

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16944

研究課題名(和文) Cnm陽性S. mutansの全ゲノム配列に基づく新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapies based on the DNA sequence of Cnm-positive S. mutans.

研究代表者

齊藤 聡 (Saito, Satoshi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医長

研究者番号：40732996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：S. mutansは最も頻度の多い、う蝕の原因となる細菌である。コラーゲン結合蛋白Cnmを菌体の表層で発現している、Cnm陽性S. mutansを保菌している患者は、そうでない患者に比べて脳出血が有意に多く見られることが明らかになっていた。今回私たちは、主に以下の3つの成果を得た。(1)Cnm陽性S. mutansが脳表の微小出血と関連することを示した。(2)Cnm陽性S. mutansを保有する脳卒中患者を多施設で登録するRAMESSES研究を完遂した。(3)Cnm陽性S. mutansのゲノム配列を解読し、Bリピート配列が血管基底膜への結合の重要配列であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疫学研究では古くから歯科疾患と脳神経疾患との関係が報告されているが、これまではその具体的な病態生理に関する理解が不十分であったこともあり、歯科-医科の連携はあまり注目されてこなかった。しかし本研究代表者らは、Cnm陽性S. mutansの口腔内感染が脳微小出血と密接に関連することを見出し、歯科疾患と脳神経疾患との関係の一端を明らかにした。これまでの実験結果を元にした計算では、Cnm陽性S. mutansへの治療介入が実現した場合、3万人/年の脳微小出血が予防可能と推定される。症候性脳出血の発症に関しても、約20%程度抑制できる可能性があり、本研究の将来性は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：We previously reported a high prevalence of intracerebral hemorrhage in individuals harboring Streptococcus mutans expressing Cnm, a collagen-binding protein found in the oral cavity. S. mutans is a major pathogen responsible for dental caries. In this project, we have achieved the following three main outcomes: (1) Demonstrated the association between Cnm-positive S. mutans and cerebral microbleeds not only in the deep area, but also in the lobar area. (2) Successfully completed patient enrollment in the multi-center prospective RAMESSES study, aiming to compare stroke patients with Cnm-positive S. mutans to those without. (3) Identified the B-repeat sequence of Cnm-positive S. mutans as crucial for binding to the vascular basement membrane.

研究分野：脳神経内科

キーワード：う蝕 脳小血管病 認知症 脳卒中 脳出血

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトは、数十兆個の細胞で構成され、ヒトの有するゲノム遺伝子数は数万個といわれている。一方、体内に存在する常在細菌の数も数十兆個であり、これらの細菌の有する遺伝子は百万を超える。すなわち我々の体内には、我々固有の遺伝子をはるかに上回る量の細菌固有の遺伝子が存在する。この細菌は、我々の健康状態に深く関係している。

口腔には約 700 種類の細菌が存在すると報告されている。消化管と並び、最も多くの細菌種が生息する器官である。歯垢 1 mg 中に 10 万~1 億個、唾液 1 ml 中には 1000~10 万個の細菌が存在する。歯科では、齲蝕（虫歯）と歯周病が 2 大疾患であるが、医科の立場から考えてみても、この 2 疾患は、生体内で最も頻度の多い感染症であると言う捉え方が可能である。

2011 年にコラーゲン結合タンパク（Cnm タンパク）を菌体表層に発現している *Streptococcus mutans*（以下 Cnm 陽性 *S. mutans*）を脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）などに静脈注射することによって、脳出血が誘発されることが報告された。*S. mutans* は通常、軟組織には結合し得ないが、Cnm 陽性 *S. mutans* は、象牙質を構成する 1 型コラーゲンや血管中膜の基底膜を構成する 4 型コラーゲンへの結合能を有する点が特徴である。この報告を契機に、Cnm 陽性 *S. mutans* と脳血管障害や認知症との関連が検証されるようになった。

S. mutans は、グラム陽性通性嫌気性のレンサ球菌であり、主要な齲蝕原性細菌として広く認識されている。約 8~9 割の *S. mutans* 分離株は *cnm* 遺伝子を有さず、SHRSP に静脈注射しても脳出血は発症しない（Cnm 陰性 *S. mutans*）。一方、脳出血との関連で注目を集めている Cnm 陽性 *S. mutans* は、コラーゲン結合ドメインと、リピート配列、そして LPXTG モチーフを基本構造とするコラーゲン結合タンパクを発現している点で、Cnm 陰性 *S. mutans* と異なっている。コラーゲン結合ドメインは、複数のグラム陽性菌に存在し、互いに相同性を有することが報告されている。リピート配列では TTTTE(K/A)P もしくは TTTE(A/S/T)P をコードする配列がおおよそ 6~25 回繰り返されている。LPXTG モチーフは細胞壁のペプチドグリカンとの結合に寄与すると考えられている。おおよそ本邦の脳出血患者の 20~30% で、Cnm 陽性 *S. mutans* が陽性と推測される。Cnm 陽性 *S. mutans* は、米国人・タイ人・フィンランド人等の分離株でもその存在が報告されている。

2. 研究の目的

近年 Cnm 陽性 *S. mutans* の口腔内感染が、①脳深部の小型脳出血と関連すること、②脳深部の微小出血発症の重大なリスクとなることが示されてきた。脳微小出血とは、脳内の小血管から僅かな赤血球が血管外へ流出する現象を指し、通常 MRI 画像によって同定される。

Cnm 陽性 *S. mutans* 保菌者では、MRI で描出される脳微小出血の平均個数が、Cnm 陽性 *S. mutans* 非保菌者に比べ有意に多い。しかし、Cnm 陽性 *S. mutans* 保菌者における脳微小出血の個数は決して一様ではなく、特に多数の脳微小出血が認められる亜群と、脳微小出血の個数が少ない（非保菌者と同等である）亜群に大別される。この背景として以下の 3 つの可能性が考えられる。

- ① 患者個々人の高血圧などの各種血管危険因子の違い
- ② 口腔内衛生状態および *S. mutans* の以外の口腔内細菌の影響
- ③ Cnm 陽性 *S. mutans* 株の違い

そこで我々は、①および②の解明を目指し、2018 年から日本国内の 17 の医療機関において、Cnm 陽性 *S. mutans* の有無と脳卒中、認知症との関連を前向きに検証する多施設共同観察研究（RAMESSES 研究）を実施した。また、③の解明のため、Cnm 陽性 *S. mutans* の全ゲノムを次世代シーケンサーで解析した。

3. 研究の方法

(1) Genomic study

本検討では Cnm 陽性 *S. mutans* を口腔内で保菌している 14 人の脳卒中患者の歯表面から採取したデンタルプラークを用いた。深部脳微小出血の数は、頭部 MRI T2*強調画像からカウントされた。バシトラシン及びスクロースを添加した Mitis-Salivarius 寒天培地に各検体を塗布し、37°C で 48 時間嫌気培養した。形態的に *S. mutans* と認められる岩状のコロニーを選択し、ブレインハートインフュージョン培地中でさらに 37°C で 48 時間嫌気培養した。次いで、遠心分離機を用いて、7000rpm で 10 分間遠心分離を行って上清を取り除き、菌体（沈殿）を回収した。回収した菌体から、DNA 抽出キットを用いて Genomic DNA を抽出した。抽出した Genomic DNA を、DNA Shearing チューブによって DNA 断片化し、SMR Tbell Template Prep Kit (PacBio 社) を用いて、シーケンス解析用の DNA ライブラリーを作製した。作製した DNA ライブラリーを用いて、一分子リアルタイム DNA シークエンサーにより全ゲノム配列情報を取得した。取得した配列情報について、アSEMBラーを用いてアSEMBル解析を行い、ゲノム配列を再構築した。遺伝子予測ソフトウェアを用いて、構築した全ゲノム配列上の遺伝子領域を予測し、そのアミノ酸配列を取得した。解析にあたり、脳深部微小出血を 2 個以上有する患者から採取された Cnm 陽性 *S. mutans* 株を悪性株（8 株）、微小出血が 1 個以下の患者由来の菌株を良性

株 (6 株) と定義した。

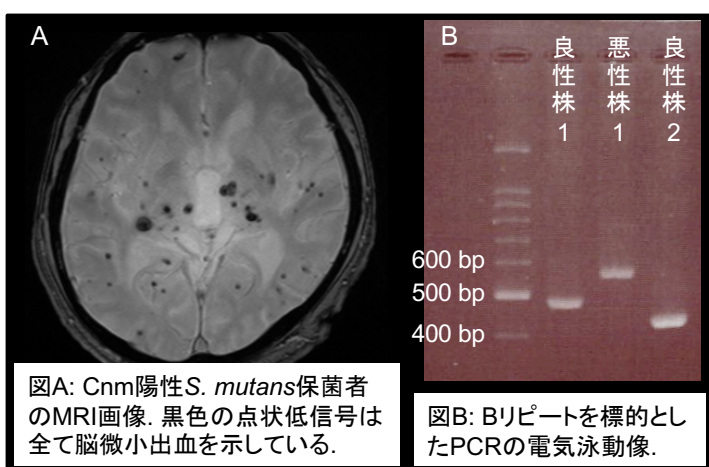
(2) Validation study

本検討では Cnm 陽性 *S. mutans* を口腔内で保菌している 60 人の脳卒中患者の歯表面から採取したデンタルプラークを用いた (悪性株 26 株, 良性株 34 株). 深部脳微小出血の数は, 頭部 MRI T2*強調画像からカウントされた. (1)と同様の方法で Cnm 陽性 *S. mutans* 株を菌体 (沈殿) を回収した. 回収した菌体を Phosphate Buffered Saline で 1 回洗浄し, DNA 抽出試薬に懸濁して, 56°C で 20 分間加熱後, ボルテックスし, さらに 100°C で 8 分加熱することで Genomic DNA を抽出した. リピート領域をコードする DNA を PCR で増幅し, 電気泳動にて, リピート領域をコードする DNA の塩基配列長を測定した. (1)のシーケンスにより, CNM アミノ酸配列中のリピート領域のアミノ酸配列長は 110 残基 であることがすでに明らかとなっている. したがって, リピート領域のアミノ酸配列長が 110 残基以下 (リピート配列が 15 回以下に短縮) のものを「リピート領域の短縮あり (リピート欠損株)」と評価した.

4. 研究成果

(1) Genomic study

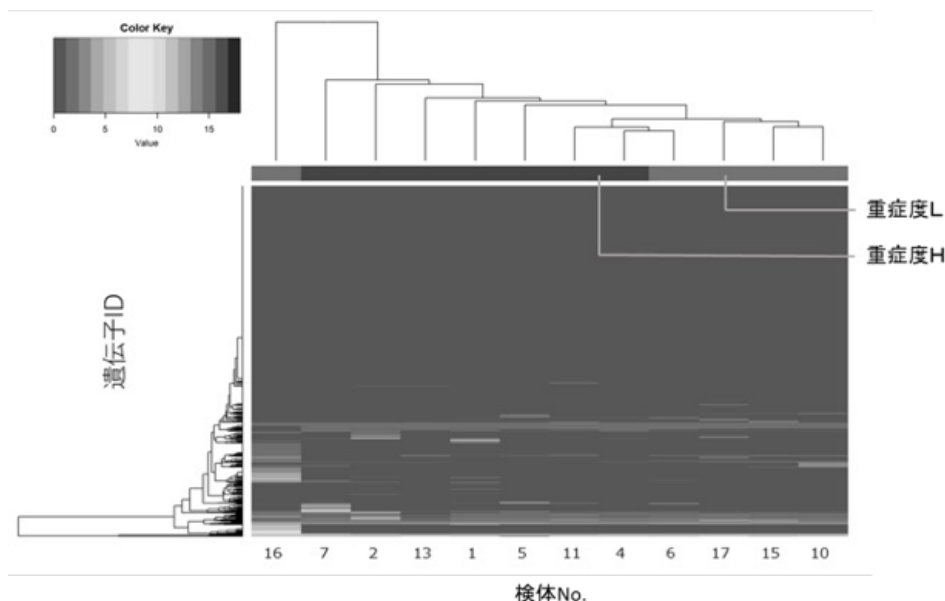
Cnm 陽性 *S. mutans* 悪性株と良性株の *cnm* 遺伝子配列を比較したところ, リピート配列長に違いが見いだされた. 具体的には, 良性株の多くで, このリピート配列が 15 回以下に短縮している (リピート欠損株である) ことを見出した (P=0.015).



遺伝子ID	検体No.																
	4	5	6	7	13	15	10	11	1	2	16	17					
K00001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
K00003	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1					
K00005	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2					
K00009	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00013	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00014	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00016	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1					
K00031	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00052	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00053	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1					
K00054	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1					
K00057	1	1	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00058	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1					
K00059	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00067	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1					
K00068	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00075	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0					
K00077	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00088	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	1					
K00091	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1					
K00121	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1					
K00131	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
K00133	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1					

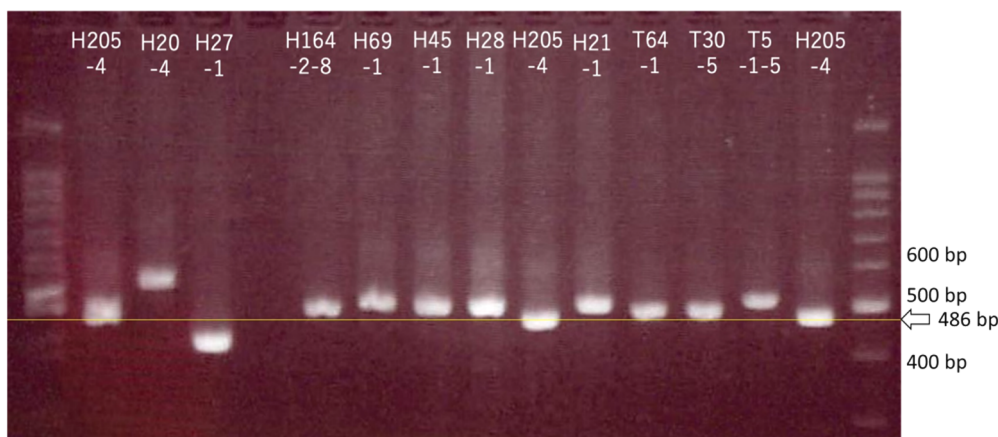
(2) ヒートマップ解析

(1)で用いた 14 検体のうち, 12 検体から取得したゲノム配列について, 相同性検索ソフトウェアを用いて, KEGG 遺伝子配列データベースに対しての相同性検索を行い, 機能分類ごとに ID を付与した. 各検体における各遺伝子 ID とその保有個数の一部を算出した (上記右表). この集計結果を用いて, 統計解析プログラムによりヒートマップ解析を行った. しかし, 遺伝子 ID とその数とでクラスタリングしたヒートマップ解析においても, 遺伝子 ID とその有無とでクラスタリングしたヒートマップ解析においても, 明確な関連は確認されなかった.



(3) Validation study

Cnm 陽性 *S. mutans* 株の中で、良性株では悪性株に比して高頻度に、リピート配列が短縮している（リピート欠損株である）ことを確認した (P=0.015).



(4) 臨床研究: 脳表の微小出血と Cnm 陽性 *S. mutans* との関連

本研究では、Validation study の過程で、Cnm 陽性 *S. mutans* と脳表の微小出血との関連が疑われた。これまで Cnm 陽性 *S. mutans* と脳深部の微小出血の関係が示されてきたが、脳表の微小出血との関連は示されてこなかった。脳表の微小出血は、脳深部の微小出血に比して、より密接に認知症と関連する。そこで本研究では、Cnm 陽性 *S. mutans* と脳微小出血、特に脳表の微小出血との関連について検討した。

本研究では、Cnm 陽性または Cnm 陰性の *S. mutans* の保菌を PCR で評価した。Cnm 陽性 *S. mutans* と脳微小出血の数、特に 10 個以上の脳微小出血の存在との関連を検討した。多変量解析では、脳微小出血に関連する、年齢、性別、高血圧、脳卒中の病型、NIHSS スコア、脳アミロイド血管症で調整した。

本研究では、326 人の *S. mutans* 保菌脳卒中患者を対象とした。これは過去最大の規模である。画像データのない 4 名の患者を除外し、72 人の Cnm 陽性 *S. mutans* 保菌患者と 250 人の Cnm 陰性の *S. mutans* 保菌患者で比較した。Cnm 陽性 *S. mutans* の保菌は、10 個以上の脳微小出血の存在と関連し (調整後オッズ比: 2.20 [1.18-4.10])、深部微小出血および脳表微小出血の数と独立して関連していた (調整後リスク比、深部微小出血: 1.61 [1.14-2.27], 脳表微小出血: 5.14 [2.78-9.51])。以上の研究より、口腔内の *S. mutans* が脳深部の微小出血のみならず、脳表の微小出血とも関連することが世界で示された。また、口腔内の Cnm 陽性 *S. mutans* を減少させることが、脳卒中や認知症の新しい治療法/予防法として有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hosoki Satoshi, Hattori Yorito, Saito Satoshi, Takegami Misa, Tonomura Shuichi, Yamamoto Yumi, Ikeda Shuhei, Hosomi Naohisa, Oishi Naoya, Morita Yoshiaki, Miyamoto Yoshihiro, Nomura Ryota, Nakano Kazuhiko, Ihara Masafumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Risk Assessment of Cnm-Positive Streptococcus mutans in Stroke Survivors (RAMESSES): Protocol for a Multicenter Prospective Cohort Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 816147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2022.816147	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 Saito Satoshi, Yamashiro Takayuki, Yamauchi Miho, Yamamoto Yumi, Noguchi Michio, Tomita Tsutomu, Kawakami Daisuke, Shikata Masamitsu, Tanaka Tomotaka, Ihara Masafumi	4. 巻 89
2. 論文標題 Complement 3 Is a Potential Biomarker for Cerebral Amyloid Angiopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 381 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-220494	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 -

1. 著者名 Saito Satoshi, Ono Kenjiro, Tanaka Masashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Amyloid- : Structure, Function, and Pathophysiological Significance in Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10275 ~ 10275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231810275	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 Kuriyama Nagato, Koyama Teruhide, Ozaki Etsuko, Saito Satoshi...	4. 巻 88
2. 論文標題 Association Between Cerebral Microbleeds and Circulating Levels of Mid-Regional Pro-Adrenomedullin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 731 ~ 741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-220195	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 -

1. 著者名 Ishiyama Hiroyuki, Tanaka Tomotaka, Saito Satoshi, Koyama Teruhide, Kitamura Akihiro, Inoue Manabu, Fukushima Naoya, Morita Yoshiaki, Koga Masatoshi, Toyoda Kazunori, Kuriyama Nagato, Urushitani Makoto, Ihara Masafumi	4. 巻 33
2. 論文標題 Plasma mid regional pro adrenomedullin: A biomarker of the ischemic penumbra in hyperacute stroke	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 e13110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bpa.13110	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 Ikeda Shuhei, Saito Satoshi...	4. 巻 -
2. 論文標題 Harboring Cnm expressing <i>Streptococcus mutans</i> in the oral cavity relates to both deep and lobar cerebral microbleeds	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ene.15720	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 該当する

1. 著者名 齊藤聡	4. 巻 5085
2. 論文標題 口腔内細菌が関わる脳卒中の特徴や機序は？	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本医事新報	6. 最初と最後の頁 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齊藤聡 猪原匡史
2. 発表標題 脳アミロイド血管症の成因と治療戦略
3. 学会等名 STROKE 2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齊藤 聡 猪原 匡史
2. 発表標題 脳アミロイド血管症の治療戦略
3. 学会等名 第12回日本脳血管・認知症学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤 聡 猪原 匡史
2. 発表標題 動脈硬化と脳アミロイド血管症の最前線
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
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

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