

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390472

研究課題名(和文) 全身疾患発症に関与する口腔細菌の病原メカニズムの解明と予防法の開発

研究課題名(英文) Investigation of mechanism of systemic diseases caused by oral bacteria and development of preventive procedures

研究代表者

大嶋 隆(OOSHIMA, Takashi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：80116003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：近年、歯周病と各種の全身疾患との関連が注目されてきている。本研究では、主にう蝕(むし歯)の主要な病原細菌であるStreptococcus mutansのコラーゲン結合タンパクに焦点をあて、感染性心内膜炎、脳出血、炎症性腸炎および非アルコール性脂肪肝炎に対する病原性への関与を分析した。その結果、S. mutansのコラーゲン結合タンパクは、血液中に侵入した際にこれらの全身疾患を引き起こす要因になり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：Recently, the association of periodontitis with several systemic diseases has received attention. In the present study, the contribution of Streptococcus mutans, a major pathogen of dental caries, to the pathogenesis of infective endocarditis, cerebral hemorrhage, inflammatory bowel disease, and non-alcoholic steatohepatitis was investigated by focusing on cell surface collagen-binding proteins. Our results showed that S. mutans with collagen-binding proteins is possibly virulent for these diseases following invasion of the bloodstream.

研究分野：矯正・小児系歯学

科研費の分科・細目：小児歯科学

キーワード：口腔細菌 全身疾患 ミュータンスレンサ球菌 う蝕 感染性心内膜炎 脳出血 炎症性腸炎 非アルコール性脂肪肝炎

### 1. 研究開始当初の背景

歯科領域の二大疾患として、う蝕(むし歯)と歯周病が挙げられている。う蝕に関してはミュータンスレンサ球菌が主要な病原細菌とされ、歯周病に関しては複数のグラム陰性偏性嫌気性菌が関与するとされている。これまでに、口腔レンサ球菌が引き起こす感染性心内膜炎に対する様々な研究がなされてきたが、その他の全身疾患との関連についての研究は進んでいない。一方で、歯周病と全身疾患との関連に対する研究は進んでおり、歯周病と糖尿病や動脈硬化症等の全身疾患との関連が示されてきている。

### 2. 研究の目的

本研究では、主要なミュータンスレンサ球菌である *Streptococcus mutans* における全身に対する影響に関して検討することにした。特に、菌自体が持つ I 型コラーゲンへの結合能と菌体表層に存在するコラーゲン結合タンパク(Cnm タンパク)に着目して分析を行うことにした。

病原性を評価する上で、すでに動物モデルを確立している以下の疾患を対象とすることにした。

- ・感染性心内膜炎
- ・脳出血
- ・炎症性腸炎
- ・非アルコール性脂肪肝炎

さらに、各種全身疾患に対して病原性の高い菌株の存在を検討し、それらが引き起こす病原性を抑制する手立てを講じ得るための知見を得ることも目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究における動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認のもと行った。また、ヒトを対象とした研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会および関連施設の倫理委員会の承認のもと、協力者の同意を得て行った。

#### (1)供試菌として用いた *S. mutans* 株

本研究では、主に以下の供試菌を用いて検討を行った。

TW295 株：血液分離株(血清型 *k*) Cnm タンパク陽性

TW295CND 株：TW295 株において遺伝子操作によって Cnm タンパクのみを発現しないようにした株(Cnm 陰性)

TW871 株：血液分離株(血清型 *k*) Cnm 陽性

MT8148 株：標準株、口腔分離株(血清型 *c*) Cnm 陰性

SA31 株：口腔分離株(血清型 *k*) コラーゲン結合能はあるが Cnm 陰性

SA31CBD 株：SA31 株において遺伝子操作によって新規コラーゲン結合タンパクのみを発現しないようにした株

SA31comp 株：SA31CBD 株において遺伝子操作によって新規コラーゲン結合タンパクをコ

ードする遺伝子を発現するようにした株

#### (2)感染性心内膜炎に対する病原性の解析

*S. mutans* における新規コラーゲン結合タンパクの同定と性状に関する検討

コラーゲン結合能を保有する *S. mutans* の中に、SA31 株をはじめとして Cnm タンパクを保有しない菌株が存在したことから、新規コラーゲン結合タンパクの同定を試みた。また、健常者の口腔から分離された *S. mutans* 菌株におけるコラーゲン結合タンパク(Cnm タンパクおよび新規タンパク)陽性菌株の割合を求めるとともに、感染性心内膜炎患者から摘出された心臓弁組織におけるコラーゲン結合遺伝子の存在を分子生物学的分析により明らかにした。また、これらのコラーゲン結合能を保有する菌株のヒト臍帯静脈血管内皮細胞への付着侵入能についても評価を行った。さらに、血漿中に存在するフィブリノーゲンに着目し、傷害を受けた弁膜上に形成される血小板や菌等の塊(疣贅: ゆうぜい)の形成に関する検討を行った。

#### ラット心内膜炎モデルを用いた検討

8週齢の Sprague-Dawley 系ラットの頸静脈よりカテーテルを挿入することで心臓弁傷害を惹起し各菌株を感染させた後、全身状態の評価を行うとともに、1週間後に摘出した心臓検体の組織学的分析を行った。

#### (3)脳血管疾患に対する病原性の解析

#### マウス脳出血モデルを用いた検討

8週齢の Balb/c マウスの中大脳動脈に対して光化学的な傷害を与えた脳出血モデルを用いて、*S. mutans* 臨床分離株の脳出血への病原性について検討した。中大脳動脈へ傷害を与えると同時に頸静脈より供試菌を感染させ、24時間後に屠殺し摘出した脳組織をスライスしたものを画像として取り込み、出血領域の総面積を算定することで評価した。さらに、大腸菌を用いて作製したリコンビナント Cnm タンパクを用いて検討を行った。

脳血管疾患患者におけるコラーゲン結合タンパク陽性 *S. mutans* 株の保有率の検討

各種脳血管疾患のため入院している対象者から唾液の提供を受け、ミュータンスレンサ球菌の選択培地を用いて *S. mutans* を分離した。分離された *S. mutans* 株を培養し通法にてゲノム DNA を抽出した後、Cnm および Cbm タンパクをコードする *cnm* および *cbm* 遺伝子検出特異プライマーを用いた PCR 法にてその存在を検討した。*cnm* および *cbm* 遺伝子陽性株に関しては、I 型コラーゲンに対する結合能を測定した。

#### (4)炎症性腸疾患に対する病原性の解析

7週齢の C57BL/6J マウスにデキストラン硫酸ナトリウム(Dextran Sulfate Sodium; DSS)を実施期間中飲料水として自由摂取させることで軽度の腸炎を誘発させた後、供試菌を頸静脈より感染させて腸炎悪化の病態を評

価した。評価方法として、DSS 摂取時より毎日マウスの下痢および血便の状態を 0~3 でスコア化(Disease Activity Index; DAI)し、菌感染後 11 日目までの生存率を各群で比較した。また、摘出した腸組織の切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色によって、腸管粘膜上皮の損傷、びらん、潰瘍の形成および粘膜全層における炎症性変化を評価した。

#### (5)非アルコール性脂肪肝炎に対する病原性の解析

6 週齢の C57BL/6J マウスに高脂肪食飼料を 4 週間摂取させた後、供試菌を頸静脈より感染させ高脂肪食の摂取を続けた。菌感染 8 週および 12 週後に各群における体重の測定を行い屠殺した。その後、肝臓および内臓脂肪の摘出を行い、それらの重量の測定を行い各群で比較した。また、摘出した肝臓組織の切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色および Masson's-Trichrome (MT) 染色を行い、肝臓組織における脂肪の蓄積、炎症性変化および線維化の有無についての分析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)感染性心内膜炎に対する病原性

すでに明らかになっている *S. mutans* のコラーゲン結合タンパクである Cnm タンパクに加え、新規コラーゲン結合タンパクとして Cbm を同定した。健常者の口腔から分離された *S. mutans* のうち、Cnm 陽性菌株の割合は約 10% であるのに対し、Cbm 陽性菌株は約 2% と低いものの、Cnm 陽性菌株と比較して高いコラーゲン結合能を示した。また、分子生物学的手法を用いた分析により、感染性心内膜炎患者から摘出された心臓弁組織において Cbm をコードする *cbm* 遺伝子が高い頻度で検出された。これらのコラーゲン結合能を保有する菌株はヒト臍帯静脈内皮細胞への高い付着侵入能を示した。

*S. mutans* 菌株のうち、多くの SA31 株をはじめとした Cbm 陽性菌株でフィブリノーゲン添加時の凝集反応およびフィブリノーゲンへの結合能を示した。SA31CBD 株では現象は失われたのに対し、SA31comp 株ではフィブリノーゲンへの凝集能および結合能が認められた。

ラット心内膜炎モデルにおいて、コラーゲン結合タンパク陽性株を感染させたラットでは、心臓弁における菌塊を含む疣贅形成が認められた。一方で、コラーゲン結合タンパク欠失変異株を感染させたラットでは、心臓弁において疣贅の形成は認められなかった。

### (2)脳血管疾患に対する病原性

マウス脳出血モデルにおいて TW295 株をはじめとした Cnm 陽性株を感染させた群のマウスの出血面積は、MT8148 感染群および非感染群のマウスよりも有意に大きくなった。一方

で、TW295CND 株を感染させても、非感染群と同等の出血面積であることが分かった。さらに、リコンビナント Cnm タンパクを加えるだけでも、出血の悪化が容量依存的に認められることが示された。

脳血管疾患患者の口腔から分離された *S. mutans* 菌株の *cnm* 陽性率を検討すると、脳梗塞患者で 30%程度であり脳出血患者では 40-50%程度であることが示され、健常人の 10-20%よりも有意に高い割合であることが示された。

### (3)炎症性腸疾患に対する病原性

マウス腸炎モデルにおいて、TW295 株を頸静脈より感染させると、菌を感染させず DSS のみ摂取させたマウスおよび MT8148 株を感染させたマウスと比較して、有意な DAI の増加および有意な生存率の減少が認められ、腸炎の悪化が認められた。

また、TW295CND 株を感染させたマウスの DAI は TW295 株を感染させたマウスより有意に低い値を示し、DSS のみ摂取させたマウスおよび MT8148 株を感染させたマウスと同程度であった。また、TW295CND 株を感染させたマウスの生存率は、TW295 株を感染させたマウスと比較して有意に高い値を示した。

### (4)非アルコール性脂肪肝炎に対する病原性

非アルコール性脂肪肝炎マウスモデルにおいて、TW871 株感染群の体重および肝臓の重量は、非感染群および MT8148 株感染群と比較して有意に高い値を示した。一方で、内臓脂肪の重量はいずれの群において有意な差は認められなかった。

また、TW871 株感染群より摘出した肝臓組織の HE 染色像では、肝実質に顕著な脂肪蓄積や炎症性細胞の浸潤が認められ、MT 染色像では、肝実質および血管周囲に初発線維化像を認めた。非感染群および MT8148 株感染群ではこのような所見は認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)

Nakano K, Ooshima T. (2011) Common knowledge regarding prevention of infective endocarditis among general dentists in Japan. *J Cardiol.* 57:123-130.

Nakano K, Wada K, Nomura R, Nemoto H, Inaba H, Kojima A, Naka S, Hokamura K, Mukai T, Hata H, Toda K, Nakajima A, Umemura K, Kamisaki Y, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. (2011) Characterization of aortic aneurysm in cardiovascular disease patients harboring *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Dis.* 17:370-378.

Nomura R, Nakano K, Mäkelä K, Vaara M, Salo E, Alaluusua S, Ooshima T. (2011) Isolation and characterization of *Streptococcus mitis* from blood of child with osteomyelitis. *Int J Paediatr Dent.* 21:192-199.

Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K, Kudo C, Nomura R, Kojima A, Naka S, Muranaka Y, Thura M, Nakajima A, Masuda K, Speziale P, Shimada N, Amano A, Kamisaki Y, Tanaka T, Umemura K, Ooshima T. (2011) The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nat Commun.* 2:485.

Lapirattanakul J, Nakano K, Nomura R, Leelataweewud P, Chalernsarp N, Klaophimai A, Srisatjaluk R, Hamada S, Ooshima T. (2011) Multilocus sequence typing analysis of *Streptococcus mutans* strains with the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesin. *J Med Microbiol.* 60:1677-1684.

Nemoto H, Nakano K, Masuda K, Wada K, Ardin AC, Nomura R, Ooshima T. (2011) Distribution of oral streptococci highly resistant to amoxicillin in dental plaque specimens from Japanese children and adolescents. *J Med Microbiol.* 60:1853-1859.

Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S, Tohnai I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, Amano A, Okanoue T, Ooshima T, Nakajima A. (2012) Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 12:16.

Kojima A, Nakano K, Wada K, Takahashi H, Katayama K, Yoneda M, Higurashi T, Nomura R, Hokamura K, Muranaka Y, Matushashi N, Umemura K, Kamisaki Y, Nakajima A, Ooshima T. (2012) Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Sci Rep.* 2:332.

Masuda K, Nemoto H, Nakano K, Naka S, Nomura R, Ooshima T. (2012) Amoxicillin-resistant oral streptococci identified in dental plaque specimens from healthy Japanese adults. *J Cardiol.* 59:285-290.

Nomura R, Nakano K, Naka S, Nemoto H, Masuda K, Lapirattanakul J, Alaluusua S, Matsumoto M, Kawabata S, Ooshima T. (2012) Identification and

characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol.* 27:308-323.

Nomura R, Naka S, Nemoto H, Inagaki S, Taniguchi K, Ooshima T, Nakano K. (2013) Potential involvement of collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* in infective endocarditis. *Oral Dis.* 19:387-393.

Lapirattanakul J, Nomura R, Nemoto H, Naka S, Ooshima T, Nakano K. (2013) Multilocus sequence typing of *Streptococcus mutans* with *cbm* gene encoding a novel collagen-binding protein. *Arch Oral Biol.* 58:989-996.

Nomura R, Naka S, Nemoto H, Otsugu M, Nakamura S, Ooshima T, Nakano K. (2013) Potential high virulence for infective endocarditis in *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins but lacking PA expression. *Arch Oral Biol.* 58:1627-1634.

Nemoto H, Nomura R, Ooshima T, Nakano K. (2013) Distribution of amoxicillin-resistant oral streptococci in dental plaque specimens obtained from Japanese children and adolescents at risk for infective endocarditis. *J Cardiol.* 62:296-300.

Kojima A, Nomura R, Naka S, Okawa R, Ooshima T, Nakano K. (2013) Aggravation of inflammatory bowel diseases by oral streptococci. *Oral Dis.* (in press)

Naka S, Nomura R, Takashima Y, Okawa R, Ooshima T, Nakano K. (2013) A specific *Streptococcus mutans* strain aggravates non-alcoholic fatty liver disease. *Oral Dis.* (in press)

[学会発表](計40件)

Naka S, Nakano K, Nomura R, Ooshima T. Distribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding properties. 23rd meeting of IAPD (International Association of Paediatric Dentistry), 2011.6.15, Athens, Greece.

仲野和彦, 野村良太, 外村和也, 大橋寿彦, 細井泰志, 田中篤太郎, 梅村和夫, 大嶋隆 脳出血における増悪因子としてのう蝕病原細菌 *Streptococcus mutans* 第36回脳卒中学会総会 2011.7.31, 京都

野村良太, 仲野和彦, 仲周平, 大嶋隆 *Streptococcus mutans* のコラーゲン結合タンパクについて 第113回大阪大学歯学会例会 2012.1.12, 吹田

仲野和彦, 外村和也, 野村良太, 仲周平, 田中篤太郎, 梅村和夫, 大嶋隆  
う蝕病原細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層 PA タンパクの脳出血増悪因子としての役割 第 37 回脳卒中学会総会 2012.4.26, 福岡

外村和也, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋隆, 大橋寿彦, 細井泰志, 田中篤太郎, 梅村和夫 高病原性う蝕原因菌 *Streptococcus mutans* 由来のリコンビナントタンパクによって脳出血が増悪する 第37回脳卒中学会総会 2012.4.26, 福岡

小島あゆち, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋隆 *Streptococcus mutans* の引き起こす腸炎悪化における IFN- の役割に対する分析 第 50 回日本小児歯科学会記念大会, 2012.5.12, 東京

仲周平, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋隆 マウス非アルコール性脂肪肝炎モデルにおける *Porphyromonas gingivalis* 感染による肝臓組織での遺伝子発現 第 50 回日本小児歯科学会記念大会, 2012.5.12, 東京

野村良太, 仲野和彦, 仲周平, 大嶋隆 *Streptococcus mutans* の引き起こす脳出血増悪における 190kDa Protein antigen (PA) の役割 第 50 回日本小児歯科学会記念大会, 2012.5.12, 東京

野村良太, 仲周平, 仲野和彦, 大嶋隆 コラーゲン結合能を有する *Streptococcus mutans* 菌株の分布と血管内皮細胞への付着侵入能の解析 第22回レンサ球菌研究会, 2012.6.8, 吹田

Nomura R, Nakano K, Naka S, Ooshima T. Contribution of Protein antigen to *Streptococcus mutans*-induced cerebral hemorrhage deterioration. 90th IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2012.6.20, Iguacu falls, Brazil.

Naka S, Nakano K, Nomura R, Ooshima T. *Porphyromonas gingivalis* causes development of non-alcoholic steatohepatitis in mouse model. 90th IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2012.6.20, Iguacu falls, Brazil

Nakano K. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its association with systemic virulence. - Impact of Oral Health on the Systemic Health; Lessons from Human and Animal Studies - 60th JADR (Japanese Association of Dental Research) Meeting, 2012.12.15, Niigata, Japan

Nomura R, Nakano K. Cell surface proteins of *Streptococcus mutans* contribute to infective endocarditis. 60th JADR (Japanese Association for Dental Research) Meeting, 2012.12.15,

Niigata, Japan.

Kojima A, Nomura R, Ooshima T, Nakano K. Aggravation of inflammatory bowel diseases by *Streptococcus sanguinis*. 91st IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2013.3.20, Seattle, USA.

Naka S, Nomura R, Ooshima T, Nakano K. Specific *Streptococcus mutans* strain aggravates non-alcoholic fatty liver disease. 91st IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2013.3.20, Seattle, USA.

野村良太 *Streptococcus mutans* における新規コラーゲン結合タンパクの同定と感染性心内膜炎に対する病原性の解析 平成 24 年度日本小児歯科学会学術受賞講演 2013.5.23 岐阜

Naka S, Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Virulence of *Streptococcus mutans* strains for the development of Non-alcoholic fatty liver disease. 60th ORCA (European Organization of Caries Research) Congress, 2013.7.3, Liverpool, UK.

Nomura R, Otsugu M, Nakano K, Ooshima T. Involvement of cell surface protein expression patterns in interaction of *Streptococcus mutans* with vein endothelial cells. 60th ORCA (European Organization of Caries Research) Congress, 2013.7.3, Liverpool, UK.

仲野和彦 口腔細菌による歯科疾患と全身疾患 シンポジウム3「全身性疾患の危険因子としての口腔内常在細菌」第54回日本人間ドック学会, 2013.8.30 浜松

野村良太 小児歯科研究最前線 「齲蝕原性細菌の関与する全身疾患」第32回日本小児歯科学会中四国地方会大会 2013.11.24 岡山

〔図書〕(計1件)

Nakano K, Nakagawa I, Alaluusua S, Ooshima T. 2013. Molecular typing of *Streptococcus mutans*. In: Molecular Typing of Bacterial Infection. de Filipis I, McKee ML editors., Springer, New York, pp. 127-147.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pedo/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大嶋 隆 (OOSHIMA, Takashi)  
大阪大学・歯学研究科・招へい教員  
研究者番号：80116003

### (2) 研究分担者

仲野 和彦 (NAKANO, Kazuhiko)  
大阪大学・歯学研究科・准教授  
研究者番号：00379083

野村 良太 (NOMURA, Ryota)  
大阪大学・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：90437385

根本 浩利 (NEMOTO, Hirotoshi)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：80527226

### (3) 研究協力者

梅村 和夫 (UMEMURA, Kazuo)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40232912

田中 篤太郎 (TANAKA, Tokutaro)  
聖隷浜松病院・脳神経外科・部長  
研究者番号：90283366

外村 和也 (HOKAMURA, Kazuya)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90436965

仲 周平 (NAKA, Shuhei)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：10589774

浦田 あゆち (URATA, Ayuchi)  
大阪大学・歯学研究科・特任研究員  
研究者番号：10589772  
(発表論文中の表記は Kojima A)