

## 論 文 要 旨

***Streptococcus oralis* coaggregation receptor polysaccharides induce inflammatory responses in human aortic endothelial cells**

〔*Streptococcus oralis* の coaggregation receptor polysaccharides は〕  
ヒト動脈内皮細胞の炎症反応を誘導する

Andréia de Toledo

## 【序論および目的】

*Streptococcus oralis* は口腔細菌の中で最も多くを占める口腔レンサ球菌の一種である。*S. oralis* は感染性心内膜炎患者の血液から高頻度に検出され、また *S. oralis* の属する口腔レンサ球菌グループ(mitis group) が動脈硬化プラークから検出されていることから、*S. oralis* のこれらの循環器疾患への関与が注目されている。感染性心内膜炎や動脈硬化の発症には血管内皮細胞の傷害が必須であるが、*S. oralis* によるヒト動脈内皮細胞 (HAEC) の傷害能力や関連する菌の病原因子について検討した報告はほとんどない。*S. oralis* の細胞壁には、coaggregation receptor polysaccharides (RPS) と呼ばれる多糖が存在しており、口腔バイオフィルムを形成する他の菌との共凝集に関与することが報告されている。

そこで本研究では *S. oralis* の持つ RPS に着目し、HAEC における炎症誘導能力を検討した。

## 【材料および方法】

## 1. 精製 RPS による HAEC の炎症誘導

*S. oralis* ATCC10557 から精製した RPS を HAEC の培地に添加し、5% CO<sub>2</sub> 下にて 24 時間培養後、培地中のサイトカイン (IL-6、IL-8、MCP-1) タンパク量を ELISA 法にて定量した。同様に RPS で刺激した HAEC をポリスチレンプレートに固定し、細胞表層における細胞接着因子 (VCAM-1、ICAM-1、E-selectin、P-selectin) の発現量を cell ELISA 法で測定した。また RPS で刺激した HAEC におけるサイトカイン、細胞接着因子、および Toll-like receptor (TLR) の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。さらにシグナル伝達に関与する NF-κB、p38 MAP kinase、および JNK 抑制時の TLR-2 mRNA の発現およびサイトカイン産生量を同様に調べた。

## 2. 菌の HAEC への侵入および炎症誘導

菌の侵入は antibiotics protection assay および共焦点レーザー顕微鏡観察で調べた。RPS を持つ *S. oralis* ATCC10557 およびその欠損株 *S. oralis* TC2 をそれぞれ HAEC と 5% CO<sub>2</sub> 下にて共培養した。一定時間後、抗生剤 (ゲンタマイシンおよびペニシリン G) 処理によって HAEC 表面に付着した菌を死滅させた。その後 Tween 20 処理により HAEC に侵入した菌を回収し、THB 寒天培地にて嫌氣的に培養して菌のコロニー数を計測した。また抗生剤処理後の HAEC を固定し、2 重免疫染色を行った後、共焦点

レーザー顕微鏡観察を行った。次に HAEC に菌が侵入した状態で一定時間培養を行い、ELISA 法にて培地中のサイトカイン産生量を測定した。

### 【結果】

精製 RPS は、HAEC から IL-6、IL-8、および MCP-1 の産生を対照よりも強く誘導した。また RPS は ICAM-1 の発現を誘導したが、VCAM-1、P-selectin、E-selectin の発現は誘導しなかった。誘導されたこれらの因子の量は RPS の濃度依存性に増加していた。さらに RPS は、HAEC における IL-6、IL-8、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1、selectin、TLR-1、および TLR-2 の mRNA の発現を誘導したが、TLR-4 mRNA の発現は誘導しなかった。p38 MAP kinase あるいは NF- $\kappa$ B 抑制により、RPS で刺激した HAEC における TLR-2 mRNA の発現は減少し、IL-6 と MCP-1 のタンパク産生量も減少した。しかしながら IL-8 のタンパク産生量は、p38 MAP kinase、NF- $\kappa$ B、および JNK のいずれを抑制しても減少しなかった。

RPS を持つ *S. oralis* 野生株と RPS 欠損株の HAEC への侵入を antibiotics protection assay および共焦点レーザー顕微鏡観察で認めた。RPS を持つ野生株の HAEC への侵入数は、RPS 欠損株より少なかったが、菌が侵入した HAEC からの IL-8 と MCP-1 タンパク産生量は、野生株の方が RPS 欠損株よりも多かった。また抗生剤で処理した野生株と RPS 欠損株を用いて HAEC を細胞外から刺激しても、サイトカイン産生は誘導されなかった。

### 【結論及び考察】

本研究により、*S. oralis* RPS は HAEC におけるサイトカイン産生、細胞接着因子の発現、および TLR-2 の発現等の炎症反応誘導に関与していることが明らかになった。また RPS を持つ *S. oralis* 野生株は RPS 欠損株と比較して、HAEC に侵入した菌数は少ないがサイトカイン産生を強く誘導したことから RPS のサイトカイン産生誘導能力が示された。さらに RPS で刺激した HAEC における TLR-2、IL-6、および MCP-1 の発現誘導には、p38 MAP kinase および NF- $\kappa$ B が関与している可能性が示された。

以上の結果から、*S. oralis* RPS はヒト動脈内皮細胞の炎症を誘導し、感染性心内膜炎および動脈硬化等の循環器疾患の発症に関与する可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 182 号		学位申請者	Andréia de Toledo	
審査委員	主査	小松澤 均		学位	博士 (歯学)
	副査	杉原 一正		副査	原田 秀逸
	副査	松口 徹也		副査	佐藤 節子

***Streptococcus oralis* coaggregation receptor polysaccharides induce inflammatory responses in human aortic endothelial cells**

(*Streptococcus oralis* の coaggregation receptor polysaccharides はヒト動脈内皮細胞の炎症反応を誘導する)

*Streptococcus oralis* は感染性心内膜炎患者の血液や動脈硬化プラークより検出されていることから、同菌のこれらの循環器疾患への関与が注目されている。*S. oralis* の細胞壁には coaggregation receptor polysaccharides (RPS) と呼ばれる多糖が存在し、口腔バイオフィルムを形成する他の菌との共凝集に関与することが報告されているが、この RPS がヒト動脈内皮細胞 (human aortic endothelial cells: HAEC) における炎症反応誘導作用をもつかどうかは明らかにされていない。そこで学位申請者は、精製 RPS を用いて HAEC からのサイトカイン、細胞接着因子および Toll-like receptor (TLR) の発現を ELISA 法、cell ELISA 法およびリアルタイム PCR 法で調べた。またシグナル伝達に関与している p38 MAP kinase、JNK、NF- $\kappa$ B を抑制し、サイトカインおよび TLR の発現も同様に調べた。さらに RPS 保有株と欠損株を用いて HAEC への侵入を antibiotics protection assay と共焦点レーザー顕微鏡観察で調べ、菌が侵入した HAEC からのサイトカイン産生を調べた。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 精製 RPS は HAEC からサイトカイン (IL-6、IL-8、MCP-1) および細胞接着因子 ICAM-1 のタンパク発現を誘導した。
- 2) 精製 RPS は HAEC におけるサイトカイン (IL-6、IL-8、MCP-1)、細胞接着因子 (ICAM-1、VCAM-1、selectin)、および TLR-1、TLR-2 の mRNA の発現を誘導した。
- 3) 精製 RPS で刺激した HAEC における TLR-2 mRNA の発現および IL-6 と MCP-1 のタンパク産生は p38 MAP kinase あるいは NF- $\kappa$ B の抑制により減少したが、IL-8 のタンパク産生は減少しなかった。
- 4) RPS 保有株の HAEC への侵入数は RPS 欠損株より少なかったが、菌が侵入した HAEC からの IL-8 と MCP-1 タンパク産生量は RPS 保有株の方が RPS 欠損株よりも多かった。

*S. oralis* の RPS が、HAEC におけるサイトカイン、細胞接着因子、および TLR-2 の発現を誘導することが明らかになった。また *S. oralis* RPS 保有株は RPS 欠損株と比較して、HAEC に侵入した菌数は少ないがサイトカイン産生を強く誘導したことから RPS のサイトカイン産生誘導能力が示された。さらに RPS で刺激した HAEC における TLR-2、IL-6 および MCP-1 の発現誘導には、p38 MAP kinase および NF- $\kappa$ B が関与している可能性が示された。

本研究は、*S. oralis* RPS の HAEC における炎症反応誘導能力を検討したものであり、その結果 *S. oralis* RPS は HAEC の炎症を誘導し、感染性心内膜炎および動脈硬化等の循環器疾患の発症に関与している可能性が示唆された。従って本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 182 号		学位申請者	Andréia de Toledo
審査委員	主査	小松澤 均	学位	博士 (歯学)
	副査	杉原 一正	副査	原田 秀逸
	副査	松口 徹也	副査	佐藤 節子
<p>主査および副査の5名は、平成24年3月9日、学位申請者 Andréia de Toledo 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) <i>S. oralis</i> は口腔常在細菌ですが、どのようにして血液内に入るのですか。  (回答) 歯肉は出血しやすい組織であり、<i>S. oralis</i> などの口腔細菌は外科的処置やスケーリング、あるいはブラッシングやフロッシングのような通常の口腔ケアでも容易に血管内に入ります。</p> <p>質問2) 様々なサイトカインの中でどうして IL-6、IL-8、MCP-1 を選んだのですか。  (回答) IL-6、IL-8、MCP-1 は動脈硬化病巣で増えているのでこれらのサイトカインを選びました。</p> <p>質問3) VCAM-1 と selectin の mRNA が増えているのに、タンパクが増加していない理由はなぜですか。  (回答) これらの因子については、posttranscriptional あるいは posttranslational stage で、特殊なメカニズムが働いたものと思われます。</p> <p>質問4) RPS の心内膜炎発症への関与を調べるために、なぜ血管内皮細胞を用いたのですか。  (回答) 心内膜炎を発症しやすい心臓弁膜の表層は、血管内皮細胞で構成されていることからこの細胞を用いました。</p> <p>質問5) 血管内の炎症病巣では、IL-1、IL-8 の増加と血小板の活性化が起こると思いますが、これらについては調べましたか。  (回答) RPS の刺激により HAEC から IL-8 の産生は認めましたが、IL-1 あるいは血小板の活性化は調べていません。</p> <p>質問6) P-selectin、E-selectin の mRNA 量が上昇していますが、それらに対する ligand 量の変化を調べましたか。  (回答) いいえ、今回は調べていません。</p> <p>質問7) RPS を構成する糖の中に galactose、<i>N</i>-acetylgalactosamine、rhamnose、glucose 以外の糖がありますか。  (回答) ribitol が含まれる type があります。</p> <p>質問8) ムタノリジンはどういう目的で用いましたか。  (回答) 細菌の細胞壁ポリマーであるペプチドグリカンの <math>\beta</math>-<i>N</i>-アセチルムラミル-(1<math>\rightarrow</math>4)-<i>N</i>-アセチルグルコサミン結合を切断し、細胞壁を可溶化するために用いました。</p> <p>質問9) 精製 RPS は水溶性ですか。  (回答) はい、容易に水に溶かすことができます。</p>				

質問 10) なぜ RPS 欠損株の方が野生株より多く侵入すると考えますか。

(回答) 細菌表層の RPS が欠落すると菌のもつ接着因子が露出することによって血管内皮細胞への付着が増加し、さらに侵入が増加した可能性があると考えています。

質問 11) RPS に対する血管内皮細胞のレセプターは同定されていますか。また RPS のレセプターは内皮細胞の中に存在しますか。

(回答) RPS のレセプターはまだ同定されていません。今回、調べたレセプターの一つ、TLR-2 は血管内皮細胞の場合、細胞の外より中の方に多く存在していると報告されています。

質問 12) RPS による血管内皮細胞の炎症誘導には高濃度を必要とするように思えますが、いかがですか。

(回答) そのように考えます。

質問 13) JNK のインヒビターを入れただけで TLR-2 mRNA の発現と IL-6 タンパクの発現が上昇した理由をどう考えますか。

(回答) JNK のインヒビター自体が TLR-2 mRNA および IL-6 タンパクを誘導するシグナル分子を刺激した可能性があると考えています。

質問 14) 共焦点レーザー顕微鏡で侵入した菌を数えるのが難しかった理由はなぜですか。

(回答) HAEC の数と比較して侵入した菌数が少なかったので数えるのは困難でした。

質問 15) 感染によって動脈硬化が起こる機序はどのようなものですか。

(回答) 細菌が血管内皮細胞に侵入、定着して炎症反応を起こし、血管の傷害に続いて動脈硬化を発症すると考えています。

質問 16) 本研究の成果をどのように感染性心内膜炎や動脈硬化の予防に繋がたいと思いますか。

(回答) RPS に対する血管内皮細胞のレセプターが解明できれば、RPS による炎症反応誘導を抑制し、循環器疾患の予防に繋げることができると考えています。

質問 17) 精製した RPS 中に peptidoglycan や LTA の contamination はありませんでしたか。

(回答) NMR で RPS の成分以外のものは検出されなかったことから、含まれていないと考えています。

質問 18) RPS にはいくつかの serotype があります。今回使った 3G type 以外のものでも同様の現象が起こりますか。

(回答) 今回、精製 RPS による血管内皮細胞の炎症反応は 3G type のみ用いて調べました。菌の内皮細胞への侵入については 1Gn あるいは 2G type を保有する *S. oralis* を使いましたが、3 G type と同様の結果が得られました。

質問 19) 循環器疾患の病巣から口腔レンサ球菌の中でもなぜ *S. oralis* が高頻度で分離されると考えますか。

(回答) *S. sanguinis* や *S. mitis* も RPS を保有していますが、*S. oralis* のもつ RPS とは構造上の違いがあり、病巣からの回収率に影響を及ぼしている可能性があるかと推測しています。

質問 20) RPS 欠損株は血管内皮細胞に多く付着するにもかかわらず炎症応答が低いのはなぜですか。

(回答) 抗生剤処理菌以外に加熱死菌を用いて内皮細胞の外から刺激を加えても炎症誘導は認められませんでした。内皮細胞の外からの刺激では応答が起こりにくいと考えています。

質問 21) 内皮細胞の外からの刺激として加熱死菌では炎症の誘導がないのに RPS では炎症が誘導されたのはなぜですか。

(回答) 今回刺激に用いた RPS 量は加熱死菌の保有する量よりかなり多かったためと考えています。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。