The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Streptococcus mutans が引き起こす非アルコール性脂肪肝炎悪化メカニズムの追究
Author(s)	畠山, 理那
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61647
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　畠山　理那　）	
論文題名	*Streptococcus mutans* が引き起こす非アルコール性脂肪肝炎悪化メカニズムの追究

論文内容の要旨

【緒言】

脂肪肝は生活習慣病の一つとされており、肝臓における脂質合成が増加することで生じると考えられている。脂肪肝は飲酒との因果関係がよく知られているが、アルコール非摂取者においても、過剰栄養摂取に起因する脂肪肝が認められ、非アルコール性脂肪肝と呼ばれている。また、病状がさらに進行し、肝臓の炎症性変化や線維化が顕著になった状態は、非アルコール性脂肪肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis; NASH）と称されている。

これまでに、全身疾患と口腔細菌との関連について数多くの研究報告がなされており、最近になってう蝕病原性細菌である *Streptococcus mutans* が NASH の増悪化に関与している可能性が明らかになった。*S. mutans* の菌体表層には、分子量約 120 kDa のコラーゲン結合タンパク（Cnm タンパク）および分子量約 190 kDa の Protein Antigen（PA タンパク）など様々なタンパク抗原が存在し、う蝕における病原性と関与していることが知られている。コラーゲン結合タンパクである Cnm タンパクは、血管内皮細胞への付着および侵入に関与することが知られており、感染性心内膜炎を引き起こす重要な因子の一つとして認識されている。最近になって、Cnm タンパクを発現する *S. mutans* 株が血中に侵入することで、脳出血や炎症性腸炎が増悪化することも示されている。一方、PA タンパクは，SpaP、P1、antigen I/II とも称されており、*S. mutans* のスクロース非依存性の歯面への初期付着に関与することが知られている。また、PA タンパクは、*S. mutans* の菌体における疎水性結合に関連することが知られている。本研究では、*S. mutans* の Cnm タンパクおよび PA タンパクに着目し、*S. mutans* の関連する NASH 増悪化のメカニズムを検討することにした。

【方法】

1. マウス NASH モデルにおける検討

C57BL/6J マウス（6 週齢、オス）に 4 週間高脂肪食（high-fat diet; HFD）を摂取させた後、頸静脈より 1×10^7 CFU の *S. mutans* を投与する群と非投与の群に分けた。供試菌には *S. mutans* の血液分離株であり Cnm および PA タンパクの両方を発現する TW871 株、TW871 株の Cnm タンパクを欠失させた TW871CND 株、TW871 株の PA タンパクを欠失させた TW871PD 株を用いた。菌投与 12 週後に各群における体重を測定し、屠殺後に摘出した肝臓および内臓脂肪を観察して重量を測定した。また、各群より摘出した肝臓組織切片を作成し、Hematoxylin-Eosin（HE）染色および Masson’s-trichrome（MT）染色を行い、マウス肝臓における脂肪の蓄積、炎症性変化および線維化の有無の評価を行った。また、 抗 IFN-γ 抗体と抗メタロチオネイン抗体を用いた免疫染色を行った。さらに、4 週間 HFD を摂取させたマウスの頸静脈より TW871 株、TW871CND 株、TW871CND 株の相補株（TW871CNDcomp 株）、TW871PD 株、TW871PD 株の相補株（TW871PDcomp 株）および TW871 株の Cnm タンパクと PA タンパクの両方を欠失させた変異株（TW871CNPD 株）を投与し、12 週後の体重、肝重量および内臓脂肪重量を測定した。

2. 脂肪酸に対する *S. mutans* の結合能の検討

従来のヘキサデカンを用いた菌体における疎水性実験をもとに、不飽和脂肪酸（オレイン酸およびリノール酸）と飽和脂肪酸（パルミチン酸およびトリパルミチン酸）を使用して、*S. mutans* の発現する PA タンパクの有無による脂肪酸との結合能の違いを評価した。分析には、TW871 株、TW871CND 株および TW871PD 株に加えて、*S. mutans* の標準株である日本人小児口腔由来の MT8148 株（Cnm 陰性、PA 陽性）、抜歯後菌血症患者からの血液分離株である TW295 株（Cnm 陽性、PA 陰性）を使用した。

3. 肝臓細胞に対する *S. mutans* の付着能の検討

ヒト肝臓癌由来培養細胞である HepG2 細胞に対してオレイン酸を添加することにより、脂肪化を生じさせた。この脂肪化した細胞およびオレイン酸を添加せず通常通り培養した細胞を用いて、供試菌の付着能を検討した。検討には、

TW871 株、TW871CND 株、TW871PD 株、MT8148 株および TW295 株を使用した。

【結果】

1. マウス NASH モデルを用いた分析

TW871 株投与群の体重及び肝臓重量は、非投与群、TW871CND 株および TW871PD 株投与群と比較して有意に高い値を示した。また、TW871 株投与群より摘出した肝臓組織は、HE 染色において大滴性の脂肪化を認めた。さらに、MT 染色において肝実質および血管周囲に初発線維化像を認めた。一方で、非投与群、TW871CND 株および TW871PD 株投与群より採取した肝臓組織ではこれらの所見は認められなかった。また、免疫染色よりTW871 株投与群より摘出した肝臓組織におけるメタロチオネインの発現が他群と比較して多く認められた。一方で、IFN-γ の発現は TW871 株投与群より摘出した肝臓組織においてのみ認められた。次に、実験開始 16 週後のマウスより採取した肝臓の重量を測定したところ、TW871CNDcomp 株投与群および TW871PDcomp 株投与群の肝重量は、TW871CND 株投与群および TW871PD 株投与群の肝重量と比較して有意に高い値を示した。TW871CNPD 株投与群の肝重量は欠失株投与群の肝重量と比較して有意に低い値を示した。また、屠殺時のマウスより採取した内臓脂肪重量は、すべての群において有意差を認めなかった。

2. 脂肪酸と供試菌との結合能の分析

PA タンパクを発現している MT8148 株、TW871 株および TW871CND 株は、すべての脂肪酸と高い結合能を示した。一方で、PA タンパクを発現していない TW295 株および TW871PD 株は、ヘキサデカンおよび不飽和脂肪酸に対して低い結合能を示した。

3. 肝臓細胞と供試菌との付着の分析

Cnm タンパクを発現している TW295 株、TW871 株および TW871PD 株は、他の株と比較して有意に高い付着能を示した。一方で、オレイン酸を添加して脂肪化した肝臓細胞には、Cnm および PA タンパクの両方を発現する TW871 株が、他の株と比較して有意に高い付着能を示した。

【考察】

本研究の結果より、マウスモデルにおいて、Cnm および PA の両方の菌体表層タンパクを発現している *S. mutans* 株を投与させた場合に、肝臓組織において炎症性サイトカインである IFN-γ とメタロチオネインの発現が上昇し、NASH の病状は悪化を認めた。一方で、Cnm あるいは PA タンパクのいずれかしか発現していない菌株を投与した場合では、NASH の病状は悪化を認めないことが明らかになった。また、*S. mutans* の肝臓細胞や脂肪酸への結合において、Cnm および PA の両方のタンパクを発現している菌株では、Cnm タンパクを介して肝臓細胞に付着することと、PA タンパクを介して肝臓の脂肪酸と結合することで、肝臓への菌の付着が有意に増加することが明らかになった。これらのことから、*S. mutans* の引き起こす NASH 増悪化には Cnm および PA の両方の菌体表層タンパクが必要であることが示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　畠山　理那　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	仲野　和彦
	副 査　教授	川端　重忠
	副 査　准教授	北村　正博
	副 査　講師	高橋　雄介

論文審査の結果の要旨

本研究は、*Streptococcus mutans* の菌体表層に存在する Cnm タンパクおよび PA タンパクに着目し、*S. mutans* の引き起こす非アルコール性脂肪肝炎の増悪化メカニズムを検討したものである。その結果、血液中から侵入した Cnm 陽性 PA 陽性の *S. mutans* 株は肝臓組織に一定時間局在して炎症性サイトカインを誘導することで、非アルコール性脂肪肝炎の成立における Two-hit theory のうち 2nd hit の一要因として増悪化に関与するメカニズムの一端を明らかにした。

この結果は、未知であった非アルコール性脂肪肝炎増悪化における *S. mutans* の役割を明らかにするものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。