

指導教授氏名	指導役割
仲野 道代 印	研究の総括指導
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	小児歯科学分野	身分	大学院生	氏名	田畑 佳子
論文題名	非アルコール性脂肪肝炎患者口腔由来 <i>Streptococcus mutans</i> の病態発症関連因子の解析				
論文内容の要旨 (2000字程度)					
<p><b>【目的】</b> 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、病態が進行することが稀な非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と、肝硬変や肝癌へと進行することがある非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) からなる。これまでに、齧蝕原性細菌 <i>Streptococcus mutans</i> のうち菌体表層にコラーゲン結合タンパク (Cnm) および高分子タンパク抗原 (PA) を保有する Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup> <i>S. mutans</i> が、NAFL から NASH への増悪化に関与している可能性が明らかにされている。本研究では、NAFLD 患者から分離した <i>S. mutans</i> の性状の分析および分子生物学的解析を行い、さらにマウスモデルに投与し NASH 発症を確認することで、これらのタンパクの NASH 発症への関与を検討した。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>1. NAFLD 患者唾液中の <i>S. mutans</i> 性状および分子生物学的解析</p> <p>1) 被験者 市立奈良病院で NAFLD と診断され肝生検を行った 40 名の患者 (NAFL: 20 名, NASH: 20 名) を対象とした。同意の得られた対象から唾液の採取および血液を採取し、研究に使用した。</p> <p>2) NAFLD 患者唾液中の <i>S. mutans</i> の分離と同定 唾液サンプルをバシトラシン含有 Mitis- Salivarius 寒天培地に播種し、得られたコロニーを Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地にて 37°C で 18 時間培養後、細菌 DNA を抽出し、<i>S. mutans</i> 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。<i>S. mutans</i> と同定された菌の Cnm の発現を、Cnm をコードする遺伝子 <i>cnm</i> に特異的なプライマーを用いて調べた。また、ウェスタンブロット分析により PA の発現の有無を調べた。</p> <p>3) コラーゲン結合能 I 型コラーゲンもしくは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に添加し 4°C で一晩反応させた。洗浄後、BHI 液体培地にて一晩培養した供試菌を添加し、37°C で 3 時間反応させた。洗浄後、菌を固定し、染色後に菌体コラーゲンに付着した染色剤を溶解させ、各ウェルの OD<sub>595</sub> 値を測定した。</p> <p>4) <i>cnm</i> および <i>pac</i> の発現量 各供試菌から通法を用いて全 RNA を回収し、逆転写により cDNA を合成した。作製した cDNA を用いて各供試菌の <i>cnm</i> および PA をコードする遺伝子 <i>pac</i> の発現量を Real-time qRT-PCR 法により調べた。</p>					

## 2. マウス NASH モデルを用いた検討

### 1) 使用した *S. mutans* 菌株

感染性心内膜炎患者からの血液分離株 *S. mutans* TW871 (Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup>) 株と、重度な NASH 患者から分離した口腔分離株 *S. mutans* KT3 (Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup>) 株を使用した。

### 2) 病原性の評価のための条件設定

6 週齢 C57BL/6J マウスに高脂肪食 (HFD) を摂取させ、HFD 投与開始 4 週間後に頸静脈より TW871 株および KT3 株を投与する群と非投与群に分けた。実験開始 16 週後に体重を測定し、屠殺した。屠殺時に血液を採取し、内臓脂肪および肝臓を摘出した。

### 3) 組織学的分析

各群より摘出した肝臓組織をヘマトキシリンエオジン (HE) 染色およびマッソントリクローム (MT) 染色し、脂肪蓄積、炎症性変化および線維化の有無を評価した。

## 【結果および考察】

NASH 患者群および NAFL 患者群の *S. mutans* 検出率に有意差は認められなかったものの、Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup> *S. mutans* は NASH 患者群から高頻度に検出された。NASH 患者群の血液データより、Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup> *S. mutans* を保有する群では、保有しない群と比較して、IV型コラーゲン-7S が有意に高い値を示し、アディポネクチンが有意に低い値を示した。また、Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup> *S. mutans* 菌株は、その他の菌株と比較して、コラーゲン結合能が高く、I型コラーゲンと比較してIV型コラーゲンに対して有意に高い結合能を示した。さらに、NASH 患者から分離された Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup> *S. mutans* の *pac* の発現量は、NAFL 患者のものと比較して有意に高い値を示した。またその発現量は、NASH 患者から分離された Cnm<sup>-</sup>/PA<sup>+</sup> *S. mutans* の *pac* の発現量と比較して有意に高かった。この菌株を、HFD を摂取させ肝臓に脂肪蓄積させたマウスモデルに投与したところ、脂質代謝異常および肝機能障害に関する項目の値の上昇が認められた。また HE 染色および MT 染色による肝臓組織像において、大滴性の脂肪沈着や炎症性細胞の浸潤、線維化像が認められ NASH の病態を呈することが確認された。

以上の結果から、Cnm<sup>+</sup>/PA<sup>+</sup> *S. mutans* が血液中に侵入すると、NASH を発症することが明らかとなった。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、炎症が惹起され NASH を誘発する可能性が示唆された。