

氏 名	中野 聡大
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第7462号
学位授与の日付	令和 8年 3月 25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	代謝機能障害関連脂肪肝炎に関連する生体内の鉄過剰環境が <i>Streptococcus mutans</i> の性状に及ぼす影響
論文審査委員	鈴木 茂樹 教授 美藤 純弘 准教授 中山 真彰 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

代謝機能障害関連脂肪肝炎 (Metabolic Dysfunction Associated Steatohepatitis; MASH) は、遺伝性疾患や輸血により生体内に取り込まれた鉄が、肝臓に過剰に蓄積することで酸化ストレスが誘発され発症すると考えられている。一方で、齧蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* 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)を有する株 (Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans*) が、MASH 発症に関与する可能性が報告されている。本研究では、鉄過剰環境が重度 MASH 患者由来の Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* 株に及ぼす影響について検討した。

【方法】

本研究は、市立奈良病院倫理委員会 (番号 32) および岡山大学病院倫理委員会 (研 1707-021) の承認後実施した。

1) 使用した *S. mutans* 菌株

供試菌には、重度 MASH 患者からの口腔分離株の Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* KT3 株および日本人小児由来の口腔分離株の PA のみを有する Cnm⁻/PA⁺ *S. mutans* MT8148 株を用いた。

2) 塩化鉄 (III) 溶液の調製

塩化鉄 (III) 六水和物を滅菌蒸留水に溶解し、1 μM, 2.5 μM, 5 μM, および 10 μM の塩化鉄 (III) 溶液を作製し、以降の各種実験に用いた。

3) 増殖速度の検討

各供試菌を Todd Hewitt (TH) 液体培地で培養した後、その菌液 100 μl を新鮮な TH 液体培地あるいは各濃度の塩化鉄 (III) 溶液を添加した TH 液体培地に継代培養した。可視分光光度計にて 1 時間毎に菌液の濁度を波長 550 nm で測定した。

4) RNA シーケンス解析

KT3 株の培養液を新鮮な TH 液体培地あるいは各濃度の塩化鉄 (III) 溶液を添加した TH 液体培地に継代し、波長 570 nm で対数増殖期後期まで培養した。その後、各供試菌から通法を用いて全 RNA を抽出し、*S. mutans* UA159 株の既知の配列をもとに RNA シーケンス解析を行った。

5) Real-time reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) による定量的遺伝子解析

通法を用いて上記と同様に KT3 株から抽出した全 RNA を用いて、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 *Cnm* をコードする遺伝子 *cnm* および *GTFB* をコードする遺伝子 *gtfB* 発現量を RT-qPCR 法により調べた.

6) バイオフィーム形成量の測定

各濃度の塩化鉄 (III) 溶液を加えた 0.5%スクロースまたは 0.5%グルコース含有 TH 液体培地に KT3 株および MT8148 株を添加し, サンプルとした. 各サンプルを 1%スクロース含有化学合成培地に播種し, 96穴平底細胞培養用マイクロタイタープレート of 各ウェルに 100 μ l ずつ分注した. 37°Cで24時間または 48時間嫌気培養後, 1%クリスタルバイオレット溶液にて染色し, 波長 570 nm で測定した.

7) バイオフィーム構造の観察

TH あるいは 1 μ M, 10 μ M の塩化鉄 (III) 溶液を添加した TH 液体培地にて培養した各供試菌を, ヨウ化ヘキシジウムにて染色後, 0.5%スクロース含有化学合成培地に懸濁した. この菌液をチャンバースライドに分注し, 37°Cで24時間培養後, 形成されたバイオフィームを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察した.

8) コラーゲン結合能

I 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. 10 μ M 塩化鉄 (III) 溶液あるいは 0.5%, 1% グルコース含有 TH 液体培地に供試菌を添加後, 各ウェルに播種し, 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, 各ウェルの波長 570 nm を測定した.

【結果および考察】

鉄存在下において, KT3 株は, 鉄非存在下と比較して増殖速度が有意に上昇し, MT8148 株では変化しなかった. そこで, RNA シーケンス解析を行ったところ, 鉄存在下の KT3 株において, 歯面への付着を強固にするバイオフィーム形成に不可欠な役割を果たす *gtfB* 遺伝子の発現上昇が認められ, 鉄の存在により KT3 株のバイオフィーム形成能が増加する可能性が示唆された. 一方で, 鉄存在下において KT3 株の *cnm* 発現量が低い値を示した. これらの結果から, 鉄の存在により *S. mutans* の菌体表層タンパクの構造が変化する可能性が示唆された. また, バイオフィーム形成量の比較では, スクロースを添加した場合, KT3 株が MT8148 株より低い値を示したものの, グルコースでは, KT3 株のバイオフィーム形成量が有意に高い値を示した. そして, 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィームの構造を観察したところ, KT3 株は鉄濃度の上昇に伴いバイオフィームの密度および厚みが増加した. さらに, KT3 株は鉄およびグルコース存在下において, I 型コラーゲンの結合能が有意に上昇した.

本研究より, *Cnm* を保有する *S. mutans* は, 鉄存在下で増殖能や *gtfB* 発現量が亢進し, また, グルコースおよび鉄存在下にてバイオフィーム形成能およびコラーゲン結合能が増加することが明らかとなった. このことから, 血液中に侵入した *Cnm* を保有する *S. mutans* は, 鉄およびグルコースが豊富に存在する肝臓内において有意に増殖し, バイオフィームを形成することで有意に付着し, 酸化ストレスを誘発することで MASH 発症に寄与する可能性が示唆された.

論文審査結果の要旨

【緒言】代謝機能障害関連脂肪肝炎 (Metabolic Dysfunction Associated Steatohepatitis; MASH) は、遺伝性疾患による鉄の過剰吸収や輸血による鉄の過剰摂取により、肝臓に蓄積した鉄による酸化ストレスの上昇を介して増悪化が誘発されることが報告されている。一方で、齧蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* のうち、菌体表層にコラーゲン結合タンパク (Cnm) を有する菌株が血行性に肝臓に到達し、肝細胞に付着することで、MASH 発症に関与する可能性が報告されている。本研究では、重度 MASH 患者より分離した Cnm⁺ *S. mutans* 株を用いて、鉄環境下における増殖速度、遺伝子発現状態、バイオフィーム形成量およびコラーゲン結合活性を評価した。

【方法】供試菌として、重度 MASH 患者口腔分離株の Cnm⁺ *S. mutans* KT3 株を用いて下記実験を行った。1~10 μ M の塩化鉄 (III) 添加時の増殖速度は波長 550 nm で濁度を 1 時間毎に測定し、遺伝子発現変化を RNA-seq およびリアルタイム PCR にて、バイオフィーム形成量はクリスタルバイオレット法にて、バイオフィーム構造を共焦点レーザー顕微鏡にて、コラーゲン結合活性を ELISA 法にて評価した。

【結果】KT3 株は 1~10 μ M の塩化鉄 (III) 存在下で、非添加群と比較して増殖速度が有意に上昇した。RNA-seq 解析により、鉄存在下の KT3 株において Cnm をコードする遺伝子である *cnm* の発現が低下した一方で、GTFB をコードする遺伝子である *gtfB* の発現上昇を認めた。そこで、鉄存在下における KT3 株のバイオフィーム形成量を解析したところ、スクロース条件下では鉄の有無で差は認めなかったものの、グルコース条件下では鉄存在下で有意に増加した。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、鉄濃度依存的に KT3 株のバイオフィーム密度および厚みが増加した。さらに、鉄もしくはグルコース条件下で I 型コラーゲンへの結合活性が有意に上昇した。

【考察】KT3 株の増殖速度は鉄存在下で促進し、バイオフィーム形成量およびコラーゲン結合活性が高グルコース条件下で増加することから、鉄過剰や高グルコースを伴う環境下では、Cnm⁺ *S. mutans* の肝臓への定着が促進され、MASH 病態に関与し得る可能性が示唆される。しかし、本研究では、遺伝子発現解析は鉄存在下でのみ行われており、高グルコース条件下での反応を評価していない点は本研究の限界である。

本論文は、Cnm を保有する *S. mutans* が MASH 発症に関与するメカニズムを解明する上で、重要な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。