

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

|         |   |
|---------|---|
| 氏名      | 都野 隆博   |
| 学位      | 博士 (歯学)   |
| 学位記番号   | 新大院博 (歯) 第480号  |
| 学位授与の日付 | 令和3年3月23日   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当  |
| 博士論文名   | <b>Ingestion of <i>Porphyromonas gingivalis</i> exacerbates colitis via intestinal epithelial barrier disruption in mice</b><br>(嚥下された歯周病原細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> は腸管上皮バリア機能の破綻を介して腸炎を増悪させる) |
| 論文審査委員  | 主査 教授 多部田 康一<br>副査 教授 山崎 和久<br>副査 教授 寺尾 豊   |

博士論文の要旨

学位申請者都野 隆博氏より提出のあった主論文 (英語) の要旨 (和訳) は以下の通りである。

【背景および目的】歯周炎が全身性に悪影響をおよぼすメカニズムのひとつとして、嚥下された歯周病原細菌による腸内細菌叢の変化や腸管免疫誘導が報告されており、腸管局所における歯周病原細菌の様々な影響が示唆される。クローン病と潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患は腸管局所に生じる難治性疾患に指定され、近年罹患率の増加が問題となっている。その原因や根本的な治療体系はいまだ確立されていないが、抗生物質による臨床症状の改善が報告されていることから、本疾患の病態形成における細菌因子の関与も示唆されている。本研究の目的は、薬剤誘導性実験的腸炎モデルマウスを用いて、歯周病原細菌による炎症性腸疾患におよぼす影響とそのメカニズムの解析を行うことである。

【材料および方法】8週齢の C57BL/6 雄マウスに 2.5%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 溶液を7日間飲水投与することで軽度の実験的腸炎を誘導し、腸炎モデルマウスを作製した。歯周病原細菌は *Porphyromonas gingivalis* W83 株, *Prevotella intermedia* ATCC25611 株, *Fusobacterium nucleatum* ATCC25586 株の主要な3菌種を用いた。各種歯周病原細菌を培養後、2%カルボキシメチルセルロース基材に混和し、各群のマウスに 100 $\mu$ l (1 $\times$ 10<sup>9</sup>CFU/ml) ずつフィーディングニードルを用いて実験期間にわたり毎日経口投与を行い、歯周病原細菌が腸炎の発症・進行におよぼす影響を検討した。DSS 飲水投与開始から10日後に安楽死を行い、サンプリングを実施した。体重変化量と便の硬さおよび腸管出血の有無をスコア化した疾患重症度 Disease Activity Index (DAI) の測定、大腸組織の H-E 染色による組織学的観察、大腸組織中の炎症性サイトカイン産生を ELISA にて解析し、群間での比較検討を実施した。また *P. gingivalis* が腸管上皮のバリア機能におよぼす影響を解析する目的で、FITC 標識 dextran (60mg/ml) を口腔投与し、4時間後に腸管を透過した血清中の濃度測定および血清中のエンドトキシン濃度測定を行い、さらに単離した腸管上皮細胞における細胞間接着分子の発現を real-time PCR および Western Blot にて解析を行った。同様に *in vitro* においてもバリア機能の解析を行うため、ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を播種培養し、*P. gingivalis* (MOI: 100, 1000) で刺激を行ったのち、FITC 標識 dextran を用いた透過性試験を実施し、細胞間接着分子の発現を real-time PCR, Western Blot, 蛍光免疫染色を用いて解析を行った。次に、*P. gingivalis* が特異的に産生するプロテアーゼである gingipain の影響を解析する目的で、gingipain (RgpA, RgpB, Kgp) を欠損した *P. gingivalis* ATCC33277 株 (KDP136) を用いて *in vivo* と *in vitro* にて同様の解析を行い、*P. gingivalis* 野生株との比較検討を行った。

【結果】*P. gingivalis* 投与群は他の群と比較して、有意な体重減少や DAI 増加および炎症性サイトカイン産生の増加が認められた。また組織学的に、顕著な腸管上皮構造の破壊や好中球の浸潤

が認められた。さらに腸管透過性の亢進が確認され、細胞間接着に主要な働きをする ZO-1 発現の減少がタンパクレベルで認められ、*in vitro* においても同様の結果が確認された。一方で、KDP136 投与群では野生株投与群と比較し、有意な体重減少や DAI 増加は認めず、炎症性サイトカインの発現量も有意に低かった。さらに *in vitro* の KDP136 刺激においては、野生株刺激で認められた ZO-1 の発現減少は確認されなかった。

【考察および結論】薬剤誘導性実験的腸炎モデルマウスにおいて、経口投与された *P. gingivalis* が腸管上皮バリア機能の破綻を介して腸炎重症化に関与することが確認されたことから、歯周病原細菌による炎症性腸疾患への影響が示された。そのメカニズムのひとつとして、*P. gingivalis* 由来のプロテアーゼ *gingipain* の関与が示唆されたことから、炎症性腸疾患の重症化予防や治療におけるプロテアーゼ阻害薬を用いた創薬が期待される。

#### 審査結果の要旨

本研究の研究テーマの妥当性についての試問を行った。

本研究着想の経緯、先行研究との関連については以下の通りである。歯周炎が全身疾患に悪影響をおよぼすメカニズムとして、歯周組織局所からの細菌やその病原因子、炎症メディエーターの全身循環への流入が遠隔臓器に作用すると考えられている。申請者らの研究室において、嚥下された歯周病原細菌が腸内細菌叢を変動させることで菌血症や腸管免疫が誘導される結果、全身性に悪影響をおよぼすことを確認し、新しいメカニズムのひとつとして報告した。口腔と腸管の連関が示される一方で、腸管局所における歯周病原細菌の直接的な作用については十分に検討されていない。そこで、炎症性腸疾患モデルマウスを用いて、嚥下された歯周病原細菌が腸管局所で与える影響を検討するという本研究の着想に至った。腸管局所に炎症を生じる炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎とクローン病からなり、その罹患患者数は年々増加傾向にある。根本的な治療体系は確立されておらず、厚生労働省において難病指定されている。先行研究から遺伝や環境因子、免疫異常、腸内細菌叢の異常などの様々な因子の関与が報告されているが、原因解明には至っていない。抗生物質投与による臨床症状の改善も近年報告されていることから (Nitzan O et al., *World J Gastroenterol*, 2016), 本疾患の発症・進行における細菌因子の関与が注目される。また口腔細菌との関連については、口腔常在菌やう蝕病原細菌が実験的モデルマウスにおける腸炎の発症や進行に関与することが報告されている (Atarashi K et al., *Science*, 2017; Kojima A et al., *Sci Rep*, 2012)。近年の疫学研究においては、炎症性腸疾患と歯周炎の罹患における有意な相関が報告され (Papageorgiou SN et al., *J Clin Periodontol*, 2017; She YY et al., *BMC Oral Health*, 2020), 炎症性腸疾患の病態形成における歯周病原細菌の関与が示唆されている。

研究方法と論旨の展開についての試問をおこなった。

本研究計画における実験的腸炎モデルの選択と妥当性については以下の通りである。実験的腸炎モデルマウスには主に、Dextran Sulfate Sodium (DSS) や 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) などによる薬剤誘導モデルや、IL-10 ノックアウトマウスによる自然発症モデルが用いられる。薬剤誘導モデルは自然発症モデルと比較し、使用薬剤の濃度や投与期間により病態の程度を調節できる利点がある。さらに直腸内投与する TNBS と比較し、DSS は自由飲水投与が可能である。また、TNBS 投与モデルは口腔から肛門まで広範囲に渡り炎症を呈するクローン病に、DSS 投与モデルは腸管局所に炎症が限局した潰瘍性大腸炎に類似した病態を形成することが知られる。これらより、手技面の簡便性と病態の再現性から、本研究では DSS 誘導性の実験的腸炎モデルマウスが適切と考えた。

*Porphyromonas gingivalis* W83 株 *Prevotella intermedia* ATCC25611 株、*Fusobacterium nucleatum* ATCC25586 株を選択した理由および C57BL/6 マウスの strain を使用した理由については以下の通りである。*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* は代表的な歯周病原細菌として知られる。*P. intermedia* ATCC25611 株、*F. nucleatum* ATCC25586 株は標準株として知られ、*P. gingivalis* W83 株はこれまでの口腔-全身連関プロジェクトにおいて使用実績があるため、これらの菌を選択した。一般的な実験動物においては、C57BL/6 と BALB/c の系統が頻繁に用いられる。DSS 誘導性腸炎モデルにおいては系統による感受性の違いが報告されており、BALB/c と比較して C57BL/6 は感受性が高い (Melgar S et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005)。嚥下された口腔細

菌による腸炎への影響を検討するため、より感受性が高い C57BL/6 を使用した。また申請者の研究室では、これまでの口腔-全身連関プロジェクトにおいては主に C57BL/6 を用いており、比較と整合性のため C57BL/6 を選択した。

歯周病原細菌を毎日投与した理由について以下の回答を得た。歯周炎患者の唾液中には  $1 \times 10^9$  CFU/ml の歯周病原細菌が存在し (Boutaga K et al., J Periodontol, 2007 ; Saygun I et al., J Periodontal Res, 2011), 食餌や唾液とともに嚥下されて腸管内に存在していると考えられる。申請者らの予備研究において、マウスに *P. gingivalis* を経口投与したところ、十数時間は腸管内容物中に同細菌が存在していることを PCR 法にて確認しているが、24 時間後では未検出であった。ヒト歯周炎患者における腸管内の状況を可能な限り模する目的で 24 時間に 1 回、すなわち毎日投与することとした。

動物実験モデルにおける観察結果に関わる *in vitro* 解析として、ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を使用した理由と妥当性については以下の通りである。腸管上皮細胞の初代培養は困難であることが一般的に知られており、本研究においても手技的な理由から本細胞株を用いた。ヒト腸管上皮細胞株には Caco-2, HT-29, HCT116 などが主に用いられており、なかでもヒト結腸腺癌由来 Caco-2 は、一般的な培養条件下で管腔側、基底側の極性を持った正常腸管上皮細胞様に分化する細胞株であり、コンフルエント後は発達した細胞間結合を発現することが知られている (Pinto M et al., Biology of the Cell, 1983; Rousset M, Biochimie, 1986)。本研究においては細胞間結合分子に注目した上皮バリア機能解析を行う必要があるため、Caco-2 の使用が最適と考えた。また、細胞由来動物種の違いによる腸管上皮細胞の特徴の差異はあるが、ヒトの病態を検討するにはヒト由来細胞での検討が適していると考えて本研究では Caco-2 を用いた。

各実験における統計学的手法の選択理由については以下の通りである。使用した実験動物は繁殖・飼育環境が厳密に管理された同一の母集団に由来し、個体的なバラつきは少ないと考えられる。本研究のサンプル数は少ないことから正規性の検定は行えないが、各実験における各群のサンプル数はほぼ同じであることから正規性は保たれ、等分散について考慮してマン・ホイットニーの U 検定および一元配置分散分析を用いた。

*P. intermedia* および *F. nucleatum* 感染においても体重減少や腸炎の炎症を誘導する傾向が認められるデータが得られたことと *P. gingivalis* ジンジパイン欠損株で見られる腸炎の軽減についての考察は以下の通りである。*P. intermedia* および *F. nucleatum* はそれぞれシステインプロテアーゼおよびセリンプロテアーゼを産生することが知られ (Doron L et al., PLoS One, 2014 ; Deschner J et al., Arch Microbiol, 2003), 歯周炎の病態形成におけるそれらのタンパク分解酵素の関与が報告される (Dahlen G et al., J Clin Med, 2019)。腸炎の病態形成において、腸内細菌 (*Enterococcus faecium*, *Clostridium perfringens*) 由来プロテアーゼによる腸管上皮バリア機能の低下の関与が報告されていることから (Vergnolle N, Gut, 2016), 本研究における *P. intermedia* および *F. nucleatum* 感染による体重減少や腸炎の増悪傾向は、*P. intermedia* や *F. nucleatum* 由来のプロテアーゼの影響が考えられる。また、グラム陰性菌の LPS が上皮細胞からの炎症性サイトカインやケモカイン産生を誘導して炎症応答に関与することから、プロテアーゼ以外のビルレンス因子の影響も考えられる。それらの関与を明らかにするためには各プロテアーゼやその他のビルレンス因子単体の影響を特異的な阻害剤を用いて検討が必要と考える。

*P. gingivalis* に誘導される Dysbiosis と本研究結果との関連、差異に関しての考察は以下の通りである。申請者らの研究室における過去の報告では、通常マウスに *P. gingivalis* を経口投与することで腸内細菌叢の変動とそれに伴う全身性のエンドトキシンレベルの上昇が確認されたが、腸管局所における炎症性サイトカイン産生は限定的であった。その一方で本研究では腸炎モデルマウスに *P. gingivalis* を経口投与することで腸管局所における炎症性サイトカイン産生は顕著に上昇した。これらのことから炎症に対するプライミングの有無によって *P. gingivalis* に対する宿主側の反応が異なること、すなわち *P. gingivalis* は炎症性腸疾患の発症には直接関与しないが、進行においては関与する可能性が示唆された。また、炎症性疾患と Dysbiosis の関連もこれまでに報告されていることから、DSS 誘導性腸炎下において、嚥下された *P. gingivalis* に起因する Dysbiosis がその増悪に関与した可能性も考えられる。それらを明らかにするためには、腸内細菌叢の変動の解析や、腸内細菌叢を有さない無菌マウスを用いた検討が必要と考えられる。

歯周炎あるいは歯周病原細菌と腸炎の関連については以下の説明である。炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎とクローン病からなり、腸管に原因不明の炎症を生じる難治性疾患である。根治的な治療は確立されておらず、増加する罹患患者数が問題となっている。先行研究から遺伝や環境因子、免疫異常、腸内細菌叢の異常などが関与した多因子性疾患と考えられているが原因解明には至っていない。近年、抗生物質投与による臨床症状の改善が報告され (Nitzan O et al., World J Gastroenterol, 2016), 発症・進行における細菌因子の関与が注目される。口腔細菌との関連については、口腔常在菌やう蝕病原細菌が実験的モデルマウスにおける腸炎の発症や進行に関与することが報告される (Atarashi K et al., Science, 2017; Kojima A et al., Sci Rep, 2012)。近年の疫学研究においては、炎症性腸疾患と歯周炎罹患の有意な相関が報告され (Papageorgiou SN et al., J Clin Periodontol, 2017; She YY et al., BMC Oral Health, 2020), 炎症性腸疾患の病態形成における歯周病原細菌の関与が示唆されている。

gingipain 欠損株として ATCC33277 由来の菌を用いているが、W83 株の対照としての妥当性および gingipain を原因物質として考える場合のその他検討されるべき実験について以下の回答を得た。本研究において用いられた W83 株 (FimA typeIV) は ATCC 33277 株 (FimA typeI) と比較して、病原性に差異が報告されるため (Nakagawa I et al., J Clin Microbiol, 2000; Nagano K et al., PLoS One, 2012), 本研究において腸炎増悪におよぼす gingipain の影響は示唆にとどまる。W83 株の変異株による比較が必要であり、さらに gingipain 阻害剤を用いた解析が必要と考える。

本実験において、BALB/c (Th2 型かつ腸管の Peyer's patch が発達) も併用し、C57BL/6 の結果と比較しなかった理由については以下の通りである。本実験では嚥下された口腔細菌が直接的に腸管上皮細胞に作用することが炎症悪化のメカニズムと考えた。Th1/Th2 を含む細胞性免疫の関与を検討するためには、C57BL/6 と BALB/c における比較検討が有効であると考えられる。

Fig.3 において、Caco-2 細胞の核は DAPI にて染色するが、その他の核を染色する蛍光試薬と、本実験で DAPI を選択した理由およびあるいは他染色試薬を選択すべきだった理由について以下の回答を得た。核染色に用いられる試薬は、①生細胞：Calcein-AM ②死細胞：Propidium iodide ③生死細胞：Hoechst 染色剤などが挙げられる。Calcein-AM は細胞内エステラーゼの加水分解を受けて蛍光を発するため、厳密には核染色ではなく、一般的に生細胞の核染色には Hoechst 染色剤が用いられる。DAPI は生細胞の細胞膜を透過せず、死細胞の染色や固定処理後の染色に用いられ、本研究においては DAPI を選択した。

嚥下されたヒト口腔 *P. gingivalis* が、腸管へ到達する菌数とその値を踏まえ、Fig.3 において、Caco-2 細胞に MOI=100~1000 で *P. gingivalis* 感染を行った実験結果の考察については以下の通りである。歯周病患者の唾液中から  $1 \times 10^9$  CFU/ml の *P. gingivalis* が検出され、1 日に飲み込まれる菌数はおおよそ  $1 \times 10^{12}$  CFU と考えられるが、上部消化管における滞留や胃における消化、ムチン層による腸管上皮保護作用により、実際に腸管上皮細胞に到達する細菌数は不明である。したがって、本実験においては過去の *in vitro* での報告を参考にして、MOI の決定を行った。

学術的意義に関わる試問を行った。

学術的意義については以下の通りである。炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎とクローン病からなる難治性疾患で、根本的な治療体系は確立されていない。遺伝や環境因子のほか、細菌因子の関与も報告されるが明確でない。本研究において、嚥下された歯周病原細菌 *P. gingivalis* が腸管上皮バリアに影響を与えることによる腸管局所の炎症増悪が示された。嚥下された歯周病原細菌が直接的に腸管局所に作用して炎症を増悪することは、ペリオドンタルメディスン研究における新しい知見として学術的意義をもつことに加え、炎症性腸疾患の治療法としてのプロバイオティクスや抗プロテアーゼ薬の応用が期待される。

新規性・創造性及び学術的発展性や応用価値については以下の通りである。所属研究室ではマウスにおいて、嚥下された歯周病原細菌 *P. gingivalis* が腸内細菌叢を変動させることで腸管免疫を誘導し、全身性に悪影響をおよぼすことを報告している。一方、本研究は嚥下された *P. gingivalis* が腸管局所の炎症増悪に直接的に関与することを明らかにした点で新規性を有する。今後、他口腔細菌による腸管局所への影響が明らかとなれば、口腔細菌検査による炎症性腸疾患のリスク診断や予後評価への有用性が期待され、口腔サンプルから全身性疾患リスクを診断する技術開発などの創造性を有する。

本研究結果の学術的発展性については以下の通りである。本研究から嚥下された歯周病原細菌 *P. gingivalis* が直接的に腸管上皮細胞のバリア機能に影響を与えることで腸管局所の炎症を増悪させることが示された。これまでに申請者らの研究室では、歯周炎の病態形成においても *P. gingivalis* による歯肉上皮細胞のバリア機能への影響を報告しており、様々な炎症性疾患における上皮バリア機能の関与が示唆される。

論文構成・文法・語法については適切に執筆されている。

以上