

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
(自 署)	研究の総括指導
(自 署)	
(自 署)	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野	小児歯科学分野	身分	大学院生	氏名	中野 聡大
論文題名 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					
論文内容の要旨 (2000字程度)					
【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、齲蝕原性細菌 <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) を有する株 (Cnm⁺/PA⁺ <i>S. mutans</i>) 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⁺ <i>S. mutans</i> 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 <i>S. mutans</i> 菌株 供試菌には、重度 MASH 患者からの口腔分離株の Cnm⁺/PA⁺ <i>S. mutans</i> 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⁺ <i>S. mutans</i> 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、<i>S. mutans</i> 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 <i>cnm</i> および GTFB をコードする遺伝子 <i>gtfB</i> 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の各ウェルに 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。