

研究者：田畑 佳子（所属：岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 小児歯科学分野）

研究題目：非アルコール性脂肪肝炎患者が保有する *Streptococcus mutans* の分子生物学的解析

目的：

非アルコール性脂肪性肝疾患（Non-alcoholic fatty liver disease；NAFLD）は、飲酒歴やウイルスなどを原因としない脂肪性肝疾患の総称で、肝生検によりさらに非アルコール性脂肪肝（Non-alcoholic fatty liver；NAFL）と非アルコール性脂肪肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis；NASH）に分類される。NAFLは肝硬変や肝癌へと進行することはほとんどないが、NASHは5～10年で5～20%の症例が進展すると考えられている。しかしながら、その発症メカニズムは不明である。近年、う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* のうち、Cnm および高タンパク抗原（Protein Antigen；PA）の両方を発現する Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* 株が、動物モデルにおける NASH への増悪化に関与することが明らかになった。本研究では、Cnm タンパクおよび PA タンパクに着目し、NASH 患者口腔より分離した *S. mutans* の性状の分析および分子生物学的解析を行い、NASH 発症への関連性を検討した。

対象および方法：

1. NAFLD 患者唾液中の *S. mutans* 性状の分析

本研究は市立奈良病院倫理委員会および岡山大学医療系部局研究倫理審査専門委員会の承認を得て行われた。市立奈良病院で NAFLD と診断されて肝生検を受け、同意の得られた 40 名の患者（NAFL：20 名、NASH：20 名）から唾液および血液を採取し、研究に用いた。唾液サンプルを、Mitis-Salivarius（MS）寒天培地に Bacitracin と 15% スクロースを添加した MSB 寒天培地に播種し、37℃で 48 時間培養した。培地から 5 株ずつ釣菌し、Brain Heart Infusion 液体培地にて 37℃で 24 時間培養後、細菌 DNA を抽出した。その後、*S. mutans* の特異的プライマーを用いた polymerase chain reaction（PCR）法により、菌を同定した。さらに *S. mutans* と同定された菌の Cnm をコードする遺伝子 *cnm* の保有の有無を、*cnm* に特異的なプライマーを用いた PCR 法により調べた。また、Western blotting 法により PA の発現の有無を確認した。そして、一般血液検査により得られた臨床検査値と Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* 保有との関連を調べた。

2. 分離した菌株のコラーゲン結合能の比較

0.25 M 酢酸に溶解した I 型コラーゲンあるいは IV 型コラーゲンを、96 穴平底細胞培養用マイクロタイタープレートの各ウェルに 200 μ l ずつ添加し、4℃で一晩反応させた。5% Bovine Serum Albumin を 37℃で 90 分間反応させた。BHI 液体培地で一晩培養した供試菌を、1 ウェル当たり 2×10^9 Colony Forming Unit（CFU）になるように添加した。37℃で 3 時間反応させ、25% ホルムアルデヒドで菌を固定した。200 μ l の 0.05% クリスタルバイオレットで 1 分間

染色し、各ウェルの吸光度 595 nm の値を測定した。それぞれの株のコラーゲン結合能は、Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* の TW871 株の値を 100% として換算した。

3. 各菌株の *cnm* および *pac* 遺伝子の発現解析

各供試菌を BHI 液体培地にて吸光度 550 nm で対数増殖期後期まで培養後、通法を用いて全 RNA を回収し、逆転写反応を行い cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として、各供試菌の *cnm* および PA をコードする遺伝子 *pac* の発現量を Real-time Reverse transcription-PCR (RT-PCR) 法によって比較した。

結果および考察：

結果

1. NAFLD 患者唾液中の *S. mutans* の分布および性状の分析

NAFLD 患者から分離された *S. mutans* のうち、NASH 患者群と NAFL 患者群で PA のみを有する Cnm⁻/PA⁺ *S. mutans*、Cnm のみを有する Cnm⁺/PA⁻ *S. mutans*、どちらも持たない Cnm⁻/PA⁻ *S. mutans* の検出率に有意な差は認められなかった。しかしながら、Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* は、NASH 患者群から 27.3% と高頻度に検出され、NAFL 患者群の 10.7% と比較して有意に高い値を示した (図 1)。

<i>S. mutans</i> 菌体表層タンパクの発現パターン	検出頻度 (NASH : n=88)	検出頻度 (NAFL : n=75)
Cnm ⁻ /PA ⁺	62/88 (70.4%)	55/75 (73.3%)
Cnm ⁺ /PA ⁺	24/88 (27.3%)*	8/75 (10.7%)
Cnm ⁺ /PA ⁻	2/88 (2.3%)	6/75 (8.0%)
Cnm ⁻ /PA ⁻	0/88 (0.0%)	6/75 (8.0%)

図 1 NAFLD 患者群における *S. mutans* の Cnm および PA 陽性率の比較
(* $P < 0.05$, Fisher's PLSD)
NASH 患者群と NAFL 患者群の間で有意差検定を行った。

2. Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* 保有と臨床検査値との関連

Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* を保有する NASH 患者群を保有群 (n=8) とし、Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* を保有しない群を非保有群 (n=10) として臨床検査値を分析した。その結果、保有群では、血液中の肝線維化マーカーである IV 型コラーゲン -7S が有意に高い値を示し ($P < 0.05$)、脂肪細胞から特異的に分泌される抗炎症性サイトカインであるアディポネクチンが有意に低い値を示した ($P < 0.05$) (図 2)。

	非保有群 (n=10)	保有群 (n=8)
ALT (IU/mL)	75.1 ± 11.9	49.5 ± 7.5
AST (IU/mL)	62.2 ± 10.5	43.5 ± 6.0
PLT (×10 ⁴ /μL)	19.7 ± 1.6	20.8 ± 3.3
FIB4	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.4
IV型コラーゲン-7S (ng/mL)	5.2 ± 0.4	6.6 ± 0.6 *
アディポネクチン (μg/mL)	9.6 ± 0.9	6.3 ± 1.1 *
IL-6 (pg/mL)	2.1 ± 0.2	6.0 ± 3.6
TNF-α (pg/mL)	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1

図2 Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* を保有する NASH 患者群の臨床検査値
(* $P < 0.05$, Student *t* 検定) (平均値 ± 標準誤差)

3. 各菌株のコラーゲン結合能の比較

Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* を陽性群、その他の *S. mutans* を陰性群として調べたところ、NASH 患者群において、陽性群 (n=24) は陰性群 (n=64) と比較して I 型コラーゲンおよび IV 型コラーゲンともに有意に高い結合能を示した (図 3)。

	陰性群 (n=64)	陽性群 (n=24)
I 型コラーゲン結合率 (%)	7.55	83.26 ***
IV 型コラーゲン結合率 (%)	8.95	131.85 ***

図3. NASH 患者における Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* のコラーゲン結合能
(***) $P < 0.001$, Mann-Whitney U 検定)
(# 各回における TW871 のコラーゲン結合率を 100%とした相対値で示した)

4. 各菌株の *cnm* および *pac* 遺伝子発現量の比較

NASH 患者および NAFL 患者の唾液サンプルから分離された全ての菌株の *cnm* および *pac* の発現量を調べ、その中央値を比較した。その結果、NASH 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* の *cnm* の発現量は、NAFL 患者と比較して、有意な差は認められなかった。しかしながら、*pac* の発現量が有意に高い値を示した ($P < 0.05$) (図 4)。

遺伝子	NASH 患者	NAFL 患者	<i>P</i> 値
<i>cnm</i>	0.878	0.581	0.237
<i>pac</i>	1.314	0.706	0.046*

図4 各患者群における *cnm* および *pac* の発現量の比較
TW871 株を 1 としたときの各患者群における
Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* の各遺伝子発現量の倍率
変化の中央値を示す。
(***) $P < 0.001$, Mann-Whitney U 検定)

考 察：

本研究より、NASH 患者からは Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* が高頻度に検出されることがわかった。これらの菌株のうち PA の発現量が多い *S. mutans* 菌株が、脂肪化した肝臓組織および脂肪組織に結合し、炎症が惹起することによって NASH が誘発される可能性が示唆された。今後は、これらの菌株が NASH 発症にどのようなメカニズムで関与しているのかをさらに追究していきたいと考えている。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・ 田畑佳子、非アルコール性脂肪肝炎患者口腔由来 *Streptococcus mutans* の病態発症関連因子の解析、岡山歯学会雑誌、vol.41 第 2 号、2022.6.30。
- ・ 第 60 回日本小児歯科学会大会 発表予定