

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463166

研究課題名(和文) 口腔細菌による動脈硬化発症における先天性免疫因子gp-340の関与

研究課題名(英文) Involvement of innate immune factor gp-340 in atherosclerosis caused by oral bacteria

研究代表者

於保 孝彦(OHO, Takahiko)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：50160940

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)：口腔細菌による動脈硬化発症において、先天性免疫因子gp-340が関与する可能性を調べた。これまで、ヒト動脈内皮細胞の炎症誘導に関与することが認められているStreptococcus mutansを主に用いた。細菌を各種ヒト血管内皮細胞に作用させたところ、gp-340の遺伝子発現が上昇した。タンパク発現については、内皮細胞において対照と比較してやや強い発現を認めたが、培養上清中のレベルは検出限界以下であった。また菌と内皮細胞の共培養時は、菌体の凝集が観察された。

これらの結果から、口腔細菌の刺激によって血管内皮細胞からgp-340が誘導され、内皮細胞の炎症を生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the possibility that innate immune factor gp-340 is involved in the inflammatory process of atherosclerosis caused by oral bacteria. Human cariogenic bacterium Streptococcus mutans, which has been demonstrated to cause inflammation in human aortic endothelial cells, was mainly used. After co-culture, the bacterial cells induced up-regulation of gp-340 mRNA in several kinds of human vascular endothelial cells, but the expression of gp-340 protein was low. After co-culture with bacteria, endothelial cells showed slightly stronger expression of gp-340 protein, but supernatants of growth media did not contain sufficient amount of gp-340 for detection. During co-culture of bacterial cells and endothelial cells, bacterial cells were agglutinated to form clumps.

These results suggest that oral bacteria induce gp-340 in human vascular endothelial cells, which contributes to inflammation in endothelial cells.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔細菌 動脈硬化症 gp-340

### 1. 研究開始当初の背景

口腔内には無数の細菌が棲息しており、う蝕・歯周疾患のみならず様々な全身疾患を誘発することが明らかにされている。そのうち動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞などの日本人の死亡原因の多くを占める疾病の原因となる血管の変化である。近年の疫学研究では歯周疾患の有無と心臓脈管系疾患の罹患率との間に関連性があることが示されている。また臨床細菌学的にはヒトの動脈硬化病巣から口腔細菌が分離されたことから、口腔細菌感染と動脈硬化との関係が注目されている。我々は、口腔バイオフィーム細菌の中でも量的に多くを占め、また日常のブラッシングやフロッシング時に起こる一時的な菌血症に際して、もっとも多く検出される口腔レンサ球菌がヒト動脈内皮細胞への侵入および炎症反応誘導能力を持つことを示し、同菌の動脈硬化発症への関与を報告した (Nagata *et al.*, 2011)。

gp-340 は scavenger receptor cysteine-rich protein の一種で、先天性免疫因子として機能することが知られている。本タンパク質は様々な病原体と相互作用をし、呼吸器や消化器などの頻りに病原体と接する臓器の上皮で発現することが知られている。gp-340 は感染に際して発現が上昇し、広範囲の細菌に結合して凝集塊を作ることによって感染予防に寄与している。唾液中に分泌される salivary agglutinin (唾液凝集素) は gp-340 と同等のタンパク質であり、我々は、gp-340 がう蝕細菌である *Streptococcus mutans* を凝集させる能力を有することを報告した (Oho *et al.*, 1998)。また、その他多くのレンサ球菌や黄色ブドウ球菌との凝集反応も報告されている。一方、近年のレビューでは、gp-340 の持つ菌体凝集能力は感染予防に寄与するのみでなく、状況によっては疾病を促進する可能性があることが示唆されている。感染性心内膜炎病巣から多くの口腔レンサ球菌が検出されることはよく知られているが、Müller ら (2009) は、同疾患患者の組織を検索し、gp-340 の発現上昇と赤血球、血小板への gp-340 の結合を報告しており、このことは gp-340 が疾病促進作用をもつことを示唆している。このような背景から gp-340 が疾病促進作用をもつ可能性に着目し、口腔細菌による動脈硬化発症における gp-340 の関与を調べることとした。

### 2. 研究の目的

本研究では口腔バイオフィームを形成する細菌およびヒト血管内皮細胞を用いて、口腔細菌の内皮細胞における gp-340 の誘導能力および菌の内皮細胞への付着、凝集能に及ぼす gp-340 の影響を調べることとした。

これらの検索により、口腔細菌による動脈硬化発症における gp-340 の役割を明らかにすることができる。また、菌体と内皮細胞の反応を調べ、内皮細胞から gp-340 を誘導す

る菌体成分を特定し、その誘導機序を探ることにより、炎症の予防策の開発へと繋げることができる。

本研究の独創的な点は、従来考えられていた先天性免疫因子 gp-340 の病原排除作用という機能を見直し、動脈硬化発症の促進因子としてとらえる点である。本研究の発想は、動脈硬化発症の機序としてこれまで報告されていない新しいアイデアである。

### 3. 研究の方法

これまでに動脈硬化病巣から検出されている口腔レンサ球菌の一種であり、我々がヒト動脈内皮細胞の炎症を強く誘導することを確認した *Streptococcus mutans* を主として用いた。ヒトの口腔内から検出される *S. mutans* の血清型は、c、e、f の3つが知られているため、それぞれの血清型数株を用いた。また、他の口腔細菌として、う蝕細菌である *Streptococcus sobrinus*、代表的なレンサ球菌である *Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus oralis*、*Streptococcus gordonii*、歯周病細菌である *Fusobacterium nucleatum*、*Porphyromonas gingivalis* などを用いた。ヒト血管内皮細胞としては、大動脈内皮細胞、冠状動脈内皮細胞、および皮膚微小血管内皮細胞を用いた。

(1) 菌の刺激によるヒト血管内皮細胞からの gp-340 遺伝子発現誘導

菌体と内皮細胞を培養プレートを用いて、様々な混合比率 (MOI) で共培養した後、内皮細胞を回収した。

内皮細胞からトータル mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法で gp-340 の mRNA 発現を調べた。

(2) *S. mutans* によるヒト血管内皮細胞からの gp-340 タンパク発現誘導

菌体と内皮細胞の共培養後、内皮細胞を回収し、lysis buffer で溶解した後、遠心分離によって得た上清を用いて、ドットプロット法で gp-340 のタンパク発現を調べた。

共培養後の培地を回収し、その中に含まれる gp-340 レベルをドットプロット法で定量した。

コラーゲン被覆ガラスベースディッシュを用いて菌体と内皮細胞を共培養した後、内皮細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗 gp-340 抗体および蛍光標識 2 次抗体で免疫染色を行った。その後、蛍光顕微鏡および共晶点レーザー顕微鏡観察を行い、gp-340 のタンパク発現を調べた。

(3) *S. mutans* の血管内皮細胞への付着・凝集に及ぼす gp-340 の作用

菌と内皮細胞を共培養し、菌体の血管内皮細胞への付着・凝集を光学顕微鏡で経時的に観察した。

siRNA を感染させ gp-340 の発現を抑制し

た内皮細胞を作製した後、菌と共培養し、菌体の血管内皮細胞への付着・凝集を対照の siRNA を感染させた内皮細胞と比較観察した。

#### 4. 研究成果

(1) *S. mutans* によるヒト血管内皮細胞からの gp-340 遺伝子発現誘導

非刺激内皮細胞と比較して、大動脈内皮細胞では 1.2~12.2 倍、冠状動脈内皮細胞では 0.6~3.9 倍、および皮膚微小血管内皮細胞では 2.1~12.4 倍の gp-340 遺伝子発現誘導が認められた。菌株によって発現誘導能が異なっており、また、冠状動脈内皮細胞では、全体的に低い発現誘導を示した。

MOI については、1、10、100、1000 と増加するにつれ、gp-340 遺伝子発現は上昇する傾向を示したが、MOI=100、1000 では、内皮細胞の傷害が大きく長時間の共培養は困難であった。

(2) 他の口腔細菌によるヒト血管内皮細胞からの gp-340 遺伝子発現誘導

他の口腔レンサ球菌および歯周病細菌を用いた場合、gp-340 遺伝子発現レベルは、*S. mutans* で刺激した場合よりやや低い傾向にあった。

(3) *S. mutans* によるヒト血管内皮細胞からの gp-340 タンパク発現誘導

菌と共培養した内皮細胞を回収、溶解処理をし、細胞内の gp-340 発現レベルをドットプロット法で調べたところ、非刺激対照細胞と差は認められなかった。gp-340 は分泌型のタンパクであり、回収した細胞中には対照と同レベルのタンパクが存在することが認められた。

共培養後の内皮細胞を免疫染色した場合、gp-340 の発現は微弱であったが、非刺激対照細胞と比べてやや強いことが認められた。

共培養後の培地を回収し、その中に含まれる gp-340 を定量したところ、検出限界以下であった。回収培地の濃縮を行ったが、他の培地成分の影響で gp-340 の特異的な検出はできなかった。

(4) *S. mutans* の血管内皮細胞への付着・凝集に及ぼす gp-340 の作用

菌と内皮細胞を共培養すると、菌体は凝集塊を形成することが認められた。経時的に菌は増殖して菌体塊は大きくなり、培地中に浮遊していた。また、一部の菌体はプレート底部にて内皮細胞に付着している様子が観察された。

gp-340 の siRNA を感染させた内皮細胞を用いた場合、対照の siRNA を感染させた細胞と比較して、菌体の凝集に大きな差は認められなかった。

以上の結果から、口腔細菌とくにう蝕細菌

である *S. mutans* の刺激によりヒト血管内皮細胞からの gp-340 遺伝子発現が誘導されることが認められた。タンパクレベルでの発現は微弱であり、菌体刺激内皮細胞内の発現がやや上昇していることが認められたが、培地中のレベルは検出困難であった。遺伝子レベルとタンパクレベルの相違については、培養時間の検討等さらなる検索が必要である。一方、菌と内皮細胞の共培養時は、菌体が徐々に凝集塊を形成した。この凝集が菌の自己凝集によるのかどうかは、さらなる検討を行う予定である。今後は、gp-340 の発現に伴う内皮細胞の炎症因子の発現を調べ、動脈硬化発症との関連を明らかにする必要がある。

*S. mutans* 以外の口腔細菌は、内皮細胞からの gp-340 の発現を強くは誘導しなかった。これまで歯周病細菌と動脈硬化の関係は報告されているが、今回用いた菌株は血管内皮細胞からの gp-340 の発現には関与しないのかもしれない。*S. mutans* の数株は、血管内皮細胞から gp-340 遺伝子を強く誘導したが、誘導に関わる菌体成分の検索が必要である。この成分を特定することにより内皮細胞の炎症誘導機序を明らかにできれば、当該菌体成分の作用を阻害することによる予防法の開発へと繋げることができる。

#### 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 1 件)

Nagata, E., and Oho, T.: Invasive *Streptococcus mutans* induces inflammatory cytokine production in human aortic endothelial cells via regulation of intracellular TLR2 and NOD2. *Mol. Oral Microbiol.*, 32: 131-141, 2017. 査読有。

〔学会発表〕(計 3 件)

長田恵美、於保孝彦: ヒト歯垢刺激によるヒト動脈内皮細胞におけるパターン認識受容体の発現誘導. 第 65 回日本口腔衛生学会総会、2016 年 5 月 29 日、東京医科歯科大学 (東京都文京区)。

Nagata E., and Oho T.: *Streptococcus mutans* induces inflammatory cytokines in HAECs via intracellular TLR2. 94th General Session and Exhibition of International Association for Dental Research, Seoul (Korea), June 22-25, 2016.

長田恵美、於保孝彦: ヒト歯垢のヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生誘導能の検討. 第 66 回日本口腔衛生学会総会、2017 年 6 月 1 日、山形テルサ (山形県山形市)。

〔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://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Predent/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

於保 孝彦（OH0 Takahiko）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：50160940

(2)研究分担者

長田 恵美（NAGATA Emi）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：00304816