

令和 6 年 5 月 20 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：21K16961

研究課題名（和文）コラーゲン結合蛋白産生性齶蝕原性細菌の脳微小出血発症機序と革新的治療法開発

研究課題名（英文）Investigation of pathomechanism of cerebral microbleeds in collagen-binding protein-producing cariogenic bacteria

研究代表者

服部 頼都 (Hattori, Yorito)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・特任部長

研究者番号：60713849

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：齶蝕原性細菌のうちコラーゲン結合蛋白Cnmを発現するStreptococcus mutansの口内保有と脳内出血の関連が明らかとなっており、保有群では脳微小出血（CMBs）数が有意に多い。しかしながら、Cnm陽性S.mutans保有者におけるCMBsの重症度を何が規定しているのかは不明である。Cnm陽性S.mutans保有患者68名において、CnmのBリピート長が短い（<486 bp）患者のうち12名が良性株（CMBs 1）であり、Bリピート長が長い患者のうち25名が悪性株（CMBs 2）であった。Bリピートの長短が深部CMBsの重症度と関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bリピートの長短が深部CMBsの重症度と関連することが示唆され、Bリピート長の長い患者においては、より厳密な降圧療法を実施し、脳内出血の発症予防を社会的に啓発することが重要である。学術的には、Bリピート長の簡易測定法の開発、他のリピート伸長病のように核酸医薬などの開発が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：An association between oral carriage of the cariogenic bacterium Streptococcus mutans, which expresses the collagen-binding protein Cnm, and intracerebral hemorrhage has been demonstrated, with a significantly higher number of cerebral microbleeds (CMBs) in the carriers. However, it is unclear what determines the severity of CMBs in Cnm-positive S. mutans carriers. Among 68 Cnm-positive S. mutans carriers, 12 patients with short Cnm B repeat lengths (<486 bp) had benign strains (CMBs 1), and among those with long B repeat lengths, 25 had malignant strains (CMBs 2) The results suggest that B-repeat length is associated with the severity of deep CMBs.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：Cnm Streptococcus mutans 脳内出血 Bリピート

1. 研究開始当初の背景

脳内出血の一病型として、脳微小出血 (CMBs: cerebral microbleeds) がある。CMBs は、脳小血管病 (SVD: small vessel disease) の病型の一つであり、破綻した毛細血管から僅かな赤血球が血管外に流出し、T2*強調 MRI 上で径 10 mm 未満の円形の点状低信号域を呈する。健康人に比べて高頻度に、脳卒中患者、そして、アルツハイマー病、軽度認知機能障害患者にみられ、脳卒中の発症や認知機能低下に影響を及ぼす (Werring *et al. Brain*. 2004)。また、複数の CMBs は、より脳出血の発症率や再発率が高い。大脳深部に発症する deep CMBs は主に高血圧性細動脈症 (HA: hypertensive arteriopathy) 大脳皮質 皮質下に発症する lobar CMBs は脳アミロイド血管症 (CAA: cerebral amyloid angiopathy) が原因と考えられている。しかしながら、近年、CMBs や、もう 1 つの SVD 病型の虚血性大脳白質病変に対する生活習慣病の寄与度が、大血管病変に比して著しく低いことが明らかになった (Wardlaw JM, *et al. Neurology* 2014)。すなわち、CMBs の発症は主に未知の因子が関与しており、その診断・治療法の開発にもパラダイムシフトが必要と考えられるようになった (Ihara M, and Yamamoto Y. *Stroke*. 2016)。

近年、マイクロバイーム研究の飛躍により、共生細菌叢が様々な疾病の発症および重症化に関与する分子機構が解明され、脳卒中においても病態解明および新規予防・治療法の開発軸としてマイクロバイーム研究に対する期待が高まりつつある。我々は、齧蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* のうちコラーゲン結合蛋白 Cnm を発現する株の口内保有と脳内出血の関連を世界に先駆けて報告した。Cnm 陽性 *S. mutans* による高血圧性脳出血のオッズ比が他の脳卒中病型と比較して 7 倍と有意に高く、Cnm 陽性 *S. mutans* 保有群では deep CMBs の数が有意に多い (Tonomura *et al. Sci Rep*. 2016)。また、後方視的縦断研究で、CMBs 増加のリスク比が 13.9 倍であった (Hosoki *et al. Stroke*. 2020)。機序として、Cnm 陽性 *S. mutans* が菌血症を介して脳に直達、炎症を惹起することで脳小動脈血管構造の破綻を引き起こし、脳内出血に至る病態仮説を提唱されている (Nakano *et al. Nat Commun*. 2011)。

2. 研究の目的

Cnm 陽性 *S. mutans* を保有する患者においても、CMBs の発症の有無、CMBs 病変数はさまざまであり、何が CMBs の重症化を規定するかがいまだ不明である。*S. mutans* の Cnm タンパクの基本構造でコラーゲン結合ドメイン (A ドメイン) とそれに続く繰り返し配列の B リピート領域があり、この領域の機能は現時点で不明である。このため、B リピート長に注目して CMBs の重症化の機序を検討することが目的である。

3. 研究の方法

国立循環器病研究センターにおいて、頭部 MRI の撮影を行っている脳卒中入院患者から、デンタルプラークの採取を行った。デンタルプラークを採取した患者の頭部 MRI の解析 (深部 CMBs 数の定量) を行い、デンタルプラークを用いて、Cnm タンパク内の B リピート領域長を PCR で測定した。深部 CMBs 数 1 個以下を良性、深部 CMBs 数 2 個以上を悪性と規定した。Cnm 陽性 *S. mutans* の検出について、Mitis-Salivarius 寒天培地とブレインハートインフュージョン培地で嫌気培養され、回収した菌株から DNA を抽出した後、MKD プライマーを用いた PCR によって *S. mutans* を検出し、Cnm-1F (5'-GACAAAGAAATGAAAGAT GT-3')、1R (5'-GCA AAG ACTCTGTGCCCTGC-3') プライマーで Cnm タンパクの有無を検出した。(Sato *et al. J Dent Res*. 2004)。B リピート領域 PCR について、各患者の B リピート長を PCR で測定した。

4. 研究成果

Cnm 陽性 *S. mutans* 保有患者数は 68 名で、年齢の中央値は 71 歳 (四分位 60.25 ~ 79.00 歳) であり、男性は 41 名 (60.3%) であった。深部脳微小出血 (CMBs) を 2 個以上保有している患者は 27 名 (39.7%) であった。深部 CMBs の中央値は 1 (0 ~ 5) 個であった。その後、採取したデンタルプラークから、B リピート領域の塩基配列長を PCR によって測定した。486 bp を境に長または短と 2 群に分割し、B リピート長が短い患者が 14 名 (20.6%)、長い患者が 50 名 (73.5%) であった。4 名については、PCR のバンドが発現せず判定不能であった。脳 MRI の T2* 強調 MRI で CMBs をカウントして、深部 CMBs を 2 個以上保有している患者の *S. mutans* 株を悪性株、深部 CMBs を 1 個以下の場合を良性株としたところ、B リピート長が短い患者のうち 12 名が良性株 (B リピート長が短い患者群の 85.7%) であり、B リピート長が長い患者のうち 25 名 (B リピート長が長い患者群の 50%) が悪性株であった ($p = 0.023$)。このことから、B リピート長が長い Cnm を保有している患者は、CMBs を 2 個以上保有することと有意に関連しており、他のリピート伸長病と同様に、リピート長を標的とした治療法開発が期待される。

本研究によって、リピート長を測定することが CMBs の重症化リスクを予測できる可能性があることが明らかとなったため、特許申請して公開された (特開 2022-062814 【発明の名称】被験者の脳微小出血の重症化リスクを予測するための方法、脳微小出血の重症化リスクの高い被

験者をスクリーニングするための方法、及びそれらに用いるキット)

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 Hosoki S, Hattori Y, Saito S, Takegami M, Tonomura S, Yamamoto Y, Ikeda S, Oishi N, Morita Y, Miyamoto Y, Nomura R, Nakano K, Ihara M.	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 Front Neurol	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 Ikeda S, Saito S, Hosoki S, Tonomura S, Yamamoto Y, Ikenouchi H, Ishiyama H, Tanaka T, Hattori Y, Friedland RP, Carare RO, Kuriyama N, Yakushiji Y, Hara H, Koga M, Toyoda K, Nomura R, Takegami M, Nakano K, Ihara M.	4. 巻 30
2. 論文標題 Harboring Cnm-expressing Streptococcus mutans in the oral cavity relates to both deep and lobar cerebral microbleeds.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eur J Neurol	6. 最初と最後の頁 3487-3496
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 被験者の脳微小出血の重症化リスクを予測するための方法、脳微小出血の重症化リスクの高い被験者をスクリーニングするための方法、及びそれらに用いるキット	発明者 服部頼都、猪原匡史、齊藤聡、湯原悟志、西脇森衛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-062814	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------