

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593094

研究課題名(和文) ミュータンスレンサ球菌による新規動脈硬化発症機序の解明 - 菌の細胞内侵入と認識応答

研究課題名(英文) Invasive Streptococcus mutans induces inflammatory cytokine production of human aortic endothelial cells via regulation of TLR2 and NOD2

研究代表者

長田 恵美 (Nagata, Emi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00304816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々は動脈硬化の新たなリスクファクター候補として、う蝕原因細菌であるミュータンスレンサ球菌に着目し、侵入した菌に対するヒト動脈内皮細胞の認識応答機序を検討した。調べた異なる血清型のミュータンスレンサ球菌は、全てヒト動脈内皮細胞への侵入能力を有していた。菌が侵入していない内皮細胞と較べて、菌が侵入したヒト動脈内皮細胞における炎症サイトカインの産生、およびパターン認識受容体であるTLR2およびNOD2の発現は、増加していた。TLR2およびNOD2の発現を抑制すると、ヒト動脈内皮細胞における炎症サイトカインの産生は減少した。以上の結果より、ミュータンスレンサ球菌の動脈硬化発症への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on Streptococcus mutans as one of the new candidates of risk factors to cause atherosclerosis, and examined the recognition mechanism of human aortic endothelial cells (HAECs) for invasive Streptococcus mutans. All six strains tested, consisting of three different serotypes of S. mutans, were capable of invading HAECs. HAECs invaded by S. mutans produced larger amounts of cytokines, and the messenger RNA expression of TLR2 and NOD2 increased markedly compared with that by non-invaded HAECs. The production of cytokines by invaded HAECs decreased when the expression of TLR2 and/or NOD2 mRNA of HAECs was inhibited. These results suggest that invasive S. mutans may induce inflammatory reaction of HAECs through the recognition process via TLR2 and NOD2.

研究分野：予防歯科学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：ミュータンスレンサ球菌 内皮細胞 TLR2 NOD2 サイトカイン 動脈硬化 口腔細菌

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞など日本人の死亡原因の多くを占める疾病の原因となる血管の変化である。動脈硬化の成因は血管内皮細胞の機能的傷害であるという“傷害反応仮説”によって説明されているが、現在もなお高血圧、脂質代謝異常、喫煙、肥満、年齢といった古典的リスクファクターだけでは説明できない動脈硬化患者が存在する。疫学研究で歯周疾患と心疾患との関連の報告があること (Geismar *et al.*, J. Periodontol., 2006)、臨床細菌学的にはヒト動脈硬化病巣から口腔常在菌であり口腔バイオフィルム細菌の中でも量的に多くを占める口腔レンサ球菌が検出されていること (Lehtiniemi *et al.*, Eur. J. Clin. Invest., 2005; Nakano *et al.*, J. Clin. Microbiol., 2006) から、申請者は動脈硬化の新たなリスクファクター候補細菌として、口腔レンサ球菌に着目し、口腔レンサ球菌のヒト動脈内皮細胞への侵入能力および傷害作用を検討した (平成 20~22 年度 科学研究費 基盤 (C))。口腔レンサ球菌 10 菌種は全てヒト動脈内皮細胞に侵入し、その内 4 菌種は侵入した内皮細胞からサイトカインの産生を誘導した。検討した菌の中で、ミュータンスレンサ球菌は侵入した内皮細胞からのサイトカイン産生誘導能がもっとも高かった。ヒト動脈内皮細胞に侵入した口腔レンサ球菌によるサイトカイン産生誘導の報告は、世界で初めてである。内皮細胞は、外敵因子を“パターン認識受容体”で認識する (Opitz *et al.*, Thromb. Haemost., 2009)。パターン認識受容体としては、細胞膜 (一部はリソゾームの膜) 上に存在する“toll-like receptor (TLR)”や細胞質に存在する“NOD-like receptor”が知られており、Edfeldt ら (Circulation, 2002) はヒトの動脈硬化病巣において TLR1、TLR2、TLR4 の発現が増加していることを報告している。申請者は、口腔レンサ球菌がヒト動脈内皮細胞に侵入して、サイトカイン産生を誘導することを明らかにしたが、付着、侵入した口腔レンサ球菌が、内皮細胞にどのようなメカニズムで認識され、炎症応答を誘導するのかは、未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ミュータンスレンサ球菌を用いて、(1)異なるセロタイプのミュータンスレンサ球菌によるヒト動脈内皮細胞への侵入および刺激時のサイトカイン産生(2)ヒト動脈内皮細胞を菌で刺激した時の内皮細胞におけるパターン認識受容体 TLR1、TLR2、TRL4、NOD1、NOD2 遺伝子およびタンパクの発現、(3)菌を認識する内皮細胞のパターン認識受容体の発現を抑制した時の、菌刺激による内皮細胞によるサイトカイン産生、の解析を行うことである。

3. 研究の方法

(1)異なるセロタイプのミュータンスレンサ球菌のヒト動脈内皮細胞 (HAECs) への侵入能力の検討

HAEC を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。嫌氣的に培養した異なるセロタイプ (c、e、f) それぞれ 2 種類、計 6 株のミュータンスレンサ球菌それぞれと MOI=1 で 24 時間共培養後、培地および HAECs 表面に存在する菌をゲンタマイシンおよびペニシリン G で処理した。HAECs に侵入し抗生剤の影響を受けずに生き残った菌を、0.1% Tween 20 で HAECs を処理することによって回収後、BHI 寒天培地にて嫌氣的に培養した。48 時間後に菌のコロニー数を計測した。

(2) HAECs を異なるセロタイプのミュータンスレンサ球菌で刺激した時のサイトカイン産生

HAEC を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。嫌氣的に培養した異なるセロタイプ (c、e、f) それぞれ 2 種類、計 6 株のミュータンスレンサ球菌それぞれと MOI=1 で 24 時間共培養後、培地を回収して、ELISA 法にて培地中の IL-6、IL-8 および MCP-1 タンパクの量を測定し、非感染 HAEC の産生量と比較した。

(3) HAECs を菌で刺激した時の内皮細胞におけるパターン認識受容体 TLR1、TLR2、TRL4、NOD1、NOD2 遺伝子およびタンパクの発現

パターン認識受容体 mRNA の定量

(2)の条件で HAECs を刺激した後、HAECs を回収して Total RNA を抽出した。リアルタイム RT-PCR 法にて TLR1、TLR2、TRL4、NOD1、NOD2 遺伝子 mRNA の増幅を行い、非感染 HAECs を対照として相対定量解析を行った。

パターン認識受容体タンパクの定量

(2)の条件で HAECs を刺激した後、HAECs を回収、固定し、チューブ内で抗 TLR2 あるいは抗 NOD2 抗体を用いて免疫染色を行い、フローサイトメトリーで各々の発現を定量し、非刺激 HAECs を対照として分析した。細胞内に存在する TLR2 および NOD2 タンパクを定量する場合は、免疫染色の際、サポニンを用いて、抗体を細胞内に浸透させた。

(4) 菌を認識する内皮細胞のパターン認識受容体の発現を抑制した時の、菌刺激による内皮細胞によるサイトカイン産生

HAECs の TLR2 および NOD2 mRNA の発現を

RNA 干渉で抑制後、(1)の条件で HAECs を細胞内に侵入したミュータンスレンサ球菌で刺激した後、ELISA 法にて培地中の IL-6、IL-8 および MCP-1 タンパクの量を測定し、非感染 HAEC の産生量と比較した。

4. 研究成果

今回検討した異なるセロタイプ(c、e、f)それぞれ2種類、計6株のミュータンスレンサ球菌は、全て HAECs への侵入能力を有していた。6株中5株は、それぞれのミュータンスレンサ球菌で刺激した HAECs は刺激していない HAECs と比較して、有意に多くの量のサイトカイン(IL-6、IL-8、MCP-1)を産生した($P < 0.05$) (図1)。HAECs に侵入する能力が高い菌の方が HAECs を刺激した時のサイトカイン産生誘導能が高かった。

HAECs を菌で刺激した時の内皮細胞におけるパターン認識受容体 mRNA の発現を調べると、非刺激 HAECs と比較して TLR2 および NOD2 mRNA の発現が有意に増加していた($P < 0.05$) (図2)。HAECs において、TLR2 は細胞膜表面と細胞内に存在していた。非刺激 HAECs と比較して、菌の刺激により細胞内に存在する TLR2 タンパクは有意に増加したが、細胞膜表面にある TLR2 タンパクは増加しなかった。細胞内に存在するパターン認識受容体である NOD2 タンパクは、発現が増加していた。ミュータンスレンサ球菌の刺激により HAECs の細胞内に存在するパターン認識受容体が増加していたので、次に HAECs に菌を侵入させて、侵入した菌の刺激による HAECs におけるサイトカイン産生を検討した。菌が侵入していない HAECs と較べて、菌が侵入した HAECs におけるサイトカイン産生は有意に増加していたが、TLR2、NOD2 mRNA の発現を単独で、あるいは同時に RNA 干渉で抑制すると、サイトカインの産生は有意に減少していた($P < 0.05$) (図3)。ミュータンスレンサ球菌は HAECs に侵入し、HAECs の細胞内に存在する TLR2 および NOD2 に認識されて、HAECs におけるサイトカイン産生を誘導することから、ミュータンス連鎖球菌はヒト動脈内皮細胞の炎症を誘導し、動脈硬化発症に関与している可能性が示唆された。

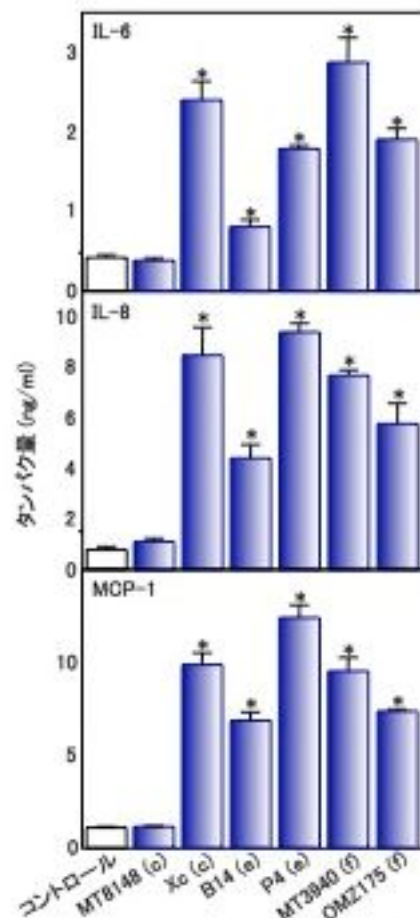


図1

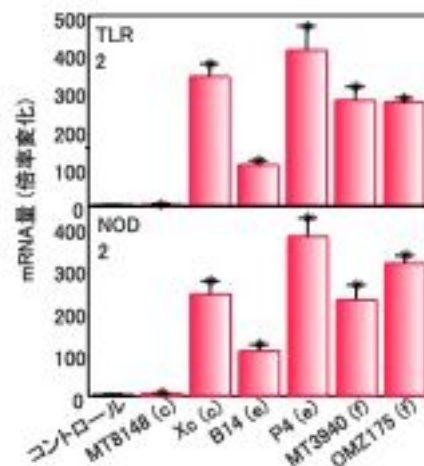


図2

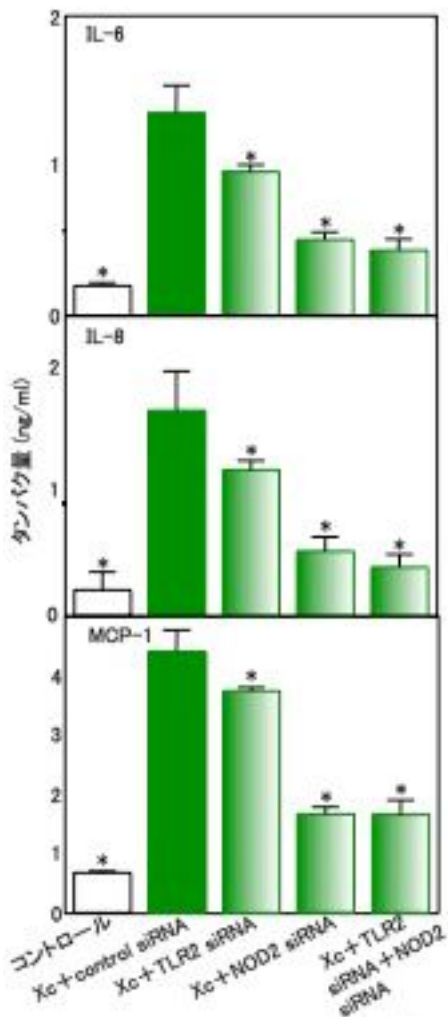


図3

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) de Toledo A., Nagata E., Oho T.: *Streptococcus oralis* coaggregation receptor polysaccharides induce inflammatory responses in human aortic endothelial cells. 査読有、Mol. Oral Microbiol. 27: 295-307, 2012. 10.1111/j.2041-1014.2010.00597.x
- (2) Nagata E., de Toledo A., Oho T.: Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production. 査読有、Mol. Oral Microbiol. 26: 78-88, 2011. 10.1111/j.2041-1014.2010.00597.x
- (3) Takahashi Y., Yoshida A., Nagata E., Hoshino T., Oho T., Awano S., Takehara T., Ansai T.: Streptococcus anginosus L-cysteine desulfhydrase gene expression is associated with abscess formation in BALB/c mice. 査読有、Mol.

Oral Microbiol. 26: 221-227, 2011.
10.1111/j.2041-1014.2010.00599.x

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 長田 恵美: Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production. 第62回日本口腔衛生学会・総会. 2013年5月16日, キッセイ文化ホール(長野県).
- (2) 長田 恵美, Andreia de Toledo, 於保孝彦: *Streptococcus mutans* はヒト動脈内皮細胞に炎症反応を誘導する. 第62回日本口腔衛生学会・総会. 2013年5月17日, キッセイ文化ホール(長野県).
- (3) 長田 恵美: 良きかかりつけ医は万病に効く-口腔バイオフィルム感染症の予防-. 第62回日本口腔衛生学会・総会. 2013年5月17日, キッセイ文化ホール(長野県).
- (4) Andreia de Toledo, 長田 恵美, 吉田康夫, 於保孝彦: *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. 第61回日本口腔衛生学会・総会. 2012年5月27日, 神奈川歯科大学(神奈川県).
- (5) 長田 恵美, Andreia de Toledo, 於保孝彦: ミュータンスレンサ球菌が侵入したヒト動脈内皮細胞におけるパターン認識受容体の発現誘導. 第60回日本口腔衛生学会・総会. 2011年10月10日, 日本大学松戸歯学部(千葉県).

〔その他〕

ホームページ等

平成25年度日本口腔衛生学会学術賞 "LION AWARD" 受賞講演

<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/kenkyu/gakkai20130516.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長田 恵美 (NAGATA EMI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 00304816

(2)研究分担者

於保 孝彦 (OHO TAKAHIKO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 50160940