現を調べ、異なる特性の菌の複合体のヒト動脈内皮細胞における炎症反応誘発を検討することである。炎症反応誘導能はあるが過酸化水素を産生しない菌が、他の菌が産生した過酸化水素を利用して自らのヒト動脈内皮細胞への侵入能力を高め、より強い炎症反応誘導能を発揮する結果を予測して研究を開始した。

## 3. 研究の方法

申請者はこれまで明らかにした口腔バイオフィーム細菌の特性に基づき (Nagata *et al.* Mol. Oral Microbiol., 2011)、炎症反応誘発能はあるが過酸化水素を産生しない口腔バイオフィーム細菌として *Streptococcus mutans* を、炎症反応誘発能はないが過酸化水素を産生する口腔バイオフィーム細菌として *Streptococcus oralis* を用いた。

### (1) 菌のヒト動脈内皮細胞 (HAEC) 殺傷能

5% CO<sub>2</sub> 下で *S. mutans* および *S. oralis* と HAEC を共培養し、HAEC の生存を倒立型顕微鏡による形態観察、トリパンプルーアッセイ、乳酸脱水素酵素アッセイを行い、菌による細胞傷害を判定した。異なる HAEC と細菌数比 (MOI) で実験を行い、HAEC 単独の場合と比較した。

### (2) 菌の増殖能

2 菌種をそれぞれ単独あるいは共存した状態で、5% CO<sub>2</sub> 下で Humedia-EG2 培地にて培養した。4 時間後 BHI 寒天培地に播種し、48 時間後に菌のコロニー数を計測した。

### (3) 菌の HAEC への侵入能

HAEC を 4 時間、2 菌種それぞれ単独、あるいは同時に異なる MOI の 2 菌種で刺激した後、HAEC 表面に存在する菌は抗生剤で殺傷した。HAEC を 0.1% Tween 20 で破壊し、細胞内に侵入した菌を回収、BHI 寒天培地にて嫌氣的に培養した。48 時間後にコロニー形態の違いから各々の菌を識別し、各菌のコロニー数を計測、これを HAEC に侵入した菌数とした。

#### (4) 菌刺激時の HAEC のパターン認識受容体発現

2 菌種それぞれ単独、あるいは同時に異なる MOI の 2 菌種で HAEC を 4 時間刺激、あるいは 4 時間後に HAEC 表面に存在する菌を抗生剤で殺傷した後、さらに 24 時間 HAEC を刺激した。回収した HAEC から total RNA を抽出した。HAEC の TLR2 および NOD2 mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で定量し、非感染 HAEC を対照として相対定量解析を行い、発現量を比較した。

#### (5) 菌刺激時の HAEC のサイトカイン発現

2 菌種それぞれ単独、あるいは同時に異なる MOI の 2 菌種で HAEC を 4 時間刺激後に HAEC 表面に存在する菌を抗生剤で殺傷した後、さらに 24 時間 HAEC を刺激した後、さらに 24 時間 HAEC を刺激した。HAEC 培養上清を回収し、培地中の IL-6 タンパク量を ELISA 法で定量し、非感染 HAEC、単独の菌で刺激した場合と比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 菌のヒト動脈内皮細胞 (HAEC) 殺傷能

*S. mutans* および *S. oralis* をそれぞれ単独、あるいは同時に HAEC と MOI=100 で 4 時間共培養した場合、HAEC は障害されなかった。一方 *S. oralis* を MOI=1000、あるいは *S. mutans* MOI=100 と *S. oralis* MOI=1000 を同時に HAEC と 4 時間共培養した場合、HAEC は殺傷された。

#### (2) 菌の増殖能

*S. mutans* を同数の *S. oralis* と 4 時間共培養した場合、*S. mutans* の増殖能は単独で培養した場合と変わらなかった。一方 *S. mutans* を 10 倍量の *S. oralis* と 4 時間共培養した場合は、*S. mutans* の増殖能は低下した。*S. oralis* の増殖能は今回用いた条件では *S. mutans* の共存によって影響を受けなかった。

#### (3) 菌の HAEC への侵入能

*S. mutans* の HAEC への侵入は、MOI=100 単独の場合と較べて、*S. oralis* MOI=1、10 と共に HAEC を刺激した場合は変わらなかった。しかしながら、*S. oralis* MOI=100 と共に培養した時に有意に増加した ( $P < 0.05$ )。一方、*S. oralis* MOI=1000 と共に培養した時は有意に減少した ( $P < 0.05$ )

(図 1)。*S. oralis* の HAEC への侵入においては、*S. mutans* との共培養による影響は認められなかった。

#### (4) 菌刺激時の HAEC のパターン認識受容体発現

*S. mutans* MOI=100 単独、*S. oralis* MOI=100 単独、MOI=1000 単独、*S. mutans* MOI=100 とそれぞれ *S. oralis* MOI=100、1000 で同時に HAEC を 4 時間刺激した場合、非刺激ヒト動脈内皮細胞と比べて、HAEC における TLR2 mRNA の発現に差は認められなかった。同じ菌種構成で 4 時間刺激後に HAEC 表面に存在する菌を抗生剤で殺傷し、HAEC 内に侵入している菌だけが生存できる状態にして、さらに 24 時間 HAEC を刺激した場合、非刺激ヒト動脈内皮細胞と比べて、*S. mutans* MOI=100 単独、*S. mutans* MOI=100 とそれぞれ *S. oralis* MOI=100 あるいは 1000 で同時に HAEC を刺激した場合において、TLR2 および NOD2 の発現は有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。しかしながら、*S. mutans* MOI=100 単独で刺激した場合と比べて、HAEC を *S. mutans* MOI=100 と *S. oralis* MOI=100 で同時に刺激した場合の HAEC における TLR2 および NOD2 の発現に差は認められず、*S. mutans* MOI=100 と *S. oralis* MOI=1000 で同時に刺激した場合は有意に減少していた ( $P < 0.05$ )。

#### (5) 菌刺激時の HAEC のサイトカイン産生

*S. mutans* MOI=100 単独、*S. oralis* MOI=100 単独、MOI=1000 単独、*S. mutans* MOI=100 とそれぞれ *S. oralis* MOI=100、1000 で同時に HAEC を 4 時間刺激後に HAEC 表面に存在する菌を抗生剤で殺傷し、HAEC 内に侵入している菌だけが生存できる状態にして、さらに 24 時間 HAEC を刺激した場合、非刺激ヒト動脈内皮細胞と比べて、*S. mutans* MOI=100 単独、*S. mutans* MOI=100 と *S. oralis* MOI=100 で同時に HAEC を刺激した場合において、IL-6 タンパクの産生は有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。しかしながら、*S. mutans* MOI=100 単独で刺激した場合と比べて、HAEC を *S. mutans* MOI=100 と *S. oralis* MOI=100 で同時に刺激した場合の HAEC における IL-6 タンパクの産生に差は認められず、*S. mutans* MOI=100 と *S. oralis* MOI=1000 で同時に刺激した場合は有意に減少していた ( $P < 0.05$ ) (図 2)。

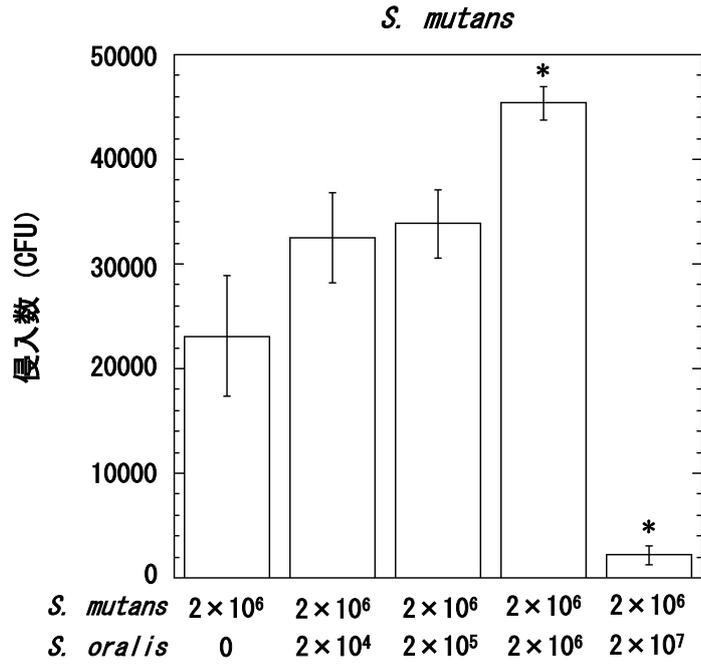


図 1

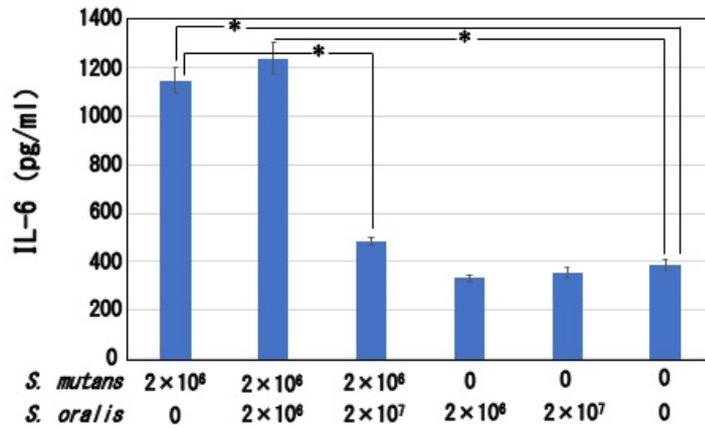


図 2

本研究より、*S. mutans* は過酸化水素を産生する *S. oralis* と共存することによって HAEC への侵入が増えたものの、共存する *S. oralis* の菌数が自己の数に対して 10 倍になると、自己の増殖能が抑制され、同時に HAEC が殺傷されることが明らかになった。これは低濃度では *S. oralis* の産生する過酸化水素が *S. mutans* の HAEC への侵入を促進し、高濃度になると *S. mutans* の増殖を阻害し、HAEC を殺傷したものと考えられる。我々は *S. mutans* による HAEC におけるサイトカインの産生誘導は HAEC に侵入する菌数に依存することを報告している (Nagata *et al.*, Mol. Oral Microbiol., 2011)。しかしながら、*S. oralis* との共存によって、この実験条件で認められた *S. mutans* の HAEC への侵入能の増加の程度では、HAEC における IL-6 産生の誘導は困難であった。むしろ *S. oralis* の産生する過酸化水素の量が増大すると、HAEC が殺傷されて、*S. mutans* 刺激により HAEC が発現した TLR2、NOD2、IL-6 は減少した。本研究の結果から、口腔バイオフィルムでは、様々な細菌間の相互作用により、菌の集合体としての病原性が獲得される可能性が示唆された。

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 Setoguchi D., Nagata E., and Oho T.	4. 巻 37
2. 論文標題 A novel mannose-containing sialoprotein adhesin involved in the binding of Candida albicans cells to DMBT1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol. Oral Microbiol.37	6. 最初と最後の頁 154-163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/omi.12374	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀬戸口大介、長田恵美、於保孝彦
2. 発表標題 Candida albicansのDMBT1への結合に関する研究
3. 学会等名 第69回日本口腔衛生学会・総会（福岡市）
4. 発表年 2020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	於保 孝彦  (Oho Takahiko)  (50160940)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授    (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
---------	---------