

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463112

研究課題名(和文) 過酸化水素から見えてくる口腔レンサ球菌の隠れた病原性

研究課題名(英文) Pathogenicity of hydrogen peroxide produced by oral streptococci

研究代表者

岡橋 暢夫 (Okahashi, Nobuo)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：40150180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミテイス群口腔レンサ球菌は口腔内で最多数を占める常在細菌であるが、抜歯などの際に菌血症や心内膜炎を引き起こすことがある。

本研究により、ミテイス群口腔レンサ球菌が感染防御の最前線で働くマクロファージや好中球に細胞死を引き起こすことが明らかになった。その病原因子を探索したところ、菌が産生する過酸化水素が細胞死を誘導するという意外な事実が明らかになった。この細胞死は炎症応答とは異なるメカニズムで引き起こされ、細胞内小器官であるリソゾームの傷害に関連していた。細菌由来の過酸化水素が細胞毒性を有することは、従来全く知られておらず、本研究の成果は口腔レンサ球菌の病原性の研究に一石を投じるものである。

研究成果の概要(英文)：Members of the oral mitis group streptococci are dominant colonizers of dental plaque, and causative agents of infective endocarditis.

In the present study, we found that these streptococci produce hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which is cytotoxic to human macrophages and neutrophils. The cytotoxic effect seemed to be independent of inflammatory responses, because H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not a potent stimulator of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  in macrophages. Our study reveals that streptococcal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays as a cytotoxin, and is implicated in the evasion of these streptococci from host defense system by inducing cell death of innate immune cells.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：ミテイス群口腔レンサ球菌 過酸化水素 マクロファージ 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

口腔レンサ球菌は口腔から最も多く分離される菌種であると共にデンタルプラークの重要な構成員である。なかでも、ミテイス群(mitis group) に属する口腔レンサ球菌は歯の萌出の際に最初に歯面に定着することが知られている。

一般的に口腔レンサ球菌の病原性は弱いですが、その中でミテイス群口腔レンサ球菌は比較的病原性が強く、抜歯や口腔外傷などによって血液中に入ると菌血症や感染性心内膜炎を起こす。特に、先天性の心臓疾患を抱えた小児は感染性心内膜炎のリスクが高く、抜歯などの治療には十分な注意を払う必要がある。疫学調査では菌血症の患者から分離されるミテイス群レンサ球菌の比率は A 群レンサ球菌や B 群レンサ球菌と比肩するほど多いと報告されており、菌血症の起原因菌としても決して無視できない存在である。さらに、近年、動脈硬化症でもアテローム性プラークからミテイス群レンサ球菌が高頻度で分離されるという報告もなされ、臨床上も重要な病原細菌であると認識されるようになってきている。このようにミテイス群レンサ球菌は常在細菌と病原細菌の 2 面性を持ち合わせているが、その病原因子についてはほとんど何も知られていない。

## 2. 研究の目的

申請者は、平成 23 年度-25 年度科研費研究により、ミテイス群口腔レンサ球菌に新規の病原因子として線毛 pili が存在することを明らかにした。この過程でこれらの口腔レンサ球菌がマクロファージの細胞死を促進することを見出し、それに関与する病原因子を探索した結果、菌が産生する過酸化水素がこの細胞死に関与しているという意外な可能性を見出した。

この発見は口腔レンサ球菌の病原因子に関する従来の常識を大きく変える可能性がある。果たして過酸化水素はミテイス群口腔レンサ球菌の隠れた病原因子なのだろうか？本申請では、この疑問に答えるべく様々な角度からミテイス群口腔レンサ球菌における過酸化水素の役割を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本申請では、ミテイス群口腔レンサ球菌として主に *S. oralis* を使用し、それが産生する過酸化水素の細胞傷害作用と病原性との関連を、マウスマクロファージ細胞株 RAW264 を用いて研究した。まず、*S. oralis* の過酸化水素産生欠損株を作製し、その細胞傷害性を LiveDead 蛍光染色法やトリパンブルー染色法により、親株と比較した。さらに、過酸化水素単独によるマクロファージ細

胞死の濃度依存性を調べ、細胞細胞死におけるアポトーシスやインフラマソーム、炎症応答の関与を検討した。

ついで好中球や上皮細胞などにおけるミテイス群レンサ球菌由来の過酸化水素の細胞傷害作用、さらに好中球の貪食作用への影響を解明した。

最後に、マクロファージの細胞内オルガネラを蛍光染色し、*S. oralis* 感染あるいは過酸化水素が細胞内オルガネラに与える作用を蛍光顕微鏡下で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 口腔レンサ球菌によるマクロファージの細胞死

マクロファージ細胞株 RAW 264 に口腔レンサ球菌を感染させ、蛍光染色法で細胞死の有無を調べた(図 1)。

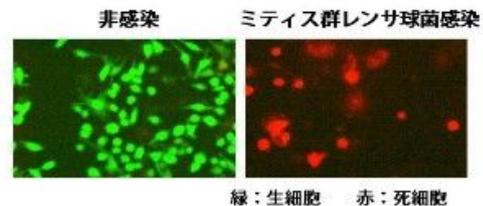


図1 ミテイス群口腔レンサ球菌感染によるマクロファージの細胞死

*S. oralis* や *S. sanguinis* などのミテイス群口腔レンサ球菌は細胞死を誘導したが、*S. mutans* や *S. salivarius* は影響を与えなかった。ミテイス群口腔レンサ球菌は過酸化水素を産生することが知られているが、この過酸化水素がマクロファージの細胞死に関与しているのかどうかを調べるため、感染実験の際に catalase を添加したところ、細胞死の抑制が認められた。さらに、*S. oralis* の過酸化水素産生に必須の *pyruvate oxidase* 遺伝子をノックアウトした変異株を作成してマクロファージに感染させた結果、親株と比較して細胞毒性が減少していた。また、過酸化水素単独の作用を検討すると、1 mM という低濃度でマクロファージの細胞死を誘導しうることが判明した。

### (2) ミテイス群レンサ球菌感染によるマクロファージの遺伝子発現変化

菌の感染によるマクロファージの遺伝子発現応答の変化をマイクロアレイ法を用いて調べた。過酸化水素産生欠損株と比較したところ、菌が産生する過酸化水素が細胞のストレス応答を引き起こすことが示唆された。

### (3) ミテイス群レンサ球菌感染が好中球に及ぼす作用

ミテイス群口腔レンサ球菌を好中球と反応させたところ、同菌が好中球に NETs (好中球細胞外トラップ: 核内 DNA を細胞外に放出することにより、周辺の細菌を捕捉殺菌

する)放出を誘導することが分かった。NETs 放出は引き起こされるものの、菌が産生する過酸化水素が好中球の細胞死を誘導するため、結果的には、菌に対する貪食・殺菌作用が低下することが明らかになった。

(4) ミティス群口腔レンサ球菌由来の過酸化水素が細胞内オルガネラに与える影響

最後に、*S. oralis* 由来の過酸化水素が細胞内オルガネラにどのような影響を与えるのかを蛍光染色法で観察した。その結果、過酸化水素がリソソームに傷害を与え、リソソーム内の加水分解酵素が細胞質に漏出することを示唆する結果が得られた(図2)。

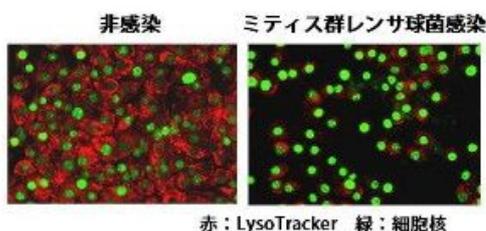


図2 ミティス群口腔レンサ球菌感染によるマクロファージのリソソーム傷害

これらの結果をまとめると、ミティス群口腔レンサ球菌はマクロファージに細胞死を誘導するが、それは菌が産生する過酸化水素によるものであることが示された。過酸化水素によってストレス応答が誘導されること、リソソームが傷害されることなどを含め、ミティス群口腔レンサ球菌感染によるマクロファージの細胞死誘導には、過酸化水素が重要な役割を果たしていると考えられる(図3)。

本研究により、過酸化水素の細胞傷害性がミティス群口腔レンサ球菌の感染戦略、生存戦略に大きな役割を果たしていることが明らかになった。

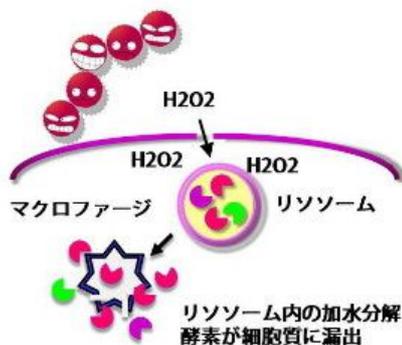


図3 結論 ミティス群口腔レンサ球菌由来の過酸化水素がマクロファージのリソソームに傷害を与えて細胞死を引き起こす

## 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 9件)

Honda-Ogawa M, Sumitomo T, Mori Y, Hamd DT, Ogawa T, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S. *Streptococcus pyogenes* endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q. Journal of Biological Chemistry. 2017. 292(10):4244-4254. doi: 10.1074/jbc.M116.749275 査読有

Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Li Y, Wada S, Yamaguchi M, Sumitomo T, Hayashi M, Kawabata S. *Streptococcus sanguinis* induces neutrophil cell death by production of hydrogen peroxide. PLoS One. 2017. e0172223. doi: 10.1371/journal.pone.0172223 査読有

Matsushima H, Kumagai Y, Vandebon A, Kataoka H, Kadena M, Fukamachi H, Arimoto T, Morisaki H, Fujiwara N, Okahashi N, Kuwata H. Microarray analysis of macrophage response to infection with *Streptococcus oralis* reveals the immunosuppressive effect of hydrogen peroxide. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017. 485:461-467. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.048.

Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Yamaguchi M, Kawabata S. Group A streptococcus exploits human plasminogen for bacterial translocation across epithelial barrier via tricellular tight junctions. Scientific Reports. 2016. 7:20069. doi: 10.1038/srep20069 査読有

Okahashi N, Nakata M, Kuwata H, Kawabata S. *Streptococcus oralis* induces lysosomal impairment of macrophages via bacterial hydrogen peroxide. Infection and Immunity. 2016. 84:2042-50. doi: 10.1128/IAI.00134-16 査読有

Yamaguchi M, Hirose Y, Nakata M, Uchiyama S, Yamaguchi Y, Goto K, Sumitomo T, Lewis AL, Kawabata S, Nizet V. Evolutionary inactivation of a sialidase in group B streptococcus. Scientific Reports. 2016. 6:28852. doi: 10.1038/srep28852 査読有

中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌と現行ワクチン. 日本歯科医師会雑誌. 2015. 68:16-17. URL: <https://www.jda.or.jp/jda/magazine/> 査読無

Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, Kawabata S. Hydrogen peroxide contributes to the

epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci. PLoS One. 2014. 9(1):e88136. doi:

10.1371/journal.pone.0088136. 査読有  
Morita C, Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Wada S, Yamashiro T, Hayashi M, Hamada S, Sumitomo T, Kawabata S. Cell wall-anchored nuclease of *Streptococcus sanguinis* contributes to escape from neutrophil extracellular trap-mediated bacteriocidal activity. PLoS One. 2014 9(8):e103125. doi: 10.1371/journal.pone.0103125. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

岡橋暢夫, 中田匡宣, 桑田啓貴, 川端重忠. *Streptococcus oralis* 由来の過酸化水素は

マクロファージのリソソームを傷害する. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会. 2016 年 8 月 24 日 26 日. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

松島瞳, 片岡嗣雄, 岡橋暢夫, 熊谷雄太郎, 井上美津子, 桑田啓貴. *Streptococcus oralis* 産生過酸化水素によるマクロファ

ージの炎症性遺伝子発現制御について. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年 3 月 19 日 21 日. 仙台国際センター(宮城県仙台市)  
住友倫子, 中田匡宣, 毛利泰士, 小川真理子, 山口雅也, 川端重忠. インフルエンザウイルス感染に伴い上皮表層に誘導される GP96 は化膿レンサ球菌の上皮細胞への付着を亢進させる. 2016 年 8 月 24 日 26 日. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

中田匡宣, 住友倫子, 山口雅也, 川端重忠. 環境温度の変化に対する肺炎球菌の適応と血中における菌体生存の関連. 2016 年 8 月 24 日 26 日. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

住友倫子, 中田匡宣, 山口雅也, 川端重忠. インフルエンザウイルス感染は化膿レンサ球菌の上皮バリア突破を亢進する. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年 3 月 19 日 21 日. 仙台国際センター(宮城県仙台市)  
岡橋暢夫, 中田匡宣, 住友倫子, 桜井敦朗, 桑田啓貴, 川端重忠. 口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素は上皮細胞に対する細胞傷害性を有する. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 2015 年 9 月 11 日 13 日. 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

松島瞳, 片岡嗣雄, 岡橋暢夫, 井上美津子, 桑田啓貴. ミティスレンサ球菌が産生する過酸化水素によるマクロファージ活性化制御. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 2015 年 9 月 11 日 13 日. 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

住岡龍一, 中田匡宣, 和田聖史, 岡橋暢夫, 住友倫子, 山口雅也, 林美加子, 川端重忠.

*Streptococcus sanguinis* 由来の過酸化水素は好中球に NETs を誘導する. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23 日 25 日. 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)  
中田匡宣, 住友倫子, 山口雅也, 川端重忠. 培養温度の変化が肺炎球菌の血中での生存に及ぼす影響. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23 日 25 日. 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

Sumitomo T, Nakata M, Yamaguchi M, Kawabata S. Group A streptococcus penetrates across epithelial barrier via tricellular tight junctions. 2015 年 5 月 30 日-6 月 2 日. 115th General Meeting of American Society for Microbiology. New Orleans, LA (USA).  
Morita C, Nakata M, Sumioka R, Okahashi N, Hamada S, Sumitomo T, Kawabata S. Role of *Streptococcus sanguinis* cell wall-anchored nuclease. XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Disease. 2014 November 9-12. Buenos Aires (Argentina).

Yamaguchi M, Yamaguchi Y, Nakata M, Henningham A, Olson J, Dahesh S, Cole J, Kawabata S, Varki A, Nizet V. Enzymatically active extracellular hyaluronidase (HylA) of group A streptococcus promotes intracellular survival and virulence. SFG and JSCR 2014 Joint Annual Meeting. 2014 November 16-19. Honolulu, HI (USA).

岡橋暢夫, 中田匡宣, 川端重忠. 口腔レンサ球菌 2 型線毛の分布とその機能. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会. 2014 年 9 月 25 日-27 日. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 和田聖史, 岡橋暢夫, 住友倫子, 山口雅也, 浜田茂幸, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* の細胞壁架橋型ヌクレアーゼの酵素活性. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会. 2014 年 9 月 25 日-27 日. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

〔図書〕(計 1 件)

桑田啓貴, 岡橋暢夫(訳) Sompayrac L. 東京化学同人. 「免疫のしくみ(第 4 版)」. 2015 年. 233 頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~cfos/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡橋 暢夫 (OKAHASHI Nobuo)  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：40150180

##### (2) 研究分担者

中田 匡宣 (NAKATA Masanobu)  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：90444497

##### (3) 連携研究者

桑田 啓貴 (KUWATA Hirotaka)  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号：60380523

##### (4) 研究協力者

( )