

研究者：大継 將寿（所属：大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室）

研究題目：*Streptococcus mutans* による感染性心内膜炎における生体側の応答に関する検討

目的：

Streptococcus mutans は齲蝕の主要な原因菌である一方、感染性心内膜炎（infective endocarditis：IE）の起炎菌としても知られている。これまでに、*S. mutans* のうち菌体表層に分子量 120 kDa のコラーゲン結合タンパク（Collagen-binding protein；CBP）を発現する菌株が、血管内皮細胞への強い結合能および侵入能を有することを示した。また、心疾患患者から摘出した心臓弁からは CBP をコードする遺伝子が高い割合で検出され、IE の病態に関与している可能性を示した。IE の病原因子としては、起炎菌と血小板やフィブリン塊からなる疣贅（ゆうぜい）が挙げられているが、病原性に関与する生体側の因子の詳細については明らかになっていない。本研究では、CBP 陽性 *S. mutans* 株の血管内皮細胞への侵入に関わる生体側の因子明らかにし、IE の病原メカニズムの一端を追求することにした。

対象および方法：

1. *S. mutans* 供試菌株

S. mutans 供試菌株として、菌血症患者の血液から分離された TW295 株（CBP 発現株）を用いた。また、TW295 株の CBP をコードする遺伝子に抗生物質耐性遺伝子を挿入することで不活化させた TW295CND 株を用いた。

2. DNA マイクロアレイによる解析

Brain heart infusion（BHI）液体培地にて 37°C 18 時間培養後、供試菌（ 1×10^7 CFU）にヒト臍帯血管内皮細胞（Human umbilical vein endothelial cells；HUVEC）（ 1×10^5 cells）を加えて 90 分間反応させた後、反応液より抽出した RNA を用いた DNA マイクロアレイ分析によって、各供試菌感染群および菌非感染群における遺伝子発現の変化を検討した。発現変化が認められた遺伝子のうち、菌が細胞に侵入する際の細胞骨格の変化に関与するとされる低分子量 G タンパク質の調節に関わる遺伝子を抽出した。

3. 標的遺伝子のノックダウンによる菌の侵入能の変化

マイクロアレイにより、TW295 感染群において有意な発現変化が認められた ARHGAP9 および ARHGEF38 に関して、HUVEC に siRNA を導入することによりノックダウンを行った。遺伝子操作を施していない HUVEC と標的遺伝子のノックダウンを行った HUVEC のそれぞれに TW295 株を感染させ、侵入能を分析した。

4. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

供試菌と HUVEC に感染させた後ホルマリン固定し、細胞の核および ARHGEF38 のそれぞれを免疫蛍光二重染色にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

結果および考察：

1. HUVEC における遺伝子発現の変化

マイクロアレイ分析から、TW295 株感染群は TW295CND 感染群と比較して、低分子量 G タンパク調節因子のうち、ARHGAP9 において約 8.5 倍、ARHGEF38 において約 2.9 倍の発現上昇が認められた。また、TW295 株感染群と菌非感染群とを比較すると、TW295 株感染群において ARHGAP9 において約 3.3 倍、ARHGEF38 において約 3.4 倍の発現上昇が認められた。一方、TW295CND 感染群と菌非感染群の間では、これらの遺伝子の発現に大きな差は認められなかった。

2. 標的遺伝子のノックダウンによる菌の侵入能の変化

ARHGAP9 をノックダウンしても TW295 株の HUVEC への侵入能の低下は認められなかった。一方で、ARHGEF38 をノックダウンすると侵入能の有意な低下が認められた (図 1, 2)。

3. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

TW295 株を HUVEC に感染させた群では、ARHGEF38 の明らかな発現を認めたのに対し、TW295CND 感染群では、ARHGEF38 の発現はほとんど認められなかった (図 3)。

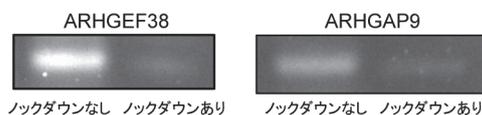


図 1 + siRNA の導入の有無による + ARHGAP9 および + ARHGEF38 + の遺伝子発現変化 +

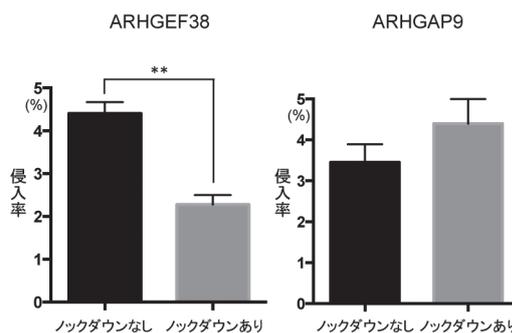


図 2 ARHGAP9 および ARHGEF38 + をノックダウンした際の + TW295 + 株の HUVEC + への侵入能の変化 + (+ 検定により統計学的有意差あり +) (* $P < 0.01$)

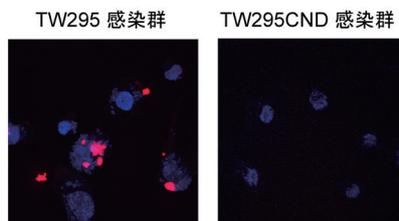


図 3 + 共焦点レーザー顕微鏡による観察 + (青：核，赤：ARHGEF38)

本研究結果から、CBP 陽性菌株が血管内皮細胞に感染すると、細胞骨格の変化に関わることで知られている低分子量 G タンパクに関連する遺伝子の発現変化が生じることが明らかになった。また、これらの遺伝子のうち、 ARHGEF38 の遺伝子発現の上昇が生じることで細胞表層構造に変化が生じ、CBP 陽性菌株が細胞内へと侵入する可能性が示唆された。今後は、菌の侵入との関連が認められなかったにもかかわらずCBP 陽性菌株で発現の上昇の認められた ARHGAP9 の役割について明らかにしたいと考えている。また、マイクロアレイ解析から得られたデータをより詳細に分析し、低分子量 G タンパク関連遺伝子以外の遺伝子についても検討を加えることで、IE に関連するさらなる生体側の分子と病態との関わりを明らかにしていきたいと考えている。

成果発表：

1. Otsugu M, Nomura R, Nakano K. Endothelial gene alteration caused by *Streptococcus mutans* with collagen-binding protein. 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2015.10.31, Fukuoka, Japan
2. 大継将寿, 野村良太, 仲野和彦 *Streptococcus mutans* による感染性心内膜炎における E-セクレチンの役割 第 53 回日本小児歯科学会大会, 2015.5.22, 広島
3. Otsugu M, Nomura R, Nakano K. Host immune responses mediate infective endocarditis caused by *Streptococcus mutans*. 61st Congress of the European Organization for Caries Research, 2015.7.1 Brussel, Belgium
4. Otsugu M, Nomura R, Nakano K. Up-regulation of specific host molecule required for endothelial cell internalization by *Streptococcus mutans*. 35th Annual Meeting of the International Association for Dental Research, 2016.6.23, Seoul, Republic of Korea