

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03120

研究課題名(和文) Cnm陽性う蝕原因細菌のPRIPを介した脳出血増悪機序解明による健康寿命の延伸

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cerebral hemorrhage aggravation via PRIP by Cnm-positive cariogenic bacteria to extend healthy life span

研究代表者

柴 秀樹 (Shiba, Hideki)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：60260668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：型コラーゲンに対してCnm陽性Streptococcus mutans (Sm)が付着することによって脳微小出血の悪化が引き起こされることおよび宿主細胞の異物排除機構であるオートファジーを担うPRIPのCnm陽性Smによる脳出血への関与の可能性を示した。Sm未検出群と比較し、Cnm陽性と陰性のSm群は微小脳出血増加傾向であること、Cnm陽性Sm群においては、他の2群と比較して、新規の微小脳出血増加の割合が増大していた。脳室周囲白質病変と深部皮質下白質病変においては、3群間で差はなかった。ゲノム解析から、微小脳出血に関わるSmの性状が多様性であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全死因の上位4番目である脳血管疾患のうち脳内出血(脳出血)の増悪にう蝕が強く関与するエビデンスを示し、う蝕予防を含めた歯科治療が健康寿命の延伸、QOLの向上に寄与する可能性を示した。今後、Smの多様性に着目し、Cnm以外の脳微小出血・脳卒中増悪因子を明らかにし、引き続き、それらの因子によるSmによる脳卒中発症メカニズムを解明することは、脳微小出血・脳卒中のリスク判定法の開発につながる。このように本研究の成果は、内閣府の未来投資戦略の一つである「新しい健康・医療・介護システム」を構築することにより、医療費の削減とともに、健康寿命を更に延伸し世界に先駆けて生涯現役社会を実現させることに合致する。

研究成果の概要(英文)：We have shown that the adhesion of Cnm(+) Streptococcus mutans (Sm) to type IV collagen causes worsening of cerebral microbleeding and that PRIP, which is responsible for autophagy to eliminate foreign substances in host cells, is possible to be involved in cerebral hemorrhage caused by Cnm(+)Sm. Cnm(+) and (-) S.m showed a trend toward increased microbleeding compared with S.m undetected, and the proportion of new microbleeding was increased in Cnm(+) S.m compared with the other two groups. There were no differences among the three groups in periventricular hyperintensity and deep and subcortical white matter hyperintensity. Genomic analysis has revealed a diversity of Sm properties related to microcerebral hemorrhage.

研究分野：歯科保存学

キーワード：Cnm陽性う蝕原因細菌 脳出血 PRIP セロタイプ 健康寿命の延伸

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患の日本の患者総数は111万5,000人であり、そのうち死亡者数は10万9,880人である(厚生労働省 平成29年患者調査の概況、平成29年人口動態統計(確定数)の概況)。1年間の死因別死亡総数では、脳血管疾患は全体の8.2%を占め、全死因の上位から3番目である(平成30年のデータでは4位)。脳血管疾患のうち、脳内出血(脳出血)による死亡数は3万2,654人である。医療費については、脳血管疾患の年間医療費は1兆8,085億円に上り、65歳以上の医療費が1兆4,618億円を占める。日本人の高齢化によって、脳血管疾患のリスクが高い高齢者数が増加しているといわれている。脳出血のリスクファクターには、高血圧、脂質代謝異常(肥満)、糖代謝異常(糖尿病)、非弁膜症性心房細動などがあることがわかってきたが、脳出血の3分の1は原因不明である。脳内微小出血は脳内出血の潜在的リスク因子である。したがって、脳内微小出血の発症、増悪に影響する因子を同定し、発症、増悪のメカニズムを解明することは重要である。

近年、コラーゲン結合タンパク質(Cnm)を持つ *Streptococcus mutans* (Sm) が微小脳出血(脳実質内出血)の発症、増悪に関与していることが報告された(Nat Commun, 2:485.2011)。Cnm陽性Smはコラーゲンに対して強い結合活性を示し、血小板の凝集を阻害すると考えられている。Cnm陽性Smが、血管損傷部位で最初に露出する基底膜の主成分であり、脈管のバリアーとして機能している型コラーゲンに結合していると予想される。またSmが歯髄、根尖部歯周組織に感染することで引き起こされる全身性の微弱な慢性炎症によって、脳内微小出血の治癒が阻害されるメカニズム(本研究では、Phospholipase C (PLC)-related catalytically inactive protein (PRIP)に着目した。)が存在すると推察した。

2. 研究の目的

全死因の上位4番目である脳血管疾患のうち脳内出血(脳出血)の増悪にう蝕が強く関与するエビデンスを示し、う蝕予防を含めた歯科治療が健康寿命の延伸、QOLの向上に寄与することを示すため、基礎研究と疫学研究の側面から、う蝕原因細菌による脳内出血(脳出血)の増悪メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

基礎研究 (in vitro と動物実験)

in vitro

- ・ typeIV コラーゲンに加えて、ラミニン、typeI コラーゲン、ファイブロネクチンのような他の細胞外基質への付着を調べた。各細胞外基質で予めCnm陽性Sm (WT株)あるいはCnmノックアウトSm (KO株)を処理した後、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)への付着実験を行い、細胞外基質付着特異性を確認する。Smの臨床分離株も実験に供した。
- ・ HUVEC、ヒト歯髄細胞(HPC)に 10^7 CFU/mlのSmを作用(3-24時間)させ、付着率を算出した。また、細胞を回収し、RNAを抽出後、Real-time PCRによって炎症性サイトカインとPRIPのmRNA発現を調べた。
- ・ HUVECのRNA sequenceを行った。

動物実験

- ・ Cnm陽性Sm (WT株)とCnmノックアウトSm (KO株)を歯内感染させたラット脳出血モデルからの脳を組織計測学および免疫組織化学的に評価した。
- ・ 脳内におけるCnmとPRIPを検出するために、それぞれの特異抗体(抗原:His-Tagタンパク質、ペプチド)を作製した。

疫学研究

- ・ 被験者(本大学病院脳神経内科外来患者)の口腔内プラークから、選択培地、PCR法、ゲノムシークエンスによって、Smを分離し、分離株の性状を解析した。

4. 研究成果

基礎研究 (in vitro と動物実験)

in vitro

1. 細胞外基質に対するSmの付着実験: 型コラーゲンに加えて、型コラーゲンとラミニンに対する付着については、WT株と比較し、KO株の各基質への付着率が減少していた。
2. HUVECとHPCに対する付着実験: WT株と比較し、KO株の各細胞への付着率が減少していた。
3. siRNAによって型コラーゲン発現をノックダウンした血管内皮細胞へのWT株の付着実験: 型コラーゲン発現細胞と比較し、付着率が減少していた。
4. 臨床分離株を用いた型コラーゲンと血管内皮細胞への付着実験: Cnm陰性株と比べて、陽性株の付着率は高かった。
5. PIP2のmRNAレベルでは、Cnm陽性Sm感染でPRIP2の発現が抑制されていた。また、HUVEC

の RNA sequence を行い、PLCL2 の発現に関連する炎症因子を見出した。

動物実験

1. 神経症状スコアを比較したところ、7 日目と 10 日目で、KO 株群と比較して WT 株群で有意なスコアの増加を認めた。
2. 大脳における出血斑数と拡張血管数は、KO 株群と比較して WT 株群で増加していた。
3. HE 染色画像において、WT 株群では出血像が観察できた。
4. さらに、Sm の蛍光免疫染色によって、Sm は血管内皮の裏打ちが崩壊した部位に沿って存在していた (図 1)。
5. WT 株群の血清中の IL-1 (脳出血に伴いその量が増加するサイトカイン) 値は、KO 株群より高かった。
6. Sm 感染時の Cnm と PRIP の発現について、特異抗体 (抗原: His-Tag タンパク質、ペプチド) を作製し、脳組織における局在の観察を試みたができなかった。

Sm が歯髄、根尖部歯周組織に感染することで引き起こされる全身性の微弱な慢性炎症によって、脳内微小出血の治癒が阻害されるメカニズムが存在し、そのメカニズムに PRIP 発現の抑制が関わる可能性が示唆された。

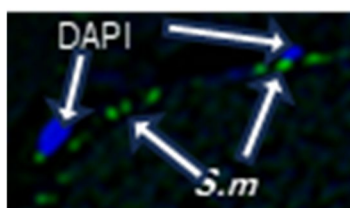


図 1 脳出血部位での Cnm 陽性 Sm の検出

疫学研究

広島大学疫学研究倫理審査委員会に "Cnm 陽性う蝕原因細菌による脳卒中発症・増悪機序の解明" という研究課題名で申請し、承認を得た (許可番号: E-2581) 後、その疫学研究を実施し、以下の結果を得た。

脳卒中 (脳梗塞と脳出血) での入院歴があり、現在、外来でフォロー中 (フォロー期間: 中央値 919 日、4 分位範囲 428-2025 日) の 68 名の患者 (表 1) において、患者の口腔プラークからミュータンス連鎖球菌選択培地と PCR 法で、Cnm 陽性 Sm と Cnm 陰性の Sm の分離を行った。

表 1 脳卒中既往患者の背景

	Cnm(+)Sm (n = 11)	Cnm(-) Sm (n = 32(*31))	Sm未検出 (n = 25 (**23))	p
年齢	74.5 ± 4.3	74.0 ± 8.4	72.4 ± 8.3	0.67
女性	2 (18.2)	5 (15.6)	6 (24.0)	0.72
脳卒中既往				0.64
脳出血	1 (9.1)	5 (15.6)	3 (12.0)	
脳梗塞	9 (81.8)	26 (81.3)	22 (88.0)	
両方	1 (9.1)	1 (3.1)	0 (0.0)	
歯科受診歴				0.50
なし	2 (18.2)	10 (32.3)*	4 (17.4)**	
不定期	1 (9.1)	5 (16.1)*	6 (26.1)**	
定期	8 (72.7)	16 (51.6)*	13 (56.5)**	
高血圧症	9 (81.8)	26 (81.3)	21 (84.0)	0.96
糖尿病	3 (27.3)	6 (18.8)	4 (16.0)	0.73
脂質異常症	8 (72.7)	22 (68.8)	13 (52.0)	0.33
慢性腎障害	4 (36.4)	11(34.4)	4 (16.0)	0.24
心房細動	2 (18.2)	5 (15.6)	6 (24.0)	0.56

患者数 (%)

Sm 未検出群と比較し、Cnm 陽性と陰性の Sm 群は微小脳出血増加傾向であること、Cnm 陽性 Sm 群においては、Sm 未検出群と Cnm 陰性 Sm 群と比較して、新規の微小脳出血増加の割合が増大していることが判明した。脳室周囲白質病変と深部皮質下白質病変においては、3 群間で差は

なかった。

また、選択培地と PCR 法によって分離した 24 株の Sm をゲノム解析した。24 株の内、Cnm 陽性 Sm は 5 株であることを確認した (表 2)。複数のバクテリオシン遺伝子を有する Sm やバクテリオシン遺伝子を全く有していない Sm が存在した (表 2)。セロタイプによる分類では、セロタイプ c が 17 株、e が 2 株、k が 1 株、c、k が 2 株、Non-typable が 2 株であった (表 2)。このように Sm の性状の多様性が示された。

現在 29 株がゲノム解析中で、さらに、新規で 33 株はゲノム解析を行うため、DNA を精製中である。

新型コロナウイルス感染症の拡大のため、研究期間中のほとんど、感染対策上、配偶者を除く 3 親等以内の患者家族からのプラークを採取することはできなかつたため、Sm の垂直伝播を調べることはできなかつたが、研究期間の後半に 2 家族 (患者とは 1 親等の関係) から分離することができた。現在、家族内伝播の状況を確認するため genomic sequence 中である。

表 2 脳卒中既往患者から分離された Sm の多様性

Patient number: 51名 Isolated Sm: 24 isolates (PCR and genome sequence)		Cnm(+)	バクテリオシン (抗菌性ペプチド)			
Sm			I	IV	K8	Smb
Sm	24	5 (20.8)	4	9	2	5
Serotype c	17 (70.8)	2	3	8	2	5
Serotype e	2 (8.3)	1	1	0	0	0
Serotype k	1 (4.2)	1	0	0	0	0
Serotype c, k	2 (8.3)	1	0	1	0	0
Non-typable	2 (8.3)	0	0	0	0	0

患者数 (%)

研究成果のまとめ

全死因の上位 4 番目である脳血管疾患のうち脳内出血 (脳出血) の増悪にう蝕が強く関与する可能性を示した。

Sm の多様性に着目して、Sm の Cnm 以外の脳微小出血・脳卒中増悪因子を明らかにする必要性を示した。

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 Taniguchi Y, Ouhara K, Kitagawa M, Akutagawa K, Kawada-Matsuo M, Tamura T, Zhai R, Hamamoto Y, Kajiya M, Matsuda S, Maruyama H, Komatsuzawa H, Shiba H, Mizuno N.	4. 巻 210
2. 論文標題 Periapical lesion following Cnm-positive Streptococcus mutans pulp infection worsens cerebral hemorrhage onset in an SHRSP rat model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Exp Immunol.	6. 最初と最後の頁 321-330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cei/uxac094	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 谷口友梨、應原一久、北川雅恵、松尾美樹、濱本結太、加治屋幹人、松田真司、丸山博文、小松澤 均、柴 秀樹、水野智仁
2. 発表標題 Cnm陽性Streptococcus mutans 歯髄感染が脳出血を誘導するメカニズムの解明
3. 学会等名 日本歯科保存学会2022年度秋季学術大会（第157回）
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
研究分担者	武田 克浩 (Takeda Katsuhiro) (10452591)	広島大学・病院(歯)・講師 (15401)	
研究分担者	松尾 美樹 (Matsuo Miki) (20527048)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授 (15401)	
研究分担者	應原 一久 (Ouhara Kazuhisa) (80550425)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	

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	丸山 博文 (Maruyama Hirofumi) (90304443)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	

	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	水野 智仁 (Mizuno Noriyoshi)		
研究協力者	谷口 友梨 (Taniguchi Yuri)		
研究協力者	白輪地 聡美 (Shirawachi Satomi)		

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