

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861835

研究課題名(和文)脳血管障害とコラーゲン結合蛋白を産生するう蝕原性細菌の関連の解明

研究課題名(英文)Relationship between Cnm-positive Streptococcus mutans and cerebral microbleeds in humans

研究代表者

渡邊 功(Watanabe, Isao)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10636525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、微小脳出血の発症にcnm遺伝子陽性のStreptococcus mutansが産生するCnmタンパクが関与している可能性を示した。279人の健診受診者において、cnm遺伝子陽性S. mutansの有無、コラーゲン結合能の有無、および微小脳出血の有無、認知機能低下の有無等を調査した。Cnm蛋白陽性群は、陰性群に比較して、微小脳出血陽性率が有意に高かった。コラーゲン結合能のあるS. mutans陽性群は、微小脳出血発症のリスクが高かった。深部微小脳出血の頻度が高く、認知機能低下に関連していた。本研究は口腔衛生と脳出血や認知機能低下の関連を示す結果となった。

研究成果の概要(英文)：We have shown that the surface Cnm protein expressed on cnm-positive Streptococcus mutans is involved in development of CMBs. Two-hundred ninety-seven community residents (70.0 years), were examined for the presence or absence of cnm-positive S. mutans in the saliva by PCR and collagen binding activity, CMBs, and cognitive function were evaluated. Cnm-positive Streptococcus mutans was detected more often among subjects with CMB ( $p < 0.01$ ) than those without. The risk of CMBs was significantly higher (odds ratio=12.3) in the group with than without S. mutans expressing collagen binding activity. Deep CMBs were more frequent (72%) and cognitive function was lower among subjects with cnm-positive S. mutans expressing collagen binding activity. This work supports the role of oral health in stroke and dementia and proposes a molecular mechanism for the interaction.

研究分野：歯科

キーワード：う蝕原性細菌 Cnmタンパク 無症候性脳出血

### 1. 研究開始当初の背景

近年、脳血管領域では、脳卒中のリスク要因として、口腔内に関する因子、たとえば、歯周病、残存歯数の減少、口腔内からの全身的な細菌感染が、動脈硬化疾患のリスクを高めることが報告されている。一方、脳 MRI 検査における新しい撮像方法として、脳出血の前段階とされる無症候性の cerebral microbleeds (CMBs) を、高い感度で検出できるようになった susceptibility-weighted imaging (SWI) がある。CMBs は、重要な脳卒中の予知マーカーとして注目されている。一方、血管性認知機能障害の独立した因子として関連することが知られており、その CMBs の発生部位により、認知機能低下への影響が異なることが報告されている。しかし、脳血管疾患の既往がない無症状の人々にみられる CMBs の臨床的意義、その CMBs がなぜ出現するのかといった成因は、まだ依然として十分に明らかとなっていない。

最近、脳出血の全く新しいリスク因子として、仲野らが *cnm* 遺伝子を有する *Streptococcus mutans* (*cnm*-positive *S. mutans*) を強制的に感染させたマウス動物モデルで、脳出血を誘発しやすいことを報告した。これは、歯科口腔領域で報告されてきたいくつかの臨床的な脳血管障害のリスク因子とは異なる新しい脳血管障害リスクとされる。この *S. mutans* 菌表面に存在するコラーゲン結合タンパクは、Cnm タンパクと呼ばれ、歯の象牙質を構成するコラーゲンと血管内皮のコラーゲン層の両方に親和性がある、とされる。Cnm タンパクを有する *S. mutans* は、血管内皮の損傷した部位で凝集し、Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現を亢進することで脳出血を増悪していることが報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、コラーゲン結合能を有する Cnm タンパクを発現する *S. mutans* が、CMBs を含む頭部 MRI 画像所見と関連しているのか、また、認知機能低下とどのように関連しているのか、Apolipoprotein E の関与の有無も含めて、歯科口腔項目を含む臨床情報を含めて検討を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 対象者および機関

我々は、健康診断に参加した地域住民 486 人のうち、2012 年 12 月から 2014 年 3 月に実施した本研究の検診内容に同意した 290 人を研究対象とした。対象者のうち、質問票の記入を終了していない 5 人、脳 MRI 検査を受けていない 2 人、無歯顎者または口腔乾燥症の 4 人を本研究より除外した。最終的に、我々は 279 人(男性 189、女性 90 人)を本研究の対象者とした。

#### (1) 生活習慣および身体計測に関する調査

#### 項目

生活習慣は、自記式質問票を使用した。この質問票は既往歴、内服状況、飲酒状況、喫煙歴、教育歴を含んでいた。Body mass index (BMI) (kg/m<sup>2</sup>) は身体測定結果より算出した。全身の動脈硬化の評価は brachial-to-ankle pulse wave velocity (baPWV) を用いて測定結果を得た。

#### (2) 歯科項目に関する調査項目

口腔内診査で、残存歯数、う蝕歯の有無、Community Periodontal Index (CPI) の項目に関して情報収集した。

#### (3) 血液生化学検査

血液検査にて、基本的な血算生化学検査に加えて、高感度 CRP (hs-CRP) および Apolipoprotein E (APOE) を測定した。

#### (4) *S. mutans* および Cnm タンパクの同定

口腔内細菌を採取する目的で、検診者全員に対して、唾液を採取し、同時に、スワブを用いて、歯牙周囲のプラークを擦過することによって採取した。採取した検体は、先行研究に習って、PCR にて *S. mutans* の同定や *cnm* 遺伝子の同定を行った。次いで、*cnm* 遺伝子を有する *S. mutans* の中でも、タンパク結合能を有する *S. mutans* を検出する為に、コラーゲン結合アッセイを行い、コラーゲン結合能が 10% 以上のものを Cnm タンパク結合能あり群とした。

#### (5) 頭部 MRI の評価

頭部 MRI 検査は、1.5-T スキャナを用いて実施された。画像評価に T1 強調画像 (Repetition Time [TR], 611 ms; Echo Time [TE], 13 ms)、T2 強調画像 (TR, 4431 ms; TE, 100 ms)、fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images (delay time [TI], 2200 ms; TR, 8000 ms; TE, 100 ms) を用いた。それぞれの画像の横断面像は 5 mm 間隔の画像をとって評価した。

FLAIR 画像もしくは T2 強調画像を用い、Fazekas 分類に基づいて白質病変 leukoaraiosis を Periventricular Hyperintensity (PVH) と Deep White matter Hyperintensity (DWMH) が半定量的に評価された。

CMBs は、脳 MRI 検査の SWI (3d-T1ffe 4mmTHK/Gapless) にて読影した。さらに、この CMBs は、脳内の CMBs の分布によって、deep、lobar、mixed type の 3 つに分類した。

#### (6) 高次認知機能検査

高次認知機能検査として、汎用されている the Mini-Mental State Examination (MMSE) および語彙想起課題の 2 つを用いた。

#### 解析方法

検査した各因子について、性別、および

CMBs、*cnm*-positive *S. mutans*、コラーゲン結合能の有無に分けて、群間比較した。これらの群間比較の検定には T 検定及び 2 検定を用いた。また、我々は、性別・年齢および生活習慣・身体測定値・口腔内診査所見・血液検査・頭部 MRI 所見の各項目を調整因子として、CMBs のリスクの評価を、多変量解析にて行った。尚、統計学的な有意水準は 0.05 とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 対象者の特性

対象者全体の平均年齢は  $70.0 \pm 6.1$  才であり、BMI は  $22.7 \pm 3.0$  kg/m<sup>2</sup> であり、MMSE スコアは  $28.3 \pm 2.1$  であった。APOE 4 アレルキャリアーかどうかの精査を行ったところ、58 人 (21.3%) で該当した。歯科所見では、残存歯数は平均  $22.7 \pm 7.5$  本であり、う蝕歯有所見者は 86 人 (30.8%)、CPI $\geq$  コード 3 は 77 人 (27.6%) であった。*S. mutans* および Cnm タンパクの同定においては、対象者の 93.5% に *S. mutans* を認め、*cnm*-positive *S. mutans* は 32.6%、コラーゲン結合能 (+) は 25.4% の対象者に認められた。頭部 MRI 所見では、CMBs の有所見は、73 人 (26.2%) でみられ、CMBs の局在性では deep 型 CMBs が一番多く見られた ( $n=44$ , 60.3%)。

男女間では、年齢、BMI、糖尿病の治療歴、飲酒歴、喫煙歴、教育歴、う蝕歯の有無、MMSE スコアにおいて有意に男性が高値であり、*S. mutans* の保有割合は有意に女性で高値であった。

##### (2) CMBs(+) の背景と認知機能について

CMBs(+) 群 ( $n=73$ ) と (-) 群 ( $n=206$ ) の比較したところ、CMBs(+) 群は有意に BMI が高く ( $p<0.05$ )、CPI $\geq$  コード 3 の割合が高く ( $p<0.05$ )、*cnm*-positive *S. mutans*-isolated の割合 ( $p<0.01$ )、コラーゲン結合能 (+) の割合 ( $p<0.01$ ) が高かった。しかし、高血圧症・高脂血症・糖尿病・抗血小板薬内服や hs-CRP などでは両群間に有意差を認めなかった。さらに、PVH と DWMH の分類でも両群間に、特記すべき有意差を認めなかった。CMBs の局在性は、deep 型 44 人 (60.3%)、lobar 型 20 人 (27.4%)、mixed 型 9 人 (12.3%) であった。尚、CMBs の左右差についても検討したが、本研究では特記すべき特徴は認められなかった。また、高次認知機能検査では、CMBs(+) 群は、MMSE スコアと語彙想起課題 “た” スコアで有意に低かった (いずれも、 $p<0.05$ )。CMBs 発症に関するロジスティック回帰分析結果において Crude 分析では、CPI $\geq$  コード 3 (OR=1.83, 95%CI: 1.03-3.25,  $p<0.05$ ) およびコラーゲン結合能 (+) (OR=9.11, 95%CI: 4.94-16.8,  $p<0.01$ ) が CMBs 発症のリスクとして有意に関連していた。関連する因子全てを投入した Model 2 では、唯一コラーゲン結合能 (+) が CMBs のリスクとして有意に関連していた (OR=12.3, 95%CI: 5.89-25.8,

$p<0.01$ )。

##### (3) *cnm*-positive *S. mutans* 群の背景と認知機能

*cnm*-positive 群 ( $n=91$ ) と *cnm*-negative 群 ( $n=188$ ) の 2 群間比較を行った。今回検討した対象者の特性においては、両群間の差異は認めなかった。*cnm*-positive *S. mutans* 群のうち、78.0% に、Cnm タンパクのコラーゲン結合能 (+) を認めた。

尚、頭部 MRI 上の CMBs の局在性は、*cnm*-positive 群では、deep 型 38 人 (70.4%)、lobar 型 9 人 (16.7%)、mixed 型 7 人 (13.0%) であり、両群間で局在性に有意差を認めた ( $p<0.01$ )。つまり、*cnm*-positive 群は deep 型 CMBs の割合が高く、*cnm*-negative 群は lobar 型 CMBs の割合が高かった。高次認知機能検査では、MMSE では有意差が認められなかった。一方、興味深いことに、語彙想起課題 “か” スコアが *cnm*-positive 群で、有意に低下していた ( $p<0.05$ )。なお、CMBs の局在性に関して、本研究では、明らかな左右差は認めなかった。

##### (4) コラーゲン結合能 (+) 群の背景と認知機能

コラーゲン結合能 (+) 群 ( $n=71$ ) と (-) 群 ( $n=208$ ) の比較をした。対象者の特性において、上記の *cnm*-positive *S. mutans* 同様に、両群間に大きな差異は認めなかったが、CMBs の局在性では、*cnm*-positive *S. mutans* の背景同様に、deep 型の割合が有意に多かった ( $p<0.01$ )。また、コラーゲン結合能 (+) 群は、有意にう蝕歯の有所見者の割合が高かった ( $p<0.01$ )。高次認知機能検査については、MMSE は相関が見られなかったが、興味深いことに、コラーゲン結合能 (+) 群は、語彙想起課題 “た”・“か” スコア両方において有意に低かった (“た”;  $p<0.05$ , “か”;  $p<0.01$ )。このことから、*cnm*-positive *S. mutans* に発現する Cnm タンパクがもつコラーゲン結合能 (+) そのものが、認知機能低下の間接的な増悪因子となりうる事が確認された。

#### 【結論】

*cnm*-positive *S. mutans* が発現するコラーゲン結合能コラーゲン結合能は、deep 型 CMBs の発症と関係しており、認知機能低下の独立したリスク因子であることが示唆された。コラーゲン結合能を有する Cnm タンパク陽性 *S. mutans* の保菌は、CMB と関連する認知機能低下の新しい要因であると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Miyatani F, Kuriyama N, Watanabe I, Nomura R, Nakano K, Matsui D, Ozaki E, Koyama T, Nishigaki M, Yamamoto T, Mizuno T, Tamura A, Akazawa K, Takada A, Takeda K, Yamada

K, Nakagawa M, Ihara M, Kanamura N, Friedland RP, Watanabe Y. Relationship between Cnm-positive *Streptococcus mutans* and cerebral microbleeds in humans. Oral Dis. 2015; 21(7): 886-93. (査読有)

〔学会発表〕(計 3件)

栗山長門、渡邊功、宮谷史太郎、松井大輔、尾崎悦子、仲野和彦、武田和夫、中川正法、水野敏樹、渡邊能行.

「Cnm-positive *S. mutans* 感染と脳内微小出血を有する認知機能低下が関連する」

第34回日本認知症学会学術集会

リンクステーションホテル青森(青森県青森市)

2015年10月2日~4日

渡邊功、宮谷史太郎、岩井浩明、松井大輔、加藤里佳、大道智恵、田中里佳、橋口加名栄、小山晃英、尾崎悦子、栗山長門、渡邊能行.

「残存歯数および相ひな一分類による咬合支持域と軽度認知機能低下の関連」

第74回日本公衆衛生学会総会

長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

2015年11月4日~6日

宮谷 史太郎、山本 俊郎、山本 健太、西垣 勝、大迫 文重、雨宮 傑、金村 成智.

「*cnm* 遺伝子陽性 *Streptococcus. mutans* を有する群の脳内微小出血発症のリスク因子の検討」

第69回日本口腔科学会学術集会

大阪国際会議場(大阪府大阪市)

2015年5月13日~15日

〔図書〕(計 0件)

〔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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 功 (WATANABE, Isao)

京都府立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10636525