

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 原 実生
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第423号
学位授与の日付 平成31年3月25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 A bacterial metabolite ameliorates periodontal pathogen-induced gingival epithelial barrier disruption via GPR40 signaling
(細菌由来のメタボライトは GPR40 シグナリングを介して歯周病原細菌に誘導される歯肉上皮バリア機能の低下を抑制する)

論文審査委員 主査 教授 山崎 和久
副査 教授 多部田 康一
副査 教授 寺尾 豊

博士論文の要旨

【背景および目的】

微生物が代謝の過程で産生する中間代謝化合物 (メタボライト) が様々な生物学的活性を有し、宿主の細胞機能や疾患の発症に関わることが知られている。10-Hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) は、乳酸桿菌 *Lactobacillus* がリノール酸をオレイン酸に代謝する過程で産生されるメタボライトのひとつであり、腸管上皮細胞のバリア機能制御を介して実験的腸炎の発症を抑制することが報告されている。我々はこれまでにヒトの唾液中にも HYA が存在していることを確認しており、本研究において HYA が歯周炎の発症・進行に与える影響に関して、歯肉上皮バリア機能に注目して *in vitro* と *in vivo* で解析を行った。

【材料および方法】

ヒト歯肉上皮細胞株 (Epi4) における脂肪酸受容体発現の有無を検証した。Epi4 を主要な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) で刺激することで上皮バリアが破壊される *in vitro* モデルを確立した後、HYA が上皮バリア機能に与える効果を FITC-dextran 透過性試験法と透過型電子顕微鏡にて観察した。その詳細なメカニズムを検討する目的で、HYA による抗菌効果、プロテアーゼ阻害効果、バリア関連遺伝子およびタンパクへの影響をそれぞれ解析した。また *in vivo* において、歯周炎の病態形成における HYA の効果を検討する目的で、10 週齢雄 C57BL/6 マウスに HYA を 14 日間経口投与し、7 日目に上顎第二臼歯を絹糸で結紮して実験的歯周炎を惹起した。14 日目に各種サンプリングを行い、歯周組織におけるバリア機能関連遺伝子・タンパク発現の変動を解析した。歯周炎の重症度は、歯周組織における炎症性サイトカイン発現と歯槽骨吸収量によって比較検討した。

【結果】

Epi4 において HYA を認識する脂肪酸受容体 GPR40 が遺伝子レベルおよびタンパクレベルで発現していることが確認された。*in vitro* の透過性試験において、*P. g* 刺激で誘導される上皮バリア機能低下に対して、HYA が抑制的に機能することが明らかとなった。GPR40 を介した細胞内シグナリングが上皮バリア関連タンパク E-cadherin の分解を抑制することが確認された。一方で、HYA は抗菌作用とプロテアーゼ阻害作用は有さないことが明らかとなった。*in vivo* の実験的歯周炎マウスにおいて、HYA 投与が歯周組織における炎症性サイトカイン産生および歯槽骨吸収を抑制することが確認された。また、HYA 投与群は非投与群と比較して、歯周組織における E-cadherin の発現量が有意に高いことが観察された。

【考察と結論】

歯肉上皮細胞において、HYA が細胞内シグナリングを介して上皮バリア関連タンパクの分解を

抑制することで、上皮バリア機能が維持・強化される結果、歯周炎の発症や進行に対して抑制的に機能することが示唆された。これまでの歯周病予防・治療薬の多くは主に歯周病原細菌をターゲットとしてきたが、本研究において生体防御の最前線に位置する歯肉上皮バリア機能、すなわち宿主機能を強化するというアプローチでメタボライトを応用した、新たな歯周炎予防薬・治療薬の開発に貢献することが期待される。

審査結果の要旨

我が国における歯周病の罹患率はおよそ 80%を示し、国民病といって過言ではない。この状況は本邦だけの問題ではなく、先進諸国のみならず開発途上国でも保健衛生上の大きな問題になっている。加えて歯周病は口腔の疾患であるだけにとどまらず、代謝性疾患、自己免疫疾患、悪性腫瘍などのリスクファクターであることが明らかになり、歯周病を効果的に予防する意義は社会レベルでも絶大なものである。人口構成の変化に伴い高齢者における歯周病有病率はむしろ増加傾向にある。サルコペニアやフレイルなど高齢者特有の運動機能低下は機械的プラークコントロールの実践という従来療法の基本を困難にし、耐性菌の増加により歯周治療のみならず歯科疾患における抗菌薬使用に適応の厳格化が求められている。こうした状況下では細菌をターゲットとしない新たな治療法の開発が急務である。歯周病治療は 1980 年代に確立された red complex 細菌に代表される“歯周病原細菌による感染症”という考え方を基盤として進歩してきたが、近年は炎症中心の病因論にシフトしてきており、疾病構造の劇的変化に対応するためには視点を変えた全く新しい考え方が必要である。

腸内に常在する乳酸桿菌 *Lactobacillus* は食事性脂肪酸であるリノール酸や α -リノレン酸を代謝する過程で様々な代謝物を産生する。それら代謝物である水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸が、腸管バリア機能制御、抗酸化活性、炎症抑制作用など様々な生理機能を有することが見出されつつあり、代謝物を介した常在細菌による健康維持・増進の可能性が示唆されてきている。水酸化脂肪酸の一つ 10-hydroxy-cis-12-octadecenic acid (HYA)は腸管バリア機能を高めて内毒素の侵入から生体を防御し、非アルコール性脂肪肝疾患や肥満の抑制に効果を示すことが報告されている。このような機能性脂肪酸の作用は口腔内においても有用である可能性が高い。

そこで本研究では HYA が歯肉上皮バリア機能を高めるか、さらに細菌感染による炎症性歯周組織破壊を予防できるかを、培養歯肉上皮細胞を使った *in vitro* 実験、並びにマウス実験の歯周炎モデルを用いた *in vivo* 実験により解析を行った。研究の前提として歯肉上皮細胞が脂肪酸受容体を発現しているかを明らかにするため GPR40 の発現を遺伝子、タンパクレベルで解析した。歯肉上皮細胞において HYA を認識する脂肪酸受容体 GPR40 が遺伝子レベルおよびタンパクレベルで発現していることが確認された。*in vitro* の透過性試験において、*P. g* 刺激で誘導される上皮バリア機能低下に対して、HYA が抑制的に機能することが明らかとなった。GPR40 を介した細胞内シグナリングが上皮バリア関連タンパク E-cadherin の分解を抑制することが確認された。さらに、実験的歯周炎マウスにおいて、HYA 投与が歯周組織における炎症性サイトカイン産生および歯槽骨吸収を抑制することが確認された。また、HYA 投与群は非投与群と比較して、歯周組織における E-cadherin の発現量を有意に高めることが観察された。以上より、HYA が細胞内シグナリングを介して上皮バリア関連タンパクの分解を抑制することで、上皮バリア機能が維持・強化される結果、歯周炎の発症や進行に対して抑制的に機能することが示唆された。これまで機械的・化学的プラークコントロールのみに頼ってきた歯周組織破壊予防法は、高齢化による疾病構造の変化、抗菌薬使用に対する諸問題を考慮すると、大きな転換期を迎えていると言わざるを得ない。これからの歯周治療を考えたとき、常在菌代謝物である機能性脂肪酸のバリア機能維持向上作用、抗炎症・抗酸化作用を応用した治療法開発の基盤を作った本研究の学術的意義はきわめて大きいと判断する。

学位論文に関して主査、副査による下記内容に関する質疑応答を行った。

- ① 新規性および創造性
- ② 学術的意義

- ③ 病原性のあるメタボライトについて
- ④ 実験的歯周炎モデルとして、*P. gingivalis* 感染モデル、結紮誘導モデルではなく、両方の組合せを行った理由
- ⑤ 使用細胞の妥当性：Epi4 細胞に加え、Caco-2 細胞を供した理由
- ⑥ 使用した FITC-dextran の分子量を勘案した、細胞間隙透過性実験の結果考察の適切性について
- ⑦ E-cadherin 以外の細胞間接着タンパク質について
- ⑧ Fig5 ではマウスにおける実験的歯周炎の炎症をほぼ完全に抑えているが、Fig2 では HYA を投与しても上皮バリアの透過性は亢進していることの考察
- ⑨ HYA の濃度の適正はどのように考えるか
- ⑩ HYA はどのようなメカニズムで E-cadherin の分解を抑制したのか
- ⑪ HYA の炎症抑制作用が実験的歯周炎の抑制に関与しているかの考察
- ⑫ 今回注目したメカニズム以外に、*P. gingivalis* が細胞間接着分子に影響を及ぼす仮説モデルについて
- ⑬ 感染、刺激、添加の本論文記載上の定義について
- ⑭ 今後治療薬としてどのように応用されると考えられるか

本研究は、抗菌薬に依存しない歯周病の予防・治療の新たな手段として極めて重要な研究であり、学位論文として十分な価値を認める。論文内容に関する試問に対しても十分な回答を得ることができた。よって、博士（歯学）の学位を授与するにふさわしいと判断した。