

論文審査の結果の要旨

氏名：中村 知世

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：*Streptococcus mutans* が生産する membrane vesicles の病原性と免疫抗原としての特徴

審査委員：(主査) 教授 竹永章生

(副査) 教授 川井 泰

教授 細野 朗

准教授 成澤直規

第1章 緒言

Streptococcus mutans は口腔内に存在する通性嫌気性のグラム陽性連鎖球菌で酸生産性、酸耐性に優れており、歯面への高い付着能とバイオフィルム (BF) 形成能を有する。よって *S. mutans* はう蝕原性細菌とされ、これら特徴に関連するものは病原因子として広く研究されてきた。BF 形成因子の1つである Gtf はスクロースを基質としてグルカンを形成し、特に非水溶性グルカンを形成する GtfB、GtfC が BF 形成に大きな役割を果たしている。PAc は約 190 kDa の Antigen I/II、P1 などとも呼ばれる線毛様表層タンパク質である。PAc はスクロース非依存性の病原因子であり、唾液ペリクルに結合することから歯面への初期付着に関与している。

ヒト口腔内には多くの細菌が存在しており、現在約 700 種類以上が同定されている。*S. mutans* は上記 BF 形成因子を有することから口腔内で後期に定着する細菌であるが、様々な口腔内細菌の歯表面定着にも寄与している。初期定着菌が歯面に BF を形成し口腔内環境を調節することで、歯周病菌などの後期定着菌が口腔内へ定着することが可能になり、口腔内疾患が生じる。これら疾患は口腔内だけではなく糖尿病や心内膜炎などの全身疾患につながるとされており、口腔内細菌のコントロールが健康的な生活につながると考えられている。

う蝕予防の研究として BF 形成メカニズムについて多くの研究が行われてきた。しかしメカニズムについては現在も未知の部分が多く存在しており、これらについて理解することが効率的なう蝕予防につながると考えられる。そこで今回の研究では新たな BF 形成因子の可能性が示唆される membrane vesicles (MV) について着目することとした。MV は膜小胞と呼ばれ、細菌が生産する 20-500 nm の球状構造体で MV 中には核酸や毒素、脂質、酵素など様々な物質が含まれることから物質の運び屋としての機能をもつ。*S. mutans* は 2014 年に MV を生産することが報告されている。この報告の中で MV 中に Gtf や PAc などの病原因子が含まれていることは明らかとなったが、その活性や役割については未解明の部分が多い。そこで本研究では、*S. mutans* の MV について、主要な病原因子である Gtf 活性、PAc の有無、BF 形成と免疫抗原としての特徴の検討を行った。

第2章 *S. mutans* の MV 中に含まれる病原因子に関する検討

本検討では MV における Gtf 活性及びその存在量と PAc の有無について確認を行った。供試菌株は実験室株である *S. mutans* UA159 株とその変異株である *gtfB* 株、*gtfC* 株、GtfB 及び GtfC を含まない *gtfBC* 株である。それぞれの菌を 1 L の Brain Heart Infusion 液体培地で培養し、上清を 50 kDa で限外濾過後、超

遠心分離(150,000 x g)を行い、その沈殿を 200 μ L の PBS で懸濁し MV とした。

まず MV が BF 形成に関与するのか確認を行うため野生株と BF 形成能が欠落した *gtfBC*⁻ 株の MV を用いて BF 形成量の評価を行った。BF 形成量の評価はプレート上で *gtfBC*⁻ 株に MV を加える BF 形成実験を用いて行った。野生株の MV では濃度依存的に BF 形成促進効果がみられたが、*gtfBC*⁻ 株の MV では BF 形成効果がみられなかった。このことから MV に含まれる GtfB と GtfC は BF 形成促進効果を有することが示唆された。そこでこれら MV 中の Gtf の活性を確認するために Zymography、Western-blotting を用いて検討を行った。野生株では活性のある Gtf を多く含んでいたが、*gtfBC*⁻ 株の MV では Gtf が検出されなかった。したがって MV 中の活性のある Gtf が BF 形成に関与していることが明らかとなった。

活性のある Gtf が BF 形成促進効果をもつことが明らかとなったが、MV による BF 形成に重要な因子は GtfB、GtfC のどちらであるか明らかではない。そこで各変異株の MV を用いて BF 形成促進効果を評価した。*gtfB*⁻ 株の MV は野生株の MV と同程度の BF 形成促進効果を有していたが、*gtfC*⁻ 株の MV は野生株の MV と比較して BF 形成能が低下した。SDS-PAGE 及び Gtf 抗体を用いた Western-blotting にて Gtf 量の確認を行ったところ、野生株の MV と比較して *gtfB*⁻ 株の MV では 80%、*gtfC*⁻ 株の MV では 31% の Gtf 量であった。したがって MV に含まれている Gtf は GtfC が主であることが明らかとなり、BF 形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

MV によって細菌を歯面に定着させるためには MV が歯面に付着し、MV に含まれる GtfC が歯表面でグルカンを形成する必要がある。そこで付着因子として PAc が知られていることから MV 中での PAc の存在量について検討を行うこととした。Western-blotting にて *S. mutans* 野生株及び各 Gtf 変異株の MV において PAc の存在が確認されたが、各 Gtf 変異株での PAc 量は野生株に比べて減少していた。このことから MV 中の PAc の量は Gtf の存在に依存することが明らかとなった。また PAc が MV に含まれていることから、MV は PAc により歯面に付着し BF 形成に重要な役割を果たすことが考えられた。そこで MV を先にプレートに接種しグルカン合成の基質であるスクロースを加えて培養後、定着しなかった MV を洗浄により除去、その後同じ培地と *gtfBC*⁻ 株を加えることで MV の先の付着及びグルカン形成が BF 形成能に影響を与えるかについて検討を行った。野生株の MV を加えて 2 時間以上経過することで BF 形成量が上昇することが明らかとなった。MV が表面に付着することで GtfC が誘導され、2 時間以上培養することでグルカンを合成され BF 形成を誘導すると考えられた。このことから MV は PAc により歯面に付着し、その後形成されたグルカンを BF 形成を誘導することが示唆された。

S. mutans の MV が BF 形成能を有することから、他の口腔内細菌においても同様に BF 形成を誘導することが考えられたため、様々な口腔内細菌と *S. mutans* の野生株及び *gtfBC*⁻ 株の MV を用いて BF 形成実験を行った。歯表面への初期定着細菌と考えられている *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* と *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces oris* において野生株の MV により BF 形成量が増加した。この BF 形成量の増加は *gtfBC*⁻ 株の MV でみられなかったことから、これらも Gtf による効果であると考えられた。また *Streptococcus salivarius* や *Streptococcus anginosus* などの歯表面初期定着菌ではない口腔内細菌は、MV による BF 形成が誘導されなかった。よって MV は初期定着菌の能力を利用して BF を形成させることが考えられた。

第 3 章 *S. mutans* MV の抗体生産性に関する検討

近年ワクチン開発研究において、MV は菌体よりもサイズが小さく、加えて病原因子を多く含むことから粘膜免疫による病原因子に対する抗体誘導が可能であり、様々な細菌で粘膜ワクチン抗原として注目されている。髄膜炎菌である *Neisseria meningitidis* の outer membrane vesicles (OMV : グラム陰性菌の MV) はキューバ、ノルウェー、フランスなどですでにワクチンとして使用されている。歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* はアジュバントである poly (I:C) とともに OMV を鼻腔粘膜に免疫すると病原因子に対する IgA 抗体が唾液中に誘導され、マウス口腔内の *P. gingivalis* 量を減少させることが明らかとなっている。*S. mutans* も同様に、唾液や口腔粘膜上で *S. mutans* に対する IgA 抗体を誘導することがう蝕の予防につながると考えられる。

これまでに *S. mutans* の Gtf や PAc はワクチン抗原として報告されており、ワクチン開発において有効な因子となることが考えられた。その一方で、可溶性タンパク質の免疫原性は低く、*S. mutans* の菌体ではサイズが大きく粘膜免疫では抗体が誘導されないことが明らかとなっている。以上のことから Gtf と PAc を

含む *S. mutans* の MV であれば粘膜免疫を活性化し、Gtf と PAc 抗体を誘導できることが考えられる。そこで *S. mutans* MV とアジュバントである合成二本鎖 RNA の poly (I:C) を鼻腔粘膜に接種することで *P. gingivalis* 同様、抗体を誘導するかについて検討を行った。

野生株及び各変異株の MV 1 µg と poly(I:C) 10 µg を 10 µL の PBS に懸濁し、6 週齢のメス BALB/c マウスの鼻に 5 µL ずつ粘膜免疫した。その 3 週間後とさらに 2 週間後、同様に合計 3 回の粘膜免疫を行い、2 週間後に唾液、血清、鼻腔洗浄液の採取を行った。野生株 MV を抗原として ELISA を行ったところ、全てのサンプルにおいて MV に対する唾液、鼻腔洗浄液で IgA、血清で IgA、IgG が誘導された。特に野生株及び *gtfB*⁻ 株の MV において抗体産生能が高かった。この抗体は何と反応しているのか確認を行うため、野生株及び *gtfBC*⁻ 株の MV を用いて SDS-PAGE、Western-blotting を行った。Western-blotting では唾液 IgA と血清 IgG の反応性の検討を行った。野生株及び *gtfB*⁻ 株の MV では Gtf に対する抗体が誘導されていたが、*gtfC*⁻ 株及び *gtfBC*⁻ 株の MV では Gtf に対する抗体が誘導されなかった。以上のことから、MV による Gtf 抗体産生には主に GtfC が関与していることが考えられた。よって野生株と *gtfB*⁻ 株の MV は粘膜ワクチン抗原として有用である可能性が示唆された。

第 4 章 総括

本研究において、*S. mutans* の MV には GtfB に比べ GtfC が多く含まれていることが明らかとなった。この Gtf は BF 形成能力を有しており、*S. mutans* だけでなく他の初期定着菌に対しても BF 形成促進効果があることが明らかとなった。また MV の歯表面への付着には PAc が関与していることが示唆された。以上のことから、*S. mutans* の MV は *S. mutans* の歯表面における BF 形成及び初期定着細菌の BF 形成促進に大きな役割を果たしていることが示唆された。よって MV をターゲットとしたう蝕予防が重要な意味を持つことが考えられる。今後本因子をターゲットとした新たなう蝕予防剤の開発について検討していく。

S. mutans の MV は粘膜免疫により Gtf に対する抗体を誘導することができ、その抗原性に GtfC が関与していることが示唆された。唾液中に Gtf に対する抗 IgA 抗体が誘導されたことから、*S. mutans* 及び他の口腔内細菌の定着を抑制することが予想される。よって MV を用いた口腔内細菌に対するワクチン開発も可能ではないかと考えられる。また、Gtf に対する抗体が強く誘導されたことから Gtf の抗原部分を遺伝子工学的技術により異なる細菌やウイルスの抗原部分に組換えて、その組換えた菌株から MV を回収、その MV を免疫抗原とすることで様々な病原細菌やウイルスに対する IgA 抗体の誘導も可能になると考えられる。以上のことから、*S. mutans* の MV は新しいワクチンの開発の一助になるのではないかと考えられる。

よって本論文は、博士(生物資源科学)の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和 3 年 2 月 22 日