

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 山崎 恭子
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第485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 Changes in gut microbiota induced by ingested oral pathobiont deteriorate the pathology of non-alcoholic fatty liver disease in mice.

論文審査委員 主査 教授 寺尾 豊
副査 教授 多部田 康一
副査 教授 照沼 美穂

『博士論文の要旨』

学位申請者山崎 恭子 氏より提出のあった主論文 (英文) の要旨 (和訳) は、以下の通りである。

【背景および目的】

メタボリックシンドロームや肥満の肝病変とされる非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は単純性脂肪肝から肝臓がんまでを含む幅広い病態を示し、患者数は年々増加傾向にある。その原因は高脂肪食の過剰摂取や腸管透過性の亢進、小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER) ストレス、腸内細菌叢の変化など多岐にわたり、多因子性疾患とされている。一方、歯周炎は以前から NAFLD を含む全身疾患との関連が報告されており、その原因は局所からの炎症性メディエーターの遊走や細菌等の組織への浸潤によるとされてきたが、明確なエビデンスは得られていない。我々は腸内細菌叢の変化と歯周炎の両者がメタボリックシンドロームに関連することから、腸内細菌叢の変化を介した歯周炎と全身疾患との関係に着目し検証を行った。その結果、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* 経口投与による歯周炎モデルマウスにおいて腸内細菌叢が変動し内毒素血症が誘導され、全身性の炎症とインスリン抵抗性が誘導されることが明らかとなった。この新規メカニズムの病態への影響を明らかにするため、NAFLD 病態モデルを用いて腸内細菌叢の変化を介した歯周炎と NAFLD 病態形成との関連メカニズムを解明することとした。

【材料および方法】

6週齢オス C57BL/6 マウスを普通餌 (Regular chow) 給餌の RC 群と高脂肪食 (High-fat diet) 給餌の HFD 群に分けた。HFD 群をさらに *P. gingivalis* W83 株を基材 (CM-セルローズ) と共に経口投与した *P. gingivalis* 群、コントロールとして他の歯周病原細菌である *Prevotella intermedia* ATCC25611 株を投与した *P. intermedia* 群、基剤のみ投与した Sham 群に分け計4群とした。細菌感染開始1週間後 HFD 群の餌を高脂肪食に変更し、細菌感染と共に2週間継続した後にサンプリングを行った。肝臓・腸管の形態学的解析、血清エンドトキシンレベル解析、血清メタボリズム解析、糞便中の細菌叢の解析、肝臓・腸管における各種遺伝子発現解析を行った。

【結果】

定量的解析により HFD 群における肝臓変性の指標であるトリグリセリド量、および肝傷害の指標である AST、ALT 量が増大し、感染群において肝線維化の指標であるヒドロキシプロリン量が増大した。また、肝臓における H-E 染色、マッソントリクローム染色においても同様の組織像が確認された。肝臓における遺伝子発現解析の結果、炎症関連遺伝子 Tsc22d3、ER ストレス関連遺伝子 Ddit4 の *P. gingivalis* 群における有意な上昇が認められ、その他サーカディアンリズム関連遺伝子、線維化関連遺伝子の変動が認められた。糞便の菌叢解析の結果、細菌感染により腸内細菌叢の変動が誘導され、それは HFD 給餌後に食事の影響を大きく受けながらも維持されることが明らかとなった。小腸における遺伝子発現の解析により Tjp1 (Tight junction protein 1) の発現が *P. gingivalis* 群で減少する傾向が認められ、大腸における蛍光免疫染色により E-cadherin の発現が感染群、特に *P. gingivalis* 群で低下した。また血清中エ

ンドトキシレベルが RC 群, Sham 群と比較し感染群で有意に増加したこと, *P. intermedia* 群と比較して *P. gingivalis* 群で大きいことが確認された。さらに血清メタボローム解析においても PCA 解析の結果 RC 群と HFD 群で違い認められ、さらに Sham 群, *P. intermedia* 群と比較して *P. gingivalis* 群で有意な違いが認められた。

【考察】

HFD 給餌に加え、細菌感染に伴う種々の遺伝子・タンパクレベルでの変動が肝・腸組織において認められた。これらの変化は、歯周病原細菌嚥下に伴い腸内細菌叢が変化し腸管バリア機能の低下やそれに伴う血清メタボロームの変動が誘導され生じたものと考えられる。*P. intermedia* 群と *P. gingivalis* 群での菌種による病態の違いは腸管バリア機能低下に伴い流入する細菌の量的・質的違いや、血清メタボロームの変動によるものと考えられるが、今後さらなる解析が求められる。

『審査結果の要旨』

学位審査基準に従い、学術的意義ならびに新規性および創造性に関する試問を実施し、以下の解答を得た。すなわち、歯周炎は複数の疫学研究から NAFLD との関連が報告されている。Yoneda ら(BMC Gastroenterol 2012;12:16.) は qPCR 法を用いた解析により、健常者と比較して NAFLD・NASH 患者唾液中の *P. gingivalis* の検出頻度が有意に高いことを報告した。これは疾患同士の関連を示唆するデータであるが、そのメカニズムを説明するに至っていない。また、歯周炎と全身疾患との関連が多く疫学研究により報告されているが、そのメカニズムには不明な点が多い。歯周炎組織局所からの炎症性メディエーターや細菌の組織への侵入によるという説が有力視されているが、動脈硬化病変からの歯周病原細菌の検出率は高くない。学位申請者は、歯周炎と関連する全身疾患の多くがまた、腸内細菌叢の変動と関連する疾患として報告されていることに気が付いた。そして、代表的な歯周病原細菌である *P. gingivalis* 経口投与による歯周炎モデルマウスを用いた実験により、*P. gingivalis* の嚥下が腸内細菌叢の変動を誘導しインスリン抵抗性、全身性の炎症を惹起することを報告した。(Arimatsu K et al., Sci Rep 2014;4:4828.) この新規メカニズムの実際の病態との関連を調べるため、本学位申請研究にて、同じく腸内細菌叢の変動を病態悪化の原因に持ちメタボリックシンドロームの一員である NAFLD モデルマウスを用いて検証を行うこととした。今回の研究では、歯周炎モデルマウスを用いた動物実験およびメタゲノム解析により、*P. gingivalis* を含む歯周病原細菌の嚥下が腸内細菌叢の攪乱を誘導し血清メタボライトを変動させることで NAFLD 病態を悪化させることを報告している。さらに、LEfSe を用いて群間における統計学的に有意な違いを持つメタゲノムバイオマーカーを抽出し、腸内細菌叢において病態に影響を及ぼした機能遺伝子を特定することにも成功している。これにより、歯周炎が単なる口腔内の疾患にとどまらず、全身へ悪影響を及ぼすことをエビデンスに基いて明示し、口腔の健康増進の啓発に繋がる議論へと発展させていた。

また、従来歯周炎と全身疾患との関連メカニズムとしては、歯周炎局所からの炎症性メディエーターや細菌の侵入が血行性に全身に影響するという仮説が提唱されてきた。しかし血管疾患を持つ慢性歯周炎患者の血管内プラークからは腸内細菌叢の主要な構成員である Enterobacteriaceae と口腔常在菌が多数検出され、レッドコンプレックス細菌はほとんど検出されないとの報告もあり、(Armingohar Z et al., J Oral Microbiol 2014;6.)その仮説には疑問が生じている。学位申請者は歯周炎と関連する全身疾患の多くが腸内細菌叢の変動を伴うことから、新規メカニズムとして腸内細菌叢の変動を介した影響に着目し解析を行った。その結果、歯周病原細菌の嚥下が腸内細菌叢を攪乱し血清メタボロームの変動を誘導することで NAFLD 病態を悪化させる新知見を得ている。さらに、口腔細菌叢が多種多様な細菌から構成される複雑な構造を持つこと、および今回の研究が *P. gingivalis*, *P. intermedia* に限定された結果であることを理解し、次なる研究として、患者唾液の次世代シーケンサーを利用した菌叢解析を行い、それらを反映した動物実験を行うことで更なる病態生理の解明を期す考察も十分に展開できている。

以上より、本研究は高い発展性を有し、学位論文として十分な価値があると考えられる。また、論文内容に関する諮問に対しても、満足な回答を得ることができ、博士(歯学)の学位を授与するにふさわしいと判断した。

以上