



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; 仲, 周平; 野村, 良太 他
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2017, 62(1), p. 15-17
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/68268">https://hdl.handle.net/11094/68268</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# *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

畠山 理那\*, 仲 周平\*, 野村 良太\*, 仲野 和彦\*

(平成 29 年 8 月 9 日受付)

## はじめに

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<sup>1,2)</sup>。

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<sup>3)</sup>。*S. mutans* の菌体表層には、分子量約 120kDa のコラーゲン結合タンパク (Cnm タンパク)<sup>4)</sup> および分子量約 190kDa の Protein Antigen (PA タンパク)<sup>5)</sup> 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<sup>6,7)</sup>。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<sup>8,9)</sup>。一方、*S. mutans* のスクロース非依存性の菌面への初期付着に関与することが知られている PA タンパクは、*S. mutans* の菌体における疎水性結合にも関連することが知られている<sup>5)</sup>。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。

## マウス NASH モデルを用いた検討

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  $1 \times 10^7$  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<sup>10)</sup>、TW871 株の Cnm タンパクを欠失させた TW871CND 株<sup>11)</sup>、TW871 株の PA タンパクを欠失させた TW871PD 株<sup>7)</sup>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、病理組織学的評価を行った。その結果、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、Hematoxylin-Eosin 染色において大滴性の脂肪化を認めた (図 1A)。さらに、Masson's-trichrome 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 (図 1B)。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。

\* 大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (小児歯科学教室)

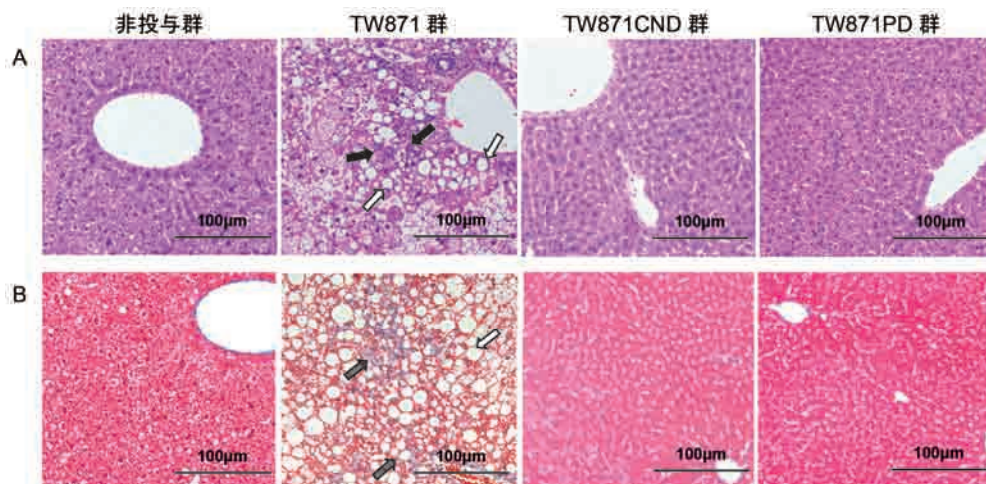


図1 マウスより摘出した肝臓組織の病理組織像

A. 実験開始16週後のマウスより摘出した肝臓組織の Hematoxylin-Eosin 染色像。

TW871 株投与群のマウスより摘出した肝臓組織では、非投与群と比較して大滴性の脂肪化と局所の炎症細胞浸潤が著明に見られた。TW871CND 株投与群および TW871PD 株投与群の肝臓組織では、これらの所見は認められなかった。

B. 実験開始16週後のマウスより摘出した肝臓組織の Masson's-trichrome 染色像。

TW871 株投与群の肝臓組織像では、肝実質の局所において青く染色された初発線維化像を認めた。一方で、非投与群と欠失株投与群の肝臓組織像ではこれらの変化は見られなかった。

⇒ 脂肪化    ⇒ 炎症性細胞    ⇒ 初発線維化

### 脂肪酸結合性試験

従来のヘキサデカンを用いた菌体における疎水性実験<sup>12)</sup>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）<sup>13)</sup>、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）<sup>10)</sup>を使用した。その結果、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。

### 培養肝臓細胞を用いた検討

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。その結果、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。

### おわりに

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、NASH の悪化を認めた。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 の病状は悪化し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

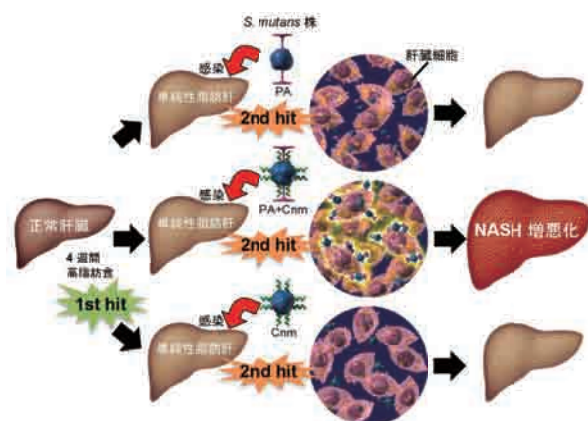


図2 *S. mutans* が引き起こす NASH 悪化のメカニズム

が必要であることが示唆された (図2)。

### 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なる御協力とご助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B., and Oh, B. J. (1980): Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* **55**, 434-438.
- 2) Diehl, A. M. (1999): Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* **19**, 221-229.
- 3) Naka, S., Nomura, R., Takashima, Y., Okawa, R., Ooshima, T., and Nakano, K. (2014): A specific *Streptococcus mutans* strain aggravates non-alcoholic fatty liver disease. *Oral Dis.* **20**, 700-706.
- 4) Sato, Y., Okamoto, K., Kagami, A., Yamamoto, Y., Igarashi, T., and Kizaki, H. (2004): *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. *J. Dent. Res.* **83**, 534-539.
- 5) Koga, T., Okahashi, N., Takahashi, I., Kanamoto, T., Asakawa, H., and Iwaki, M. (1990): Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect. Immun.* **58**, 289-296.
- 6) Abranches, J., Miller, J. H., Martinez, A. R., Simpson-

Haidaris, P. J., Burne, R. A., and Lemos, J. A. (2011): The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect. Immun.* **7**, 2277-2284.

- 7) Nomura, R., Naka, S., Nemoto, H., Otsugu, M., Nakamura, S., Ooshima, T., and Nakano, K. (2013): Potential high virulence for infective endocarditis in *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins but lacking PA expression. *Arch. Oral Biol.* **58**, 1627-1634.
- 8) Nakano, K., Hokamura, K., Taniguchi, N., Wada, K., Kudo, C., Nomura, R., Kojima, A., Naka, S., Muranaka, Y., Thura, M., Nakajima, A., Masuda, K., Nakagawa, I., Speziale, P., Shimada, N., Amano, A., Kamisaki, Y., Tanaka, T., Umemura, K., and Ooshima, T. (2011): The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nat. Commun.* **2**, 485.
- 9) Kojima, A., Nakano, K., Wada, K., Takahashi, H., Katayama, K., Yoneda, M., Higurashi, T., Nomura, R., Hokamura, K., Muranaka, Y., Matsuhashi, N., Umemura, K., Kamisaki, Y., Nakajima, A., and Ooshima, T. (2012): Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Sci. Rep.* **2**, 332.
- 10) Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S., and Ooshima, T. (2004): Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 198-202.
- 11) Nakano, K., Nomura, R., Taniguchi, N., Lapirattanakul, J., Kojima, A., Naka, S., Senawongse, P., Srisatjaluk, R., Grönroos, L., Alaluusua, S., Matsumoto, M., and Ooshima, T. (2010): Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesion. *Arch. Oral Biol.* **55**, 34-39.
- 12) Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980): Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**, 29-33.
- 13) Ooshima, T., Izumitani, A., Sobue, S., and Hamada, S. (1983): Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **36**, 219-223.