

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 中島 麻由佳
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第345号
学位授与の日付 平成28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 Oral Administration of *P. gingivalis* Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver (*P. gingivalis* 口腔投与によって腸内細菌叢の攪乱と腸管透過性機能異常が誘導され腸内細菌の肝臓への播種が亢進する)

論文審査委員 主査 教授 山崎 和久
副査 教授 吉江 弘正
副査 教授 寺尾 豊

博士論文の要旨

【背景および目的】 歯周炎は動脈硬化性疾患や糖尿病などの全身疾患のリスク因子であることが、これまでの疫学的調査および動物実験により明らかにされている。そのメカニズムとして、歯周炎組織を介した菌血症や、局所で産生された炎症性サイトカインにより惹起された全身の軽微で持続的な炎症の影響などが考えられているが、いずれも決定的であるとは言えない。一方、糖尿病などの全身疾患は、腸内細菌叢の変動がその発症や進行に関わっていることが近年明らかになりつつある。そこで、我々はマウスに *Porphyromonas gingivalis* を口腔より複数回投与し、嚥下された *P. gingivalis* が腸管の細菌叢の変化とそれに伴う血清中エンドトキシンレベルの上昇を引き起こすことで、肝臓・脂肪組織に炎症を誘導し、インスリン抵抗性を惹起することを明らかにし、歯周炎が全身疾患に影響を及ぼす有力なメカニズムとなり得ることを報告した (Arimatsu K *et al.*, *Sci Rep.* 2014)。今回、更なる詳細なメカニズムの解明を目的として、*P. gingivalis* の単回投与を行った。

【材料および方法】6週齢雄の C57BL/6 マウスに CMセルロースに懸濁した *P. gingivalis* W83 株 1×10^9 CFU あるいは基剤のみを口腔より 1 回投与した。投与から 2 日後に採取した糞便及び肝臓より DNA を抽出し、PCR 増幅した 16S rRNA の配列を次世代シーケンサーにて網羅的に解析した。また、血清中のエンドトキシンレベルを LAL 試験にて測定した。さらに、Real-time PCR 法にて腸管組織におけるタイトジャンクションプロテインの遺伝子発現解析、および血液・肝臓組織中における *P. gingivalis* 特異的 16S rRNA 及び非特異的 16S rRNA 遺伝子の定量を行った。

【結果および考察】 *P. gingivalis* 単回投与を行った群の腸内細菌叢において Bacteroidetes 門に属する菌の比率が有意に上昇し、Firmicutes 門に属する菌の比率が有意に減少した。*P. gingivalis* 投与群の腸管において、タイトジャンクションプロテインの遺伝子発現の減少が認められたことから、腸管透過性が亢進している可能性が示唆された。また、血清中エンドトキシンレベルの上昇が認められた。さらに、Sham 投与群と比較して *P. gingivalis* 投与群の肝臓組織において非特異的 16S rRNA 遺伝子検出量の上昇および、腸内細菌叢の変化と類似した肝臓細菌叢の変動が認められた。Sham および *P. gingivalis* 投与群の肝臓組織および血液中に *P. gingivalis* 特異的 16S rRNA 遺伝子は検出されなかった。

【結論】 *P. gingivalis* をわずか 1 回口腔から投与するだけで腸内細菌叢の攪乱を介した腸管透過性の亢進と、それに続く血清中エンドトキシンレベルの上昇および肝臓への腸内細菌の播種が誘導されることが明らかとなった。これは歯周炎が全身疾患を誘導するメカニズムの詳細を明らかにするのみならず、歯周病原細菌を嚥下することの影響力の大きさを示す結果となった。

審査結果の要旨

歯周疾患は2型糖尿病、動脈硬化性疾患、脂肪性肝疾患など様々な全身疾患のリスク因子であることが疫学研究により明らかにされている。しかし因果関係や生物学的メカニズムについては不明の点が多い。歯周組織からの内毒素血症や炎症性サイトカインの全身循環への流入がメカニズムとして考えられてきたが、申請者の研究グループは、嚥下された歯周病原細菌が回腸細菌叢を変動させるとともに腸管の透過性を亢進させ、その結果生じる血中エンドトキシンレベルの上昇が軽微かつ持続的な全身性の炎症を引き起こすことも有力なメカニズムの一つであることを報告した。本研究ではさらなるメカニズムの解明を目指し、マウスに *Porphyromonas gingivalis* を口腔より1回投与後、糞便細菌叢、肝臓に流入した細菌叢の解析を中心に血清中エンドトキシンレベルの解析も行った。その結果、*P. gingivalis* 頻回投与の場合と同様、Bacteroidetes 門に属する菌の比率が有意に上昇し、Firmicutes 門に属する菌の比率が有意に減少し、タイトジャンクションタンパク遺伝子の発現低下が認められた。最も重要な知見は *P. gingivalis* 投与群において肝臓への細菌の流入が認められ、菌叢解析の結果 *P. gingivalis* 投与によって変化した腸内細菌叢と類似した菌叢を示したことである。これらの結果は、歯周病原細菌 *P. gingivalis* の腸管への流入が腸内細菌叢を変化させると同時に、腸のバリア機能を低下させ、門脈を介して腸内細菌由来の菌体成分が全身循環に流入することを明らかにした。本研究は歯周疾患が全身疾患を進行させるメカニズムに新たなパラダイムを築いただけでなく、口腔と腸管の密接な関係を示した研究としてそ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 生菌投与と死菌投与では腸内細菌叢等への影響に違いがあるか。
- ② 48時間の後、腸内細菌叢の変動はどのように変化していくのか。また、その理由をどう考えるか。
- ③ 糞便中及び肝臓組織中に *P. gingivalis* は検出できているのか。また、検出出来ている場合にはどのように経時的変化しているのか。
- ④ *P. gingivalis* はどのように腸内細菌叢を変動させるのか。
- ⑤ 腸内細菌叢の変動等は *P. gingivalis* 特異的であると考えるか。他の歯周病原細菌や *E. coli* (LPSの作用は *P. gingivalis* よりも強い) を投与したら、同様な影響があるのか？
- ⑥ 糞便の細菌叢では多様性の変化が認められなかったが、肝臓の細菌叢では多様性が低下した理由をどう考えるか。
- ⑦ 糞便及び肝臓における細菌は生菌が多いのか、それとも死菌が多いのか。
- ⑧ 腸管に誘導された炎症の誘導は強いと言えるのか。
- ⑨ 肝臓における炎症は誘導されたのか。また、なぜ血清中のエンドトキシンが上昇しているのに対して、血液中DNA量は上昇していないのはなぜか。
- ⑩ 今回の検証では依然明らかになっていないことと、それを検証するための今後の実験計画。
- ⑪ 歯周炎は動脈硬化症や糖尿病のリスク因子であるのか。それとも、動脈硬化症や糖尿病患者には歯周炎が有意に多いだけなのか。
- ⑫ Introduction において Vijay-Kumar et al. の文献を引用しているが、本文中の結果や Discussion には直接関連の記載はない。それにも関わらず本申請論文の執筆に際し、当該参考文献を引用したのはなぜか。
- ⑬ 6週齢の雄 C57BL/6 マウス、*P. gingivalis* W83 株、ならびにカルボキシルメチルセルロースを用いた学術的あるいは実験手技的な理由をそれぞれ説明せよ。

- ⑭ 16S rRNA シーケンス法を細菌叢の菌種同定に用いた理由と菌種同定に適応できない実験の事例を回答せよ。
- ⑮ GAPDH の機能と遺伝子解析の内部標準に用いている理由を説明しなさい。
- ⑯ Fig 2A および Fig 6A のグラフの縦軸と横軸について説明せよ。
- ⑰ Real-time PCR の結果グラフにおける縦軸の表記や論文中の分子生物学的用語の使用は適切か。
- ⑱ 全ての歯周炎患者において腸内細菌叢の変動が生じていると考えられるか。
- ⑲ Occludin について、遺伝子転写の減少のみで透過性が亢進したと言えるか。すなわち、Occludin ターンオーバーのサイクル長、分解の有無などを mRNA 転写のみで評価できるのかを説明せよ。
- ⑳ 今回認められた腸内細菌叢及び全身への影響は *P. gingivalis* 特異的な影響であると考えるか。他の病原細菌種を投与した場合はどうなると推察するか。

本研究は、歯周炎の全身に及ぼす新たなメカニズムを提案した画期的な研究であり、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。

