



Title	Streptococcus mutans の菌体表層構造と血液成分との反応による感染性心内膜炎病原メカニズムの解析
Author(s)	大継, 將寿
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61663
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (大継 将寿)

論文題名

Streptococcus mutans の菌体表層構造と血液成分との反応による感染性心内膜炎病原メカニズムの解析

論文内容の要旨

【緒言】

Streptococcus mutans は、齲蝕の主要な原因細菌であるとともに感染性心内膜炎の起炎菌であることが知られている。抜歯などの観血的処置の際に、血液中に侵入した *S. mutans* が弁膜傷害部位に付着し、疣贅と称される細菌塊を形成することで、弁組織の炎症および破壊を引き起こすとされている。また、疣贅形成には血液中のIV型コラーゲン、フィブリノーゲン、フィブロンекチンおよびビトロネクチンなどの細胞外マトリックスが関与することが知られている。

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 (Collagen-binding proteins; CBPs) が同定されており、Cnm と Cbm の 2 種類が存在する。Cnm 陽性の *S. mutans* 株は約 10~20 % の頻度で存在し、Cbm 陽性の *S. mutans* 株は約 2 % の頻度で存在していることが示されている。*S. mutans* の関連する感染性心内膜炎患者から摘出された心臓弁においては、CBP 陽性の菌株の存在が高頻度であることが明らかにされている。*S. mutans* におけるもう一つの主要な菌体表層タンパクとして、分子量約 190 kDa の PA が挙げられる。PA は菌面への初期付着に関与しており、*S. mutans* 菌株のうち 95%程度で発現していることが示されている。一方で、CBP 陽性菌株では PA を発現しない菌株が多数認められることが知られている。

本研究では、*S. mutans* 菌体表層の CBP および PA の発現パターンに着目し、フィブリノーゲンへの結合による疣贅形成メカニズムおよび血管内皮細胞への侵入メカニズムについて分析を行うこととした。

【材料および方法】

1. 使用菌株

当教室で保有する *S. mutans* 臨床分離株のうち Cnm、Cbm および PA の発現に着目し 85 株を選択した。次に、フィンランド人小児の口腔内より分離した SA31 株 (Cbm+PA-)、SA31 株の *cbm* 遺伝子を不活化させた変異株である SA31CBD 株および SA31 株の *cbm* 遺伝子を再導入した相補株である SA31comp 株を用いた。さらに、感染性心内膜炎患者の血液より分離した TW295 株 (Cnm+PA-) および TW295 株の *cnm* 遺伝子を不活化させた変異株である TW295CND 株を用いた。また、日本人小児の口腔より分離した MT8148 株 (CBP+PA+) を用いた。

2. フィブリノーゲンへの結合による *S. mutans* による疣贅形成メカニズムの解析

1) フィブリノーゲンに対する結合能の分析

1mg/ml のフィブリノーゲンを添加した 96 穴プレートに 2×10^9 CFU の供試菌を添加し、3 時間反応後、プレートリーダーにて OD₅₉₅ 値を測定した。リコンビナントタンパクの結合能に関しては、96 穴プレートに 100 μl の PBS 中に 1、10、100 μg ずつ添加し、3 時間反応後に、プレートリーダーにて OD₄₅₀ 値を測定した。

2) フィブリノーゲンに対する凝集能の分析

PBS にて OD₆₀₀ 値で 0.6 に調整した後、2.5mg/ml フィブリノーゲンの添加群および非添加群に分け、37 °C 24 時間培養して、OD₆₀₀ 値を測定した。

3) フィブリノーゲン存在下での *S. mutans* の血小板凝集能の分析

健常者の末梢血 400 μl と 1×10^9 CFU の供試菌を混合したものにフィブリノーゲンおよび生理食塩水を添加し、37 °C で 5 分反応させた。次に、I 型コラーゲンを添加して 15 分間キュベット内の電気抵抗値の経時的変化を血小板凝集計で記録した。さらに、同様の分析を行った後、走査型電子顕微鏡にて血小板凝集反応を観察した。

4) *Galleria mellonella* の幼虫を用いた *S. mutans* の病原性の分析

最終齢の *G. mellonella* の幼虫を 4 °C で暗室にて飼育し、60 匹をランダムに 4 群に分けた。各群に対して背面より 1×10^6 CFU の供試菌を投与後 37 °C にて 72 時間飼育し、12 時間ごとに触診にて生死の確認を行った。

5) ラット感染性心内膜炎モデルにおける評価

10 週齢の Specific pathogen free の Sprague-Dawley ラットに対して、全身麻酔下にて右頸動脈よりカテーテルを挿入し心臓弁を傷害させた後、 1×10^8 CFU の供試菌を投与した。7 日間飼育した後に屠殺し、摘出した心臓を大動脈弁相当部で横断して組織切片を作製した。その後、グラム染色、ヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソントリクローム染色により病原性を評価した。

3. 血管内皮細胞への *S. mutans* の侵入メカニズムの解析

1) ヒト臍帯静脈血管細胞 (Human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) に対する侵入能の評価

1×10^5 の HUVEC に 1×10^7 CFU の供試菌を感染させ、血清存在下および非存在下での *S. mutans* の HUVEC への侵入能の評価を行った。さらに、血液中の 4 種の主要な細胞外マトリックス (IV型コラーゲン、フィブリノーゲン、フィブロネクチンおよびビトロネクチン) 存在下および非存在下での TW295 株の HUVEC への侵入能を評価した。さらに、これらの細胞外マトリックスに対する TW295 株の結合能の評価を行った。

2) DNA マイクロアレイによる評価

DNA マイクロアレイにて *S. mutans* が感染した時の血管内皮細胞内での遺伝子発現の変化を分析し、発現の増加を認めた遺伝子のうち、シグナル伝達関連遺伝子をピックアップした。その後、siRNA のトランスフェクションによって標的遺伝子をノックダウンさせ、TW295 株の HUVEC への侵入の変化を分析した。

3) ラット心内膜炎モデルにおける血管内皮細胞の傷害に対する病理組織評価

10 週齢の Specific pathogen free の Sprague-Dawley ラットに対して、全身麻酔下にて右頸動脈よりカテーテルを挿入し心臓弁を傷害させた後、 1×10^8 CFU の供試菌を投与した。7 日間飼育した後に屠殺し、作製した組織切片を正常な血管内皮細胞に発現する CD31 抗体にて免疫染色を行い、内皮細胞の傷害の度合いを評価した。

【結果】

1. フィブリノーゲンへの結合による *S. mutans* による疣贅形成メカニズムの解析

臨床分離株 85 株を用いた分析から、CBP+PA- 菌群はフィブリノーゲンに対して高い結合率および凝集率を示したのに対して、CBP+PA+ 菌群および CBP-PA+ 菌群では結合能を認めなかった。また、リコンビナント Cbm はリコンビナント Cnm およびリコンビナント PA と比較して有意に高い結合能を示した。SA31 株は顕著な血小板凝集反応を認めたのに対し、SA31CBD 株は凝集反応を示さなかった。*G. mellonella* の幼虫を用いた分析から、SA31 株群は他の群と比較して低い生存率を示した。ラット感染性心内膜炎モデルにおいては、SA31 株群の心臓弁には多数の菌の付着を認めたのに対し、SA31CBD 株群では菌の付着を認めず、一方で SA31comp 株群では菌の付着が認められた。

2. 血管内皮細胞への *S. mutans* の侵入メカニズムの解析

TW295 株においては血清添加時には非添加時と比較して HUVEC に対して有意に高い侵入率を示したが、MT8148 株および TW295CND 株は血清の有無に関係なくほとんど侵入能を示さなかった。また、TW295 株は細胞外マトリックスのうち IV 型コラーゲンに強い結合能を示し、IV 型コラーゲン存在下で HUVEC に対して有意に高い侵入率を示した。DNA マイクロアレイを用いた分析の結果、TW295 株群において TW295CND 株群および菌非感染群と比較して細胞骨格の制御に関与する低分子量 G タンパクを調整する遺伝子 (*ARHGAP9*、*ARHGEF38* および *GPR179*) の発現の増加を認めた。これらの遺伝子のうち、*ARHGEF38* をノックダウンさせると TW295 株の侵入率は有意に低下したのに対し、*ARHGAP9* および *GPR179* をノックダウンしても侵入率の低下は認められなかった。さらに、CD31 抗体によるラット心臓組織の傷害の度合いの評価では、TW295 株群において TW295CND 株群と比較して傷害を受けた内腔長の増加を認めた。

【考察】

CBP 陽性 PA 陰性 *S. mutans* 菌株は、特有の菌体表層構造を有することでフィブリノーゲンと反応するとともに、血小板凝集が惹起され、*S. mutans*、フィブリノーゲン、血小板の間で架橋構造を形成することで感染性心内膜炎の疣贅形成に関与している可能性が示唆された。また、CBP 陽性 PA 陰性 *S. mutans* 菌株は、血液中の IV 型コラーゲンと結合した後に血管内皮細胞表面に付着することで *ARHGEF38* の発現を上昇させ、細胞骨格の構造変化を誘導して血管内皮細胞へと侵入している可能性が示唆された。

以上のことから、CBP 陽性 PA 陰性タイプの *S. mutans* は、特異な菌体表層構造を有することで血液成分や血管内皮細胞と反応し、感染性心内膜炎の病原性に大きく関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 継 将 寿)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 仲野 和彦 副 査 教授 川端 重忠 副 査 准教授 久保庭 雅恵 副 査 講師 伊藤 祥作
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、<i>Streptococcus mutans</i> における主要な菌体表層タンパクの発現パターンに着目して感染性心内膜炎病原メカニズムを検討したものである。その結果、コラーゲン結合タンパク (CBP) を発現し Protein Antigen (PA) を発現しない <i>S. mutans</i> 株は、フィブリノーゲンと反応するとともに血小板凝集を惹起させ架橋構造を形成することで、疣贅の増大化を引き起こしている可能性が示された。また、CBP+PA- 株は、血液中の IV 型コラーゲンと結合した後に血管内皮細胞表面に付着することで、低分子 G タンパク質に関連したシグナル伝達分子の一部を活性化させ、細胞骨格の構造変化を誘導し血管内皮細胞へと侵入している可能性が示された。</p> <p>以上の結果は、<i>S. mutans</i> の感染性心内膜炎病原メカニズムの一端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。</p>	