

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 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：2012～2013

課題番号：24890123

研究課題名(和文) 口腔細菌に起因する炎症性腸炎悪化に対する小児歯科領域からの予防システムの構築

研究課題名(英文) Construction of preventive approaches in pediatric dentistry field for inflammatory bowel diseases caused by oral bacteri

研究代表者

浦田 あゆち (URATA, Ayuchi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：90589772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕(むし歯)の原因細菌である *Streptococcus mutans* は、血液中に侵入し病原性を呈することがあることで知られている。本研究では、マウス腸炎モデルを用いて *S. mutans* による炎症性腸疾患の悪化のメカニズムを検討した。その結果、*S. mutans* を取り込んだ肝臓実質細胞は、IFN- γ を産生し、AGPおよびアミロイドA1といったタンパクにより炎症反応を増幅させることで免疫機構の不均衡が生じ、腸炎の悪化につながる可能性が示唆された。またマウス腸炎の悪化が抗IFN- γ 中和抗体により緩和されることが示された。

研究成果の概要(英文)： *Streptococcus mutans*, a major pathogen of dental caries, is known to invade the bloodstream and sometimes causes systemic diseases. The present study investigated the possible mechanism of aggravation of inflammatory bowel diseases caused by *S. mutans*. We found that hepatocytes invaded by *S. mutans* produced IFN-gamma, while alpha-AGP and amyloid A1 enhanced inflammation and unbalanced the immune system, leading to aggravation of inflammatory bowel diseases. In addition, it was shown that the neutralizing antibody against IFN-gamma improved the condition.

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 炎症性腸疾患 IFN- γ サイトカイン マウスモデル 中和抗体

1. 研究開始当初の背景

う蝕の主要な病原細菌として知られている *Streptococcus mutans* は、抜歯などの侵襲的な歯科処置によって血液中に侵入すると、感染性心内膜炎を引き起こすことがあるとされている。これまでに、血液中に侵入した *S. mutans* の病原性に関して *in vitro* および *in vivo* において、様々な研究がなされてきた。ごく最近になって、コラーゲン結合タンパクを保有する *S. mutans* 菌株が、マウス中大脳動脈を損傷させた脳出血モデルにおいて、出血を悪化させるメカニズムの一端を担う可能性が示された。その研究の中で、屠殺後にマウス腹腔内を観察すると、コラーゲン結合タンパクを保有する *S. mutans* 菌株を頸静脈より感染させたマウスの多くに、腸管の異常出血を呈していた。このことから、*S. mutans* 菌株と炎症性腸疾患との関連について研究を始めるに至った。

炎症性腸疾患は、主として消化管に原因不明の炎症を起こす慢性かつ難治性の腸疾患の総称で、クローン病と潰瘍性腸疾患とに分類されている。臨床症状としては、血便、粘液便や腹痛などを特徴とし、寛解と再燃を慢性的に繰り返すことで知られている。患者数は毎年増加しており、累積患者数は10万人を超えているとされている。本疾患は10代後半から20代後半に発症することが多いが、近年若年齢化傾向を認め、0歳時の発症例も報告されており、小児領域でもまれな疾患ではなくなってきた。しかし、根本的な治療法は未だ確立されておらず、厚生労働省によって難病に指定されている。本疾患の原因は、局所的な免疫反応と環境因子の相互作用によるものと考えられているが、そのメカニズムは不明である。最近では、感受性の高まった宿主の粘膜細胞が、正常な腸内細菌に対して免疫応答することが発症の一因になっている可能性も示唆されている。一方、抗生物質の服用によって、罹患患者の臨床症状が改善することもあることから、本疾患と細菌との関連も示唆されている。これまでの腸炎に関する研究の多くは、腸内細菌に焦点を当てて腸管の内腔側からの関与を検討しており、他の感染経路からの細菌の侵入と病態発症、悪化の可能性についての研究はほとんど行われてこなかった。

2. 研究の目的

これまでに、デキストラン硫酸ナトリウム (Dextran Sulfate Sodium; DSS) を用いたマウス腸炎モデルにおいて、抜歯後菌血症患者の血液より分離されたコラーゲン結合タンパクを有する *S. mutans* TW295 株の血液中への投与によって腸炎悪化が誘発され、菌を感染させず DSS のみ摂取させたマウスと比較して、生存率を有意に減少させることを示した。また、この腸炎悪化は *S. mutans* 標準株である日本人小児口腔より分離された MT8148 株では生じないことが示された。さら

に、感染経路による影響について検討を加えたところ、TW295 株による腸炎悪化は経口感染によっては誘発されず、口腔内から血液を介して感染することにより生じる可能性が示された。さらに、血中に侵入した菌が、菌体表層に発現しているコラーゲン結合タンパクにより肝臓組織に付着し、肝臓実質細胞に直接的に取り込まれることより、様々なサイトカインが誘導され、免疫機構の不均衡を生じさせることによって腸炎が悪化する可能性が示唆された。そのメカニズムの一端に、炎症性サイトカインであるインターフェロン γ (IFN- γ) の関与が考えられたが、詳細はまだ不明であった。本研究では、この *S. mutans* 株による腸炎悪化における IFN- γ の役割を追究した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞による検討

ヒト肝臓癌培養細胞 (Human hepatoma cells; Huh-7) およびヒト正常肝臓実質細胞をそれぞれプレートに分注し、抗生物質を含まない専用培地で24時間培養後、供試菌を感染し、5時間後に細胞を回収した。回収した細胞は、RNAを抽出した後、逆転写反応により cDNA を合成し、IFN- γ 特異プライマーを用いて RT-PCR 法を行うことで、IFN- γ の mRNA の発現を調べた。

(2) マウス腸炎モデルにおける検討

デキストラン硫酸ナトリウムを用いたマウス腸炎モデルに、供試菌を頸静脈より感染させ、24時間後～7日後に腸組織および肝臓組織を摘出した。摘出した肝臓組織は、RNAを抽出した後、逆転写反応により cDNA を合成し、IFN- γ 特異プライマーを用いて RT-PCR 法を行うことで IFN- γ の mRNA の発現を調べた。また、肝臓組織中の IFN- γ 値の推移を経時的に評価するため、供試菌を感染させた24時間後、4日後、7日後のマウス肝臓組織から RNA を抽出した後、逆転写反応により cDNA を合成し、IFN- γ 特異プライマーを用いてリアルタイム RT-PCR を行い、その値を評価した。さらに、供試菌感染7日後に摘出した腸組織および肝臓組織に関しては、薄切切片を作製し、抗 IFN- γ ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行うことで、IFN- γ タンパクの発現を調べた。

(3) 抗 IFN- γ 中和抗体による検討

マウス腸炎モデルにおいて、TW295 株を感染させる24時間前に抗 IFN- γ 抗体 1 mg を腹腔内より投与した時の IFN- γ が腸炎悪化に及ぼす影響を検討した。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、供試菌感染7日後に摘出した腸組織および肝臓組織に関しては、薄切切片を作製し、抗

IFN- γ ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行うことで、IFN- γ タンパクの発現を調べた。

(4) 腸炎悪化に関連するその他のサイトカインの検討

マウス腸炎モデルにおいて、供試菌を頸静脈より感染させ、24 時間後に肝臓組織を摘出した。摘出した肝臓組織は、RNA を抽出した後に逆転写反応により cDNA を合成し、IFN- γ 以外にも一般的に腸炎の悪化に関与するとされているサイトカインである IL-13、IL-6、IL-12、IL-17、TNF- α および TGF- β についてそれぞれの特異プライマーを用いて RT-PCR 法を行うことで各種サイトカインの mRNA の発現を調べた。

(5) DNA マイクロアレイによる標的分子の抽出

マウス腸炎モデルにおいて、供試菌を頸静脈より感染させ、24 時間後に肝臓組織を摘出した。摘出した肝臓組織は、RNA を抽出した後、2 本鎖 DNA に転写し、アミノアリルラベルされた aRNA を調整、精製し、Cy3 および Cy5 とカップリングさせ、精製後、マウスのプローブとハイブリダイゼーションを行い、発現強度を測定した。また、抽出された標的分子に関して、供試菌を感染させて 7 日後に摘出したマウスの腸組織および肝臓組織の薄切切片を、ヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-eosin; HE) 染色し、観察した。さらに、標的分子のモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行うことで、タンパクの発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 肝臓組織における IFN- γ の発現

Huh-7 細胞においてもヒト肝臓実質細胞においても、また、感染 24 時間後に摘出したマウスの肝臓組織においても、TW295 株の感染により、IFN- γ の mRNA の発現が認められた。またこれらの発現は、*S. mutans* 標準株である MT8148 株を感染させた時と比較して有意な増加が認められた。さらに、TW295 株感染後からのマウス肝臓組織における IFN- γ 値の推移を経時的に評価したところ、感染 24 時間後に最も高く、7 日後には感染前と同じ値に戻った。一方で、MT8148 株感染後からのマウス肝臓組織における IFN- γ 値に関しては、ほとんど変化は認められなかった。また、TW295 株感染群マウスの腸組織および肝臓組織に対して免疫染色を施したところ、菌を感染させず DSS のみ摂取させた群と比較して IFN- γ の産生が亢進していた。

(2) 肝臓組織における腸炎悪化に関連するその他のサイトカインの発現

その他の腸炎に関与するとされているサイトカインの発現に関して、TW295 株感染群マウスの肝臓組織において、菌を感染させず

DSS のみ摂取させた群と比較して、IL-13、IL-6、IL-12、TNF- α および TGF- β の mRNA の発現の変化は認められなかった。一方で、IL-17 の mRNA の発現の上昇が認められた。しかしこの発現は、*S. mutans* 標準株である MT8148 株においても同様の結果となった。

(3) IFN- γ に関連する炎症増幅因子

TW295 株を感染させたマウスの肝臓組織と菌を感染させず DSS のみ摂取させたマウスの肝臓組織を比較した DNA マイクロアレイの結果より、IFN- γ の炎症増幅に関わるタンパクとして Alpha-1-acid glycoprotein (α AGP) の遺伝子発現は約 4.6 倍の増加が示され、アミロイド A1 の遺伝子発現に関しては、約 20 倍の増加が示された。 α AGP は、IFN- γ の炎症増幅経路の 1 つである p38MAPK 経路の下流に位置しており、主に肝臓で産生され、急性相で濃度は 2~5 倍になり、血清中に広がり、体液性免疫を促進し、細胞性免疫を抑制することで免疫調整を行っていることが知られている。一方で、アミロイド A1 は、炎症や組織傷害で発現する急性期タンパクの一つで、クローン病のバイオマーカーとして知られている。そこで、マウスの腸組織および肝臓組織を免疫組織染色したところ、TW295 株を感染させたマウスでは、菌を感染させず DSS のみ摂取させたコントロールと比較して、 α AGP タンパクおよびアミロイド A1 タンパクが高発現していることが明らかになった。

(4) マウス腸炎モデルにおける抗 IFN- γ 中和抗体の及ぼす影響

マウス腸炎モデルにおいて、抗 IFN- γ 中和抗体を投与した群では、TW295 株感染群と比較して有意な DAI の低下および有意な生存率の上昇が認められた。また、マウスの腸組織および肝臓組織を免疫組織染色すると、抗 IFN- γ 中和抗体を投与した群では、TW295 株感染群と比較して IFN- γ の産生が抑制されており、H-E 染色像において、腸粘膜組織の損傷も緩和されていた。

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) (発表論文等の氏名は Kojima A もしくは小島あゆち)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kojima A, Nakano K, Wada K, Takahashi H, Katayama K, Yoneda M, Higurashi T, Nomura R, Hokamura K, Muranaka Y, Matsushashi 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.
- ② Kojima A, Nomura R, Naka S, Okawa R,

Ooshima T, Nakano K. (2014)
Aggravation of inflammatory bowel
diseases by oral streptococci. Oral
Dis. 20:359-366.

〔学会発表〕（計4件）

- ① 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- γ 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
- ② 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.
- ③ 小島あゆち *Streptococcus mutans* が誘発する腸炎悪化メカニズムの解析 平成24年度日本小児歯科学会奨励賞受賞講演 2013.5.23 岐阜
- ④ 小島あゆち *Streptococcus mutans* が誘発する腸炎悪化メカニズムの解析 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

〔図書〕（計0件）

〔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

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：90589772