

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23076

研究課題名(和文) う蝕原性および歯周病原性細菌の混合感染による IgA 腎症発症メカニズムの追究

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of IgA nephropathy caused by mixed cariogenic and periodontopathogenic bacterial infections.

研究代表者

和唐 薫子 (Wato, Kaoruko)

大阪大学・歯学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：60876803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：IgA 腎症は、慢性糸球体腎炎の中で最も頻度が高く、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に関する詳細については不明な点が多い。本研究では、IgA 腎症患者唾液中より分離したコラーゲン結合能を有する *Streptococcus mutans* が IgA 腎症の発症に関連している可能性についてラット頸静脈投与モデルを用いて検討した。その結果、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* が血液中に侵入することで、IgA 腎症様腎炎が引き起こされる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、口腔細菌と腎臓疾患との関連性を検討した報告はほとんどなく、う蝕原性細菌と IgA 腎症の関連性の報告はない。本研究における腎臓疾患メカニズムを唾液中の細菌を用いて分析した点は、*S. mutans* の全身への影響に関する研究の一環と位置付けて遂行するところが学術的な特色であるとも言える。さらに、口腔細菌や歯科疾患に関連する IgA 腎症のメカニズムの一端が明らかになることで、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 the most frequently encountered form of chronic glomerulonephritis, a kidney disease with a poor prognosis that can progress to end-stage renal failure. However, details regarding the causes and mechanisms of IgA nephropathy are largely unknown. In this study, we used a rat jugular vein administration model to investigate the possibility that collagen-binding by *Streptococcus mutans* isolated from saliva of IgA nephropathy patients is associated with the development of that disease. The results indicate that IgA nephropathy-like nephritis may be caused by the invasion of collagen-binding *S. mutans* into the bloodstream.

研究分野：小児歯科

キーワード：IgA腎症 う蝕原性細菌 歯周病原性細菌 *Streptococcus mutans* *Campylobacter rectus*

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、我が国において、慢性糸球体腎炎の中で最も多く認められる腎炎であり、末期腎不全へと進展する予後不良な疾患である。これまで、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があり、近年では、口腔細菌と全身疾患との関連の可能性も考えられてきているが、その詳細に関する研究はほとんどなされていなかった。

申請者らは、う蝕原性細菌である *S. mutans* の中でコラーゲン結合能を有する菌株が様々な全身疾患の発症に関連するという知見をもとに、この菌株の腎臓への影響に関して検討を行い、IgA 腎症様腎炎の発症に関与している可能性を示してきた。さらに、近年、歯周病原性細菌の中で、*Campylobacter rectus* が IgA 腎症の口腔内唾液中から高頻度に検出されることが明らかとなり、病態の発症や症状の進展に関与している可能性が示唆された。

これらの知見から、様々な口腔細菌のうちコラーゲン結合能を有する *S. mutans* や *C. rectus* が IgA 腎症発症や病状の進展にどのようなメカニズムで関連しているかを検討することとなった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IgA 腎症患者口腔内唾液サンプル中より分離した菌株を、申請者らがこれまで構築した IgA 腎症様腎炎誘発ラットモデルを用いて、ラット頸静脈から直接血液中に投与して侵入させ、病態の発症を検討することである。これまでに申請者らが行った予備的検討の結果では、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* をラットの血液中に直接投与した場合、ある一定期間において、IgA 腎症様腎炎の誘発が認められた。本研究の独創的な点は、う蝕病原性細菌および歯周病原性細菌の混合感染を試み、それぞれの菌株を単独で感染した場合と比較して、病態の発症に相違が認められるかどうかを検討する点である。本研究の結果により、IgA 腎症の発症と口腔細菌との関連が見出されれば、それを広く社会に発信することで、疾患の発症や病状の増悪の防止につながれると考えている。

3. 研究の方法

1) 頸静脈投与ラットモデルを用いた検討

(1) 条件設定

IgA 腎症患者唾液中より分離したコラーゲン結合能を有する *S. mutans* SN74 株を 10 mL の Brain-Heart-Infusion (BHI) 液体培地にて 37 °C で 18 時間培養後に、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) を用いて $OD_{650} = 1.0$ (1×10^9 CFU/mL 相当) に調整し、その菌液を 10 倍希釈して 1×10^8 CFU/mL の菌液とした。Specific pathogen-free (SPF) の Sprague-Dawley (SD) 系ラット (4 週齢オス) に対して、頸静脈から PBS 溶液あるいは 1×10^8 CFU の *S. mutans* SN74 株を 1 回投与した。実験期間を通じて、両群に普通食 (MF Diet) と水分摂取が自由な環境下で飼育した。4 週齢、6 週齢、8 週齢、10 週齢および 12 週齢において体重の測定を行い、血液、尿および屠殺時に腎臓を摘出し、各期間での病態の評価を行った。

(2) 尿中成分および血清成分の分析

4 週齢、6 週齢、8 週齢、10 週齢および 12 週齢において、滅菌プラスチック容器内にラットを移し、排泄された尿を滅菌エッペンチューブに採取した。この検体を長浜ライフサイエンスラボラトリー (オリエンタル酵母工業) に送付し、尿タンパク値および尿クレアチニン値の分析を依頼した。その後、報告された値をもとに尿タンパク / 尿クレアチニン比を算出し、1 日の尿タンパク量として評価した。また、採血も同時に行い、4 °C で 10 分間、3,000 rpm の遠心分離を行うことによって血清を得た。血清アルブミン値 (血清 Alb 値)、血清尿素窒素値 (血清 BUN 値) および血清クレアチニン値 (血清 Cr 値) の分析を依頼した。

(3) 腎臓の組織学的評価

屠殺時に摘出した腎臓組織を PBS で希釈した 3.7%ホルムアルデヒドで固定した後、パラフィンにて包埋し 3 μm の組織切片を作製した。Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色を行い、光学顕微鏡 (BX53F) にて観察して糸球体のメサンギウム細胞と基質の増殖を評価した。また、メサンギウム増殖の定量的評価として、Suzuki ら (2008) の方法を参考に、50 個の糸球体を観察して、1 つの糸球体においてメサンギウム領域の細胞数が 3 個以上のものや管内増殖性変化が認められたものの割合を算出し、メサンギウム増殖スコアとした。

次に、腎臓組織切片の蛍光免疫染色を行った。組織切片はキシレンにて 20 分間 3 回の脱パラフィン処理後、100%エタノールに 3 分間 4 回、75%エタノールに 3 分間、滅菌蒸留水に 5 分間浸漬し、105 °C に設定した定温乾燥器で加熱した抗原賦活化液 (0.01 M, pH8.0) を 1 時間作用させた。トリス緩衝液にて洗浄を行い、Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution を 20 分間作用させた。その後、トリス緩衝液に 5 分間浸漬し、一次抗体として Purified Mouse Anti-Rat IgA 抗体、Anti-C3 抗体および血管内皮細胞のマーカーとなる Anti-CD34 抗体をそ

それぞれ用いて 4 で一晚湿潤箱中にて作用させた。さらに、トリス緩衝液にて 5 分間 3 回の洗浄を行った後、二次抗体として Donkey Anti-Mouse IgG H&L 抗体 (Alexa Fluor® 488) および Donkey Anti-Rabbit IgG H&L 抗体 (Alexa Fluor® 647) を使用し、遮光下において 3 時間作用させた。トリス緩衝液による 5 分間 3 回の洗浄を行い、核染色用色素を 5 分間作用させた。染色後の組織切片は、封入材 (Fluoromount/Plus™) およびカバーガラスを用いて封入した。組織の観察には、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700) を用いた。IgA および C3 沈着の陽性率は、沈着が認められたものを陽性とした百分率で算出した。

さらに、Hu ら (2018) の方法を用いて、透過型電子顕微鏡試料の作製を行った。摘出した腎臓組織を 2% グルタルアルデヒドおよび 2% パラホルムアルデヒドを PBS と混合して調整した混合溶液に 16~18 時間浸漬して前固定を行い、2% 四酸化オスmium液で後固定を 1.5 時間行った。そして、PBS にて洗浄を行い、段階的にエタノールで脱水して低粘度樹脂に包埋したものをから切片を作製した。その後、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛による染色を行い、透過型電子顕微鏡を用いて糸球体のメサンギウム領域を観察した。

2) IgA 腎症患者扁桃腺検体と唾液中の *C. rectus* の検出

(1) 対象検体の採取

2017 年 11 月から 2020 年 3 月にかけて兵庫医科大学病院腎臓内科にて IgA 腎症と診断を受けた患者 21 名を対象に扁桃腺 21 検体 (うち唾液も同時に採取できた患者 5 名) を採取し使用した。扁桃腺切除により摘出した扁桃腺検体および唾液検体は、後述する方法で細菌 DNA を抽出した。

(2) 扁桃腺および唾液検体の細菌 DNA の抽出

扁桃腺および唾液中の細菌 DNA は、100 mM NaCl と 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 250 μ l に再懸濁させた。遠心分離を用いて細胞を回収し、600 μ l の Cell Lysis Solution で溶解し、80 で 5 分間インキュベートし、続いて 3 μ l の RNase A (10 mg/ml) を加え、37 で 30 分間インキュベーションした。Protein Precipitation Solution を加え、20 秒ボルテックスした後、10,000 \times g で 3 分間遠心分離した。上清に 600 μ l のイソプロパノールを加え、遠心分離した。その後、沈殿物を 70% エタノールに懸濁し、遠心分離し、100 μ l の TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]) に合わせ研究に使用した。

(3) 歯周病菌の PCR 検出

扁桃腺および唾液中から抽出した細菌 DNA を用いて、*C. rectus* を検出するために特異的プライマーを用いて PCR を実施した。PCR の増幅は以下のサイクリングパラメーターで行った。95 での初期変性 4 分; 95 30 秒、58 30 秒、72 30 秒の 30 サイクル; 72 での最終伸長 7m。PCR 産物は 1.5% (w/v) Agarose gel-Tris-acetate-EDTA buffer で分取し、エチジウムブロミド (0.5 μ g/ml) で染色し紫外線下で可視化した。

4. 研究成果

1) 体重、血清および尿中成分の評価

PBS 群と SN74 群の体重および血清 Alb 値は、実験期間を通じて有意差は認められなかった。一方で、血清 BUN 値については、6 週齢において有意差は認めなかったが、8 週齢では SN74 群が PBS 群よりも有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。しかし、10 週齢および 12 週齢では、両群間に有意差は認められなかった。血清 Cr 値に関しては、8 週齢まで両群間に有意差を認めなかったが、10 週齢の SN74 群が PBS 群と比較して有意に低かった ($P < 0.05$)。その後、12 週齢では両群間に有意な差は認めなかった。また、両群の尿タンパク / 尿クレアチニン比は 6 週齢で有意差を認めなかったのに対して、8 週齢の SN74 群では PBS 群よりも有意に高い値を示した ($P < 0.001$)。しかし、10 週齢および 12 週齢においては両群間に有意な差は認められなかった。

2) 腎組織の病理組織学的評価

(1) PAS 染色による評価

投与前の 4 週齢では、メサンギウム細胞および基質の増殖を認めず、同様に PBS 群のどの週齢においても同様に増殖を認めなかった。SN74 群では 6 週齢で増殖を認めなかったのに対し、8 週齢および 10 週齢で認められた。一方で、12 週齢に関しては増殖を認めなかった。また、メサンギウム増殖スコアは 6 週齢で両群間に有意差を認めなかったが、8 週齢および 10 週齢の SN74 群で PBS 群と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。しかし、12 週齢においては両群間に有意な差は認められなかった。

(2) IgA および C3 抗体を用いた蛍光免疫染色による評価

4 週齢でメサンギウム領域への IgA の沈着は認めず、PBS 群においてもすべての週齢で沈着は認めなかった。SN74 群では、6 週齢で沈着を認めなかったのに対し、8 週齢および 10 週齢で IgA の沈着が観察された。また、その沈着部位は血管内皮とは異なりメサンギウム領域であることが確認された。しかし、12 週齢では沈着を認めなかった。C3 の沈着に関しても 4 週齢で認められず、どの週齢の PBS 群でも沈着を認めなかった。また、SN74 群では 6 週齢で沈着を認めず、8 週齢ではメサンギウム領域および血管内皮細胞に C3 の沈着が認められた。その後、10 週

齡においてメサングウム領域への沈着が観察され、12週齡では認められなかった。さらに、IgA沈着陽性率は10週齡のSN74群がPBS群より有意に高く($P < 0.05$)、C3の沈着陽性率も10週齡のSN74群でPBS群と比較して有意に高い値を示した($P < 0.01$)。一方で、SN74群の8週齡ではIgAおよびC3の沈着を認めたものの、両群間に有意差は認められなかった。

(3) 電子顕微鏡像による評価

10週齡のPBS群では、高電子密度沈着物を認めなかった。一方で、10週齡において、SN74群の傍メサングウム領域には高電子密度沈着物が認められ、上皮領域にはhump様の大型の高電子密度沈着物も観察された。

3) 唾液および扁桃腺検体中の歯周病菌の検出

*C. rectus*は、IgA腎症患者扁桃腺21検体中17検体で検出(81.0%)された。さらに、唾液も同時に採取できた患者5名に関して分析を行った結果、扁桃腺では、5検体中4検体(80.0%)、唾液中では5検体中5検体(100%)で*C. rectus*が検出され、扁桃腺と唾液中から高い陽性率を示す結果であった。

本研究の結果から、IgA腎症患者唾液中より分離したコラーゲン結合能を有する*S. mutans*が血液中に侵入することで、一過性のIgA腎症様腎炎を誘発することが明らかとなった。また、歯周病原性細菌の1つである、*C. rectus*はIgA腎症患者唾液中および扁桃腺組織中からも高頻度に同時に検出されることが明らかとなり、病態の発症に関連している可能性が示唆された。今後は、これら菌株の混合感染を行い、病態の発症や病状の悪化のメカニズムの解明をすすめていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Naka S, Wato K, Misaki T, Ito S, Nagasawa Y, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Intravenous administration of Streptococcus mutans induced 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 Naka S, Wato K, Misaki T, Ito S, Matsuoka D, Nagasawa Y, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K*	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 -

〔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 仲 周平, 松岡大貴, 和唐薫子, 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 Streptococcus mutans の菌体表層に発現するコラーゲン結合タンパクの IgA 腎症様腎炎発症への関連性
3. 学会等名 第 45 回 IgA 腎症研究会 学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	仲野 和彦 (Nakano Kazuhiko)		

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
研究協力者	野村 良太 (Nomura Ryota)		
研究協力者	仲野 道代 (Nakano Michiyo)		
研究協力者	仲 周平 (Naka Shuhei)		
研究協力者	三崎 太郎 (Misaki Taro)		
研究協力者	長澤 康行 (Nagasawa Yasuyuki)		

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