

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

Streptococcus mutans の性状に及ぼす影響

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻

小児歯科学分野

中野聡大

(令和 7 年 12 月 5 日受付)

緒言

口腔常在菌のうち、*Streptococcus mutans* はグラム陽性通性嫌気性細菌であり、齲蝕の主要な病原細菌として知られている¹⁾。現在、*S. mutans* の菌体表層タンパクとして、コラーゲン結合タンパク Cnm、高分子タンパク抗原 (Protein antigen; PA)、グルコシルトランスフェラーゼ (Glycosyltransferase; GTF) タンパクなどが同定されている²⁾。*S. mutans* は、菌が自ら産生する GTF がスクロースからグルカンを合成することにより *S. mutans* 同士が付着し³⁾、歯面への付着を強固にし、堆積することでバイオフィルムを形成する⁴⁾。その後、成熟したバイオフィルムが酸を産生して、歯質を脱灰することにより齲蝕が誘発される⁵⁾。また、2004 年には、*S. mutans* の菌体表層に発現する分子量約 120 kDa のコラーゲン結合タンパクである Cnm が同定された⁶⁾。Cnm 陽性 *S. mutans* (Cnm⁺ *S. mutans*) は、I 型もしくは IV 型コラーゲンへの高い結合能を有し、コラーゲンに富む歯髄細胞や血管内皮細胞に対して高い付着能を示す⁷⁾。Cnm⁺ *S. mutans* は、健常者の口腔から約 10~20% の頻度で検出されることが明らかとなった⁸⁾。また、Cnm は *S. mutans* の細胞表面に存在し、突起状構造を形成していることを電子顕微鏡により観察されることが報告されている⁹⁾。この Cnm⁺ *S. mutans* が炎症性腸疾患、免疫グロブリン A 腎症、脳内出血、非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) といった全身性疾患の発症に関与する可能

性が示唆されている⁹⁾。

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) はメタボリックシンドロームを背景とし、肝臓に脂肪のみ蓄積する非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver; NAFL) と、脂肪の蓄積に加え、炎症性変化を伴う NASH に分類される¹⁰⁾。2023 年 6 月に欧州肝臓学会 (EASL), 米国肝臓病学会 (AASLD), ラテンアメリカ肝疾患研究協会 (ALEH) が合同で NAFLD および NAFL, NASH の名称変更を発表した。NAFLD/NASH 診療ガイドライン作成委員会が合同で検討を続けてきた結果, 2024 年 8 月に日本語の新たな病名と分類が正式に決定した¹¹⁾。肝臓の一連の変化の基幹となる状態が「脂肪性肝疾患 (SLD)」として定義され, これは従来の脂肪肝 (fatty liver) を同義としている¹¹⁾。この SLD の中で, 過剰飲酒がなく代謝異常が生じている場合を「代謝異常関連脂肪性肝疾患 (Metabolic dysfunction associated steatotic liver disease ; MASLD)」(従来の NAFLD) とし, MASLD に該当して, 同時に, 肝炎が生じている場合は, 「代謝異常関連脂肪肝炎(Metabolic dysfunction associated steatohepatitis; MASH)」(従来の NASH) と定義した¹¹⁾。以下, NAFLD を MASLD, NASH を MASH と記載する。

MASLD/MASH の主な背景としてインスリン抵抗性の増悪, およびメタボリックシンドロームとその関連疾患の 2 型糖尿病, 脂質異常症, 高血圧症がある¹⁰⁾。

さらに近年, MASLD から MASH への発症メカニズムとして, Multiple parallel-hit theory が広く支持されている¹²⁾。これは, 肝臓組織のみならず, 肝臓組織と脂肪組織, 腸管などの肝外臓器で相互作用し, 炎症・線維化が惹起され, MASH 発症に寄与するという考え方である¹³⁾。

MASH の病態進展において鉄過剰が重要な因子として注目されている。鉄は生体に必須な微量栄養素であるが, 体内に排泄機構が存在しないため, 一度過剰になると肝臓, 心臓, 内分泌器官などに蓄積し, 酸化ストレスを介して臓器障害や機能不全を惹起することが報告されている¹⁴⁾。また, 鉄過剰環境が脂肪肝の進展に関与する酸化ストレスや炎症の増強に寄与することが報告されており¹⁵⁾, 特に肝臓における鉄の異常な蓄積は, MASH の病的悪化や線維化の亢進に関係するとされている¹⁶⁾。つまり, 鉄代謝異常を呈する患者においては, 肝細胞障害や脂質代謝異常を介して MASLD から MASH への移行が促進される可能性がある¹⁶⁾。

これまでに, 高脂肪食を摂取させ, 肝臓に脂肪を蓄積させたマウスモデルを用いた動物実験では, *Cnm⁺ S. mutans* が MASLD から MASH への病態進行に関与している可能性があることが明らかにされている¹⁷⁾。さらに, 6 週齢の C57/BL6J マウスに高脂肪食を与え続けると, 48 週間後に MASH に類似する所見を呈したとの報告がある¹⁸⁾。一方で, HFD を 4 週間与え続けたマウスに *Cnm⁺*

S. mutans を頸静脈より投与すると、わずか12週間後に MASH に類似する所見を示すことが確認され、Cnm⁺ *S. mutans* が MASH 増悪化に関与することが示唆された¹⁹⁾。また近年、重度 MASH 患者口腔内から分離された Cnm⁺ *S. mutans* の割合は、MAFL 患者と比較して有意に高いことが示された。さらに、Cnm⁺ *S. mutans* をマウス頸静脈より投与した場合、菌非投与群と比較して、血清鉄 (Fe) 値が有意に高い値を示した²⁰⁾。

そこで本研究では、重度 MASH 患者より分離した Cnm⁺ *S. mutans* 株の増殖速度、遺伝子発現状態、バイオフィルム形成量およびコラーゲン結合活性に対する鉄の影響を in vitro で解析した。

材料と方法

1. 供試菌および培養条件

本研究は、市立奈良病院倫理委員会（承認番号 NCH 17-32）および岡山大学医療系部局研究倫理審査専門委員会（研 1707-021）の承諾を得た後、実施した。

供試菌には、重度 MASH 患者からの口腔分離株であり、 Cnm^+ *S. mutans* KT3 株²⁰⁾ を用いた。また、日本人小児由来の口腔分離株であり、 Cnm^- *S. mutans* MT8148 株²¹⁾ を用いた（表 1）。*S. mutans* の培養には、Todd Hewitt (TH) 液体培地（Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA）を用い、37°C で静置培養した。

2. 塩化鉄 (III) 溶液の調製

塩化鉄 (III) 六水和物 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 和光純薬, 大阪) を滅菌蒸留水 (DW) に溶解し、10 μM になるように調製した。その後、段階希釈を行い、1 μM , 2.5 μM , および 5 μM の塩化鉄 (III) 溶液を作製した。すべての溶液は 0.45 μm 滅菌フィルターで濾過滅菌し、以降の各種実験に用いた。

3. 増殖速度の検討

供試菌を 10 mL の TH 液体培地にて 37°C で 18 時間培養後、新鮮な同液体培地に継代した。培養した供試菌を TH 液体培地 あるいは 1, 2.5, 5, および 10 μM に調製した塩化鉄 (III) 溶液を添加した TH 液体培地に播種し、紫外可視分光光度計 GENESYS™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて

1 時間毎に各培養液の濁度を波長 550 nm で測定した.

4. RNA シーケンス解析

KT3 株を TH 液体培地で 37°C, 18 時間培養後, 塩化鉄 (III) 溶液(0 あるいは 2.5μM)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, 3000 rpm, 4°C, 10 分で遠心し, 菌体を回収した. 回収した菌体を 300 μl の UltraPure™ Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に懸濁し, Lysing Matrix B® (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) に菌液を移し, TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 900 μl 添加した後, FastPrep® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて菌体を破碎した. 破碎菌体を含む懸濁液を遠心し, クロロホルム (和光純薬) を混和させた後, 上清の全 RNA をイソプロパノール (和光純薬) を用いて沈殿させ, 回収を行った. 得られた全 RNA サンプルを大阪大学・微生物病研究所・ゲノム解析室に送付し, シーケンスライブラリーの構築および遺伝子発現の比較解析を行った.

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

RT-qPCR 法は Matsumoto-Nakano と Kuramitsu の方法に準じて行った²²⁾. KT3 株を TH 液体培地で 37°C, 18 時間培養後, 新鮮な TH 液体培地あるいは調製した塩化鉄 (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、3000 rpm, 4°C, 10 分で遠心し、菌体を回収した。回収した菌体を 300 µl の DEPC 処理水に懸濁し、Lysing Matrix B® に菌液を移し、TRI Reagent を 900 µl 添加した後、FastPrep® を用いて菌体を破砕した。破砕菌体を含む懸濁液を遠心し、クロロホルムを混和させた後、上清の全 RNA をイソプロパノールにより沈殿させ、回収を行った。その後、RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) を 37°C で 15 分間反応させ、回収した全 RNA から染色体 DNA を除去した。この mRNA サンプルから SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。作製した cDNA を鋳型として、各群の *cnm* および GTFB をコードする遺伝子 *gtfB* の発現を SYBR green® (Bio-Rad Laboratories) を用いた RT- qPCR 法により調べた。*cnm* の増幅には、cnm-202F と cnm-202R プライマーを用い、*gtfB* の増幅には、gtfB-F と gtfB-R プライマーを用いた(表 2)。遺伝子増幅反応および蛍光強度の測定には、StepOnePlus™ (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) を使用し、Real-time RT-qPCR の条件は添付文書に従い設定した。また、目的遺伝子は内部標準として 16S rRNA で補正した。

6. バイオフィーム形成量の測定

KT3 株あるいは MT8148 株を 10 mL の TH 液体培地にて 37°C で 18 時間培養後、新鮮な同液体培地に継代した。それらを 0.5% スクロースあるいは

0.5% グルコースを含む TH 液体培地に添加し、さらに、1, 2.5, 5, 10 μM に調製した塩化鉄 (III) 溶液を加え、サンプルとした。96 穴平底細胞培養用マイクロタイタープレート (FALCON, Franklin Lakes, NJ, USA) の各ウェルに各サンプルを 100 μl ずつ分注し、37°C で 24 時間嫌氣的に培養した。各ウェルの浮遊菌液を取り除いた後に、25 μl の 1% クリスタルバイオレット溶液 (Sigma-Aldrich) を加えて 15 分間室温に静置し、滅菌蒸留水で 6 回洗浄を行った。その後、95% エタノールを加えて洗浄し、乾燥後、蒸留水を加えて波長 570 nm における吸光度を測定した。

7. バイオフィーム構造の観察

バイオフィーム構造の変化を、Koo らの方法に従って観察した²³⁾。KT3 株あるいは MT8148 株を TH 液体培地で 37°C, 18 時間培養後、新鮮な同液体培地に継代し、波長 570 nm で対数増殖期後期まで培養した。その後、3000 rpm, 4°C, 10 分で遠心し、菌体を回収した。10 mM のヨウ化ヘキシジウム (Thermo Fisher Scientific) で菌体を染色し、0.5% スクロース含有化学合成培地²⁴⁾ (CDM; 58 mM K_2HPO_4 , 15 mM KH_2PO_4 , 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 35 mM NaCl, 0.2% Casamino acids, 100 M $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.4), 20 mM Nicotinic acid, 50 mM Pyridoxine HCl, 5 mM Pantothenic acid, 0.5 mM Riboflavin, 0.15 mM Thiamin HCl, 0.015 mM D-biotin, 50 mM L-glutamic acid, 12.5 mM L-arginine HCl, 16.25 mM L-cysteine HCl, 1.25 mM

L-tryptophan, 1 M MgSO₄ · 7H₂O; 和光純薬) あるいは 1 μM および 10 μM 塩化鉄 (III) 溶液を添加した 0.5% スクロース含有 CDM にて, 波長 570 nm が 0.1 となるよう調製した. この菌液をポリスチレン製 8 穴 Lab-Tek チャンバースライドシステム (Nunc, Rochester, NY, USA) に 200 μl ずつ播種し, 嫌気下で 37°C, 24 時間培養した. 形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡 LSM780 (Version 4.2, Carl Zeiss MicroImaging Co., Oberkochen, Germany) にて観察した. バイオフィルムの密度 (Integrated/area) は ImageJ® (Version 10.2, Macintosh computer application, Bethesda, MD, USA) により数値化し評価した. 測定は, 1 画像につき各 9 箇所を無作為に抽出して行った.

8. コラーゲン結合活性の評価

KT3 株のコラーゲン結合活性は, Nomura らの方法に準じて測定した²⁵⁾. 0.25 M 酢酸に溶解した I 型コラーゲン [Collagen (type I); Sigma-Aldrich] 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 μl ずつ添加し, 4°C で一晩反応させた. このウェルを PBS で 3 回洗浄した後, 37°C で 90 分間 5% Bovine Serum Albumin (BSA ; Sigma-Aldrich) で反応させた. その後, 0.01% の Tween-20 (和光純薬) を含有した PBS で洗浄した. TH 液体培地で一晩培養した供試菌を 3000 rpm, 4°C, 10 分で遠心し, 菌体を回収した. 回収した菌体を PBS で洗浄後, 10 μM 塩化鉄 (III) 溶液もしくは 0.5%, 1% グルコースを添加し, 懸

濁したのち、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°C で3時間反応後、PBS で3回洗浄し、25% ホルムアルデヒド (和光純薬) で菌を固定した。PBS で3回洗浄後、200 μ l の0.5% クリスタルバイオレット (Sigma-Aldrich) で1分間染色し、PBS で3回洗浄した。その後、7% 酢酸 200 μ l を加えて、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 における吸光度を測定した。

なお、統計学的有意差の検定には、One-way ANOVA 検定および Kruskal-Wallis 検定を用いて対照群との比較を行った。その後の検定として、Dunnett 検定を行い、有意水準 5% 未満の場合を有意差ありとした。

結果

1. 増殖速度の検討

塩化鉄 (III) 溶液を添加した KT3 群では、無添加群と比較して、増殖速度の有意な増加が認められた ($P < 0.05$, $P < 0.01$)(図 1a). また、塩化鉄 (III) 溶液の濃度別では有意な差は認められなかった(図 1a). 一方、塩化鉄 (III) 溶液を添加した MT8148 群では、添加していない群と比較して、培養後 5 時間目までは増殖速度に有意な差は認められなかった ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (図 1b). また、MT8148 群においても、塩化鉄 (III) 溶液の濃度別では有意な差は認められなかった(図 1b).

2. RNA シーケンス解析

塩化鉄 (III) 溶液を添加した KT3 株の遺伝子発現量の変化を RNA シーケンス解析により網羅的に解析した. その結果、塩化鉄 (III) 溶液を添加していない群と比較して、添加した群では、細菌の糖代謝および膜輸送に関与する複数の遺伝子で発現上昇が認められた(表 3). ABC トランスポーター関連遺伝子 *ptcB*, *msmK* および *msmF* は、塩化鉄 (III) 溶液を添加していない群と比較して添加した群において発現量が上昇しており、それぞれ約 12 倍、約 6.5 倍、および約 4.2 倍を示した. また、糖転移酵素 *gtfA*, 金属イオン輸送に関与する *copA*, 浸透圧保護に関連する *opuCd*, およびストレス応答因子である *clpB* の発現上昇も認められた. さらに、*gtfB* についても発現が上昇し、約 2 倍であった.

3. リアルタイム PCR による定量的遺伝子解析

塩化鉄 (III) 添加が KT3 株の *cnm* および *gtfB* の発現変化に及ぼす影響をリアルタイム PCR により解析した. 塩化鉄 (III) 溶液を非添加群の KT3 株の *cnm* および *gtfB* 遺伝子の発現量を 1 とした相対値で示した. その結果, KT3 株における *cnm* の発現量は, すべての塩化鉄 (III) 溶液の濃度において添加していない群と比較して低い傾向を示し, 10 μ M の塩化鉄 (III) 溶液を添加した群では, 添加していない群のものと比較して有意に低い値を示した ($P < 0.01$)(図 2). 対照的に, *gtfB* の発現量は, すべての塩化鉄 (III) 溶液の濃度において添加していない群と比較して高い傾向を示し, 1 μ M の塩化鉄 (III) 溶液を添加した群では, 添加していない群と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.05$)(図 3).

4. バイオフィーム形成量の比較

0.5% スクロース含有 TH 液体培地において, KT3 株のバイオフィーム形成量は, 添加していない群と比較して, すべての塩化鉄 (III) 溶液の濃度で有意な差は認めなかった (図 4a). 一方, 0.5% グルコース含有 TH 液体培地では, 塩化鉄 (III) 溶液を添加した KT3 株のバイオフィーム形成量は, 添加していない群と比較してすべての濃度で有意に高い値を示した ($P < 0.001$)(図 4b). また, MT8148 株のバイオフィーム形成量は, 0.5% スクロースおよび 0.5% グルコースのいずれにおいても, 塩化鉄 (III) 溶液を添加していない群と比較して, すべての塩化

鉄 (III) 溶液の濃度で有意な差は認めなかった (図 5a,b).

5. バイオフィルムの構造

鉄の存在が, 形成されるバイオフィルムの密度と厚みに与える影響を検討するために, 共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィルム構造を観察した. 塩化鉄 (III) 溶液を添加していない群において, KT3 株のバイオフィルムの密度は, MT8148 株と比較して疎であった. しかし, KT3 株におけるバイオフィルムの密度は塩化鉄 (III) 溶液の濃度が上昇するにつれて増加傾向を示した ($P < 0.01$, $P < 0.001$). 一方で, MT8148 株では, 全ての群で均一なバイオフィルム形成を認めた ($P < 0.01$)(図 6,7).

6. コラーゲン結合活性の比較

塩化鉄 (III) 溶液およびグルコース存在下における KT3 株の I 型コラーゲンへの結合活性を検討した. Cnm 陽性 *S. mutans* における I 型コラーゲン結合試験では, 塩化鉄 (III) 溶液単独群 (10 μ M) では対照群と比較して有意な結合活性の上昇が認められた ($P < 0.05$). 同様に, 0.5% グルコースおよび 1% グルコース単独の群においても, 対照群と比較して I 型コラーゲンに対する結合活性が有意に増加していた ($P < 0.01$, $P < 0.001$)(図 8).

考察

鉄は酸化還元反応を起こしやすい元素であり、また、鉄を利用することで大量のエネルギーを得ており、生物にとって必須の栄養素である。しかし、鉄の反応性の高さは、毒性の高い活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) を容易に生み出すことにもつながり、細胞にとって酸化ストレスの原因にもなる¹⁵⁾。鉄が生体内で過剰になると排泄機構を持たないため、肝臓、心臓、内分泌器官などに蓄積し、酸化ストレスを介して臓器・組織の傷害や機能不全を惹起する¹⁴⁾。鉄過剰症の発症原因は、また、鉄代謝制御分子の先天性異常 (原発性鉄過剰症/遺伝性鉄過剰症) と、無効造血や頻回輸血を原因とする二次性鉄過剰症がある²⁶⁾。特に、わが国では、原発性鉄過剰症の頻度は低く、大部分が悪性腫瘍や血液疾患の治療などに伴う輸血によって生じる輸血後鉄過剰症が多い²⁶⁾。その他として、慢性肝疾患患者では、非輸血例においても肝臓における鉄の蓄積がしばしば認められる¹³⁾。また、近年の報告では、MASLD 患者の約 3 分の 1 において肝臓内に鉄が蓄積することが明らかとなっていることが報告されている¹³⁾。同様に、MASH 患者においても、肝臓の鉄蓄積と組織学的重症度の増加に正の相関があることが報告され²⁷⁾、鉄過剰環境は MASH の病態進展に寄与している可能性が示唆されている。

これまでの Naka らの報告によると、4 週間高脂肪食を与えたマウス MASH

モデルに感染性心内膜炎患者からの血液分離株であり, Cnm を保有する *S. mutans* (TW871 株)を頸静脈より投与したところ, 16 週後に MASH の増悪化が引き起こされた¹⁷⁾. 一方で, 標準株である Cnm を保有していない *S. mutans* MT8148 株では, MASH 様症状は生じないことが報告されている¹⁷⁾. このことから, Cnm の保有の有無が MASH 増悪化の重要な因子である可能性が考えられた. そこで, 本研究では, Cnm タンパクに着目し, MASH と診断された患者から分離された *S. mutans* KT3 株を用いて鉄過剰環境における *S. mutans* 株の性状の分析を行った.

本研究の結果より, KT3 株は塩化鉄 (III) 溶液存在下において, 増殖速度が有意に速くなる(図 1a)ことが明らかとなり, 一方で, MT8148 株に変化が認められなかった(図 1b)ことから, Cnm の保有の有無が鉄応答性に影響している可能性が示唆された. そして, 塩化鉄 (III) 溶液存在下における Cnm を保有する *S. mutans* について詳細に調べるため, RNA シーケンス解析により, 遺伝子発現変化を網羅的に解析した. その結果, KT3 株は塩化鉄 (III) 溶液存在下で *gtfB* 遺伝子や糖輸送関連遺伝子である PTS (Phosphotransferase system) の発現上昇が認められた(表 3). GTFB は, スクロースから不溶性グルカンを合成し, 歯面への付着を強固にするバイオフィルム形成に不可欠な役割を果たす²⁸⁾. また, PTS 系は細菌が糖を取り込む際に利用し, リン酸化と輸送を同時に行う重要な経路で

あり、塩化鉄 (III) 溶液存在下におけるエネルギー代謝の活性化を反映している²⁹⁾。この結果から、鉄イオンが存在することにより、バイオフィーム形成および糖代謝活性が促進される可能性が示唆された。

cnm および *gtfB* の遺伝子発現量の変化を RT-qPCR 解析により確認した(図 2, 図 3)。塩化鉄 (III) 溶液を添加した群において KT3 株の *cnm* 発現量は、塩化鉄 (III) 溶液を添加していない群と比較して有意に低下したのに対し、*gtfB* 発現量は有意に増加した。*Cnm* を保有する *S. mutans* は塩化鉄 (III) 溶液存在下において *gtfB* の発現上昇が認められたことから、鉄イオンの存在によりバイオフィーム形成能が上昇する可能性が示唆された。これらの結果から、塩化鉄 (III) 溶液存在下では *cnm* 発現量が抑制され、相対的に、バイオフィーム形成関連遺伝子である *gtfB* 発現量が増強されることで、*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。

そこで、塩化鉄 (III) 溶液存在下における *S. mutans* のバイオフィーム形成量を調べるため、KT3 株および MT8148 株を用いて検討を行った。その結果、0.5% スクロース条件下では、KT3 株および MT8148 株のいずれにおいても、塩化鉄 (III) 溶液を添加していない群と比較して、すべての濃度でバイオフィーム形成量に有意な差は認めなかった(図 4a, 図 5a)。*S. mutans* は通常、スクロースを基質として GTF によりグルカンを産生したのちに、バイオフィームを形成

する。しかし、肝疾患を有する患者には糖代謝異常が合併するという報告があることから³⁰⁾、肝疾患の病態環境を模倣した条件として、肝臓に多く含まれるグルコースに着目し、グルコースを添加した条件下にて同様の検討を行った。その結果、0.5% グルコース条件下では、塩化鉄 (III) 溶液を添加した KT3 株のバイオフィーム形成量は、添加していない群と比較してすべての濃度で有意に高い値を示した(図 4b)。一方で、MT8148 株では、いずれの濃度においても有意な差は認めなかった(図 5b)。このことから、鉄イオンおよび高グルコースを伴う環境下において、Cnm を保有する *S. mutans* のバイオフィーム形成量が増強される可能性が示唆された。

さらに、共焦点レーザー顕微鏡により KT3 株および MT8148 株のバイオフィームの構造を観察した。KT3 株では、塩化鉄 (III) 溶液 1 μ M および 10 μ M を添加した場合、菌の密度が塩化鉄 (III) 溶液を添加していない群と比較して有意に高い値を示し、菌の凝集も認められた(図 6, 図 7a)。MT8148 株においても同様に塩化鉄 (III) 溶液を 10 μ M 添加した場合では、塩化鉄 (III) 溶液を添加していない群と比較して菌の密度がわずかに増加したものの、KT3 株と比較して変化は少なかった(図 6, 図 7b)。このことから、鉄イオンは Cnm に特異的に影響している可能性が示唆された。この結果は、鉄の存在が Cnm を保有する *S. mutans* のバイオフィーム構造の肥厚化を促進することを示しており、鉄応答性

のメカニズムの一端である可能性が示唆された。

Cnm は I 型コラーゲンへの結合能を有することが報告されており³¹⁾、また、I 型コラーゲンは象牙質や歯根表面のみならず、線維化が進行した肝臓組織にも豊富に存在することが知られている³¹⁾。そこで、本研究では、塩化鉄 (III) 溶液およびグルコース存在下における KT3 株の I 型コラーゲンへの結合活性を検討した。KT3 株は塩化鉄 (III) 溶液およびグルコースの存在下において、I 型コラーゲンに対して高い結合活性を示すことが明らかになった(図 8)。

本研究における結果は、鉄過剰環境および高糖環境下での *S. mutans* のコラーゲン親和性が増強されることにより、MASH 病態における肝臓組織への付着性が高まる可能性を示唆している。これは、Cnm が象牙質への接着因子だけでなく、全身疾患との関連性を持つ病原因子であることの裏付けであると考えられる。また、口腔細菌が全身性炎症疾患において、臓器特異的に作用する機序の一端を明らかにするものである。

しかしながら、本研究における遺伝子発現解析は鉄イオン存在下でのみ実施しており、高グルコース条件下における反応を評価していない。したがって、高グルコース存在下で観察されたバイオフィーム形成量やコラーゲン結合活性の増加が、*gtfB* を含む糖代謝・輸送関連遺伝子の発現変動により媒介されているのか、あるいは鉄応答と独立した別経路による現象であるのかについては、本研究の

データのみからは結論できない。今後は、高グルコース条件下における RNA-seq 解析や RT-qPCR により、遺伝子発現量の変化を検証し、加えて、鉄イオン添加による影響を評価することで、Cnm⁺ *S. mutans* の病原性発現機序をより明確化する必要がある。

本研究の結果より、Cnm を保有する *S. mutans* は、塩化鉄 (III) 溶液存在下で増殖能や *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量およびコラーゲン結合活性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。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学学術
研究院医歯薬学域小児歯科学分野の仲野道代教授ならびに岡山大学大学院医歯
薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の仲 周平准教授および
田畑佳子助教に心から感謝致します．また，様々な面にわたり貴重な御助言と御
協力を下さいました，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専
攻小児歯科学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます．

文献

- 1) Selwitz RH, Ismail AI, and Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. **369**: 51–59, 2007.
- 2) Baker JL, Faustoferri RC, and Quivey RG Jr. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*: the more we know, the more we don't. *Mol. Oral Microbiol.* **32**: 107–117, 2017.
- 3) Cross ES, Kreth J, Zhu L, Richard S, Shi W, Qi F, and Gimzewski KJ. Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions. *Microbiology*. **153**: 3124–3132, 2007.
- 4) Banas JA, and Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **14**: 89–99, 2003.
- 5) Savas S, Sari S, Uysal O, et al. Acid production is an important virulence factor of *Streptococcus mutans* biofilms that warrants attention in studies of dental caries prevention. *J. Oral Sci.* **57**: 367-374, 2015.

- 6) Sato Y, Okamoto K, Kagami A, Yamamoto Y, Igarashi T, and Kizaki H. Streptococcus mutans strains harboring collagen-binding adhesin. J. Dent. Res. **83**: 534–539, 2004.
- 7) Abranches J, Miller HJ, Martinez RA, Simpson-Haidaris JP, Burne AR, and Lemos AJ. The collagen-binding protein Cnm is required for Streptococcus mutans adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. Infect. Immun. **79**: 2277–2284, 2011.
- 8) Suehiro Y, Okuda M, Otsugu M, Ochiai M, Takagi M, Tojo F, Mikasa Y, Naka S, Matsumoto-Nakano M, Lapirottanakul J, Okawa R, Nomura R and Nakano K. Prevalence of Streptococcus mutans harboring the cnm gene encoding cell surface protein Cnm in Japanese children. Sci. Rep. **15**: 27047, 2025.
- 9) Naka S, Matsuoka D, Goto K, Misaki T, Nagasawa Y, Ito S, Nomura R, Nakano K, and Matsumoto-Nakano M. Cnm of *Streptococcus mutans* is important for cell surface structure and membrane permeability. Front. Cell. Infect. Microbiol. **12**:

994014, 2022.

10) 日本肝臓学会. NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2020 (改訂第2版). 南江堂, 2020.

11) Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, and Younossi ZM, et al.
A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature.
J. Hepatol. **79**: 1542–1556, 2023.

12) Takaki A, et al. Multiple hits, including oxidative stress, in the pathogenesis of
NAFLD/NASH. J. Gastroenterol. **48**: 441–447, 2013.

13) Tilg H, and Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver
disease: the multiple parallel hits hypothesis. Hepatology. **52**: 1836–1846, 2010.

14) Fujiwara S, Izawa T, Mori M, Atarashi M, Yamate J, and Kuwamura M. Dietary iron
overload enhances Western diet-induced hepatic inflammation and alters lipid
metabolism in rats sharing similarity with human DIOS. Sci. Rep. **12**: 21414, 2022.

- 15) Nakamura T, Takahashi K, Fukui S, et al. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and ferroptosis. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1863**: 1295–1306, 2019.
- 16) Chen H. Iron metabolism in non-alcoholic fatty liver disease: a promising therapeutic target. *Liver Res.* **6**: 203–213, 2022.
- 17) Naka S, Hatakeyama R, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M, Nomura R, and Nakano K. Contributions of *Streptococcus mutans* Cnm and PA antigens to aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci. Rep.* **6**: 36886, 2016.
- 18) Jeong B-K, Choi W-I, Choi W, Moon J, Lee W-H, Choi C, Choi I-Y, Lee S-H, Kim J-K, Ju Y-S, Kim P, Moon Y-A, Park J-Y, Kim H, and Kim H. A male mouse model for metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* **15**: 6506, 2024.
- 19) Naka S, et al. Longitudinal comparison of *Streptococcus mutans*-induced

aggravation of NASH in mice. PLoS One. **13**: e0193329, 2018.

- 20) 田畑佳子. 非アルコール性脂肪肝炎患者口腔由来 *Streptococcus mutans* の分子生物学的解析による発症関連因子の検討. 岡山大学, 博士（歯学）学位論文, 甲-6615, 2022
- 21) Ooshima T, Izumitani A, Sobue S, and Hamada S. Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. Jpn. J. Med. Sci. Biol. **36**: 219–223, 1983.
- 22) Matsumoto-Nakano M, and Kuramitsu KH. Role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. **188**: 8095–8102, 2006.
- 23) Koo H, Xiao J, Klein MI, and Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. J. Bacteriol. **192**: 3024–3032, 2010.
- 24) Bouvet A, van de Rijn I, and McCarty M. Nutritionally variant streptococci from

patients with endocarditis: growth parameters in a semisynthetic medium and demonstration of a chromophore. *J. Bacteriol.* **146**: 1075–1082, 1981.

25) Nomura R, Nakano K, Naka S, Nemoto H, Masuda J, Lapirottanakul J, Alaluusua S, Matsumoto M, Kawabata S, and Ooshima T. Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral Microbiol.* **27**: 308–323, 2012.

26) 日本造血・再生医療学会．輸血後鉄過剰症ガイドライン 2022．造血障害疾患研究班, 2023.

27) Nelson JE, Wilson L, Brunt EM, et al. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* **53**: 448–457, 2011.

28) Aoki H, Shiroza T, Hayakawa M, Sato S, and Kuramitsu HK. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infect. Immun.* **53**: 587–594, 1986.

- 29) Postma PW, Lengeler JW, and Jacobson GR. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543–594, 1993.
- 30) García-Compeán D, Jáquez-Quintana JO, Lavallo-González FJ, et al. The prevalence and clinical characteristics of glucose metabolism disorders in patients with liver cirrhosis: a prospective study. *Ann. Hepatol.* **11**: 240–248, 2012.
- 31) Nomura Y, Maekawa Y, Hanada N, et al. Contribution of the collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* to bacterial colonization of inflamed dental pulp. *PLoS One.* **11**: e0150130, 2016.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 小児歯科学分野

(指導：仲野道代教授)

図の説明

図 1 塩化鉄(III) 添加が *S. mutans* KT3 株および MT8148 株の増殖能に与える影響

塩化鉄(III) 溶液濃度を 1, 2.5, 5, 10 μM に設定し, 各菌株の増殖曲線を測定した. KT3 株(図 1a)および MT8148 株(図 1b)を 37°C で培養し, 波長 550 nm における吸光度を経時的に測定した. 鉄非添加群との比較により群間差を Kruskal–Wallis 検定で評価した ($n = 4$, Mean $\pm$ SD, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$).

図 2 鉄存在下における *S. mutans* KT3 株の *cnm* 遺伝子発現量の比較

塩化鉄(III) 溶液 1, 2.5, 5, 10 μM 添加した条件下で培養した KT3 株の *cnm* 遺伝子発現量を, 塩化鉄(III) 溶液を添加していない群を基準 (1.0) として相対的に算出した. qRT-PCR 法により測定し, 群間差を Kruskal–Wallis 検定で評価した ($n = 4$, Mean $\pm$ SD, $**P < 0.01$).

図 3 塩化鉄(III) 溶液存在下における *S. mutans* KT3 株の *gtfB* 遺伝子発現量の比較

塩化鉄(III) 溶液 1, 2.5, 5, 10 μM 添加した条件下で培養した KT3 株の *gtfB* 遺

伝子発現量を，塩化鉄(III) 溶液を添加していない群を基準 (1.0) として相対的に算出した．qRT-PCR 法により測定し，群間差を Kruskal–Wallis 検定で評価した ($n = 4$, Mean $\pm$ SD, $*P < 0.05$).

図 4 0.5% スクロースおよび 0.5% グルコース条件下で塩化鉄(III) 溶液の添加が *S. mutans* KT3 株のバイオフィルム形成能に与える影響

KT3 株を 0.5% スクロース(図 4a)および 0.5% グルコース(図 4b)含有培地で培養し，塩化鉄(III) (0, 1, 2.5, 5, 10 μ M) を添加した．24 時間後に形成されたバイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色し，波長 570 nm における吸光度を測定した．KT3 株間で One-way ANOVA 検定で評価した ($n = 3$, Mean $\pm$ SD, $***P < 0.001$).

図 5 0.5% スクロースおよび 0.5% グルコース条件下で塩化鉄(III) 溶液の添加が *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルム形成能に与える影響

MT8148 株を 0.5% スクロース(図 5a)および 0.5% グルコース(図 5b)含有培地で培養し，塩化鉄(III) (0, 1, 2.5, 5, 10 μ M) を添加した．24 時間後に形成されたバイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色し，波長 570 nm における吸光度を測定した．MT8148 株間で One-way ANOVA 検定で評価した ($n = 3$, Mean $\pm$

SD).

図 6 塩化鉄(III) 溶液存在下における *S. mutans* KT3 株および MT8148 株のバイオフィルム構造の解析

塩化鉄(III) 溶液を添加していない群および 塩化鉄(III) 溶液 1 μ M, 10 μ M 添加群における各菌株のバイオフィルム構造を共焦点レーザー顕微鏡により観察した. KT3 株(図 6a)では鉄添加によりバイオフィルム構造の密度上昇が観察された. MT8148 株(図 6b)では顕著な変化は認められなかった.

図 7 塩化鉄(III) 溶液存在下における *S. mutans* KT3 株および MT8148 株のバイオフィルム密度の比較

共焦点レーザー顕微鏡像を ImageJ[®] により解析し, バイオフィルムの密度(Integrated density/area)を数値化した. 塩化鉄(III) 溶液を添加していない群および 塩化鉄(III) 溶液 1 μ M, 10 μ M 添加群を比較し, Kruskal–Wallis 検定により有意差を評価した ($n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, Mean $\pm$ SD).

図 8 塩化鉄(III) 溶液存在下における *S. mutans* KT3 株のコラーゲン結合能の比較

KT3 株を塩化鉄(III) 溶液 10 μ M または 0.5%, 1% グルコース条件下における I 型コラーゲンに対する結合能との間で有意差検定を行った. 波長 570 nm における吸光度を測定し, One-way ANOVA 検定を用いて解析した (n=3, Mean $\pm$ SD, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001).