

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 松田 由美  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第377号  
学位授与の日付 平成29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 Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating IL-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues.  
(歯牙結紮によって誘導される歯周組織局所の炎症は血中インターロイキン-6 レベルを上昇させる一方で肝臓および脂肪組織への影響は限定的である)

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 照沼 美穂

### 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リスク因子であることが、これまでの疫学研究および動物実験により明らかとされている。そのメカニズムとして我々は、嚥下された *Porphyromonas gingivalis* が腸内細菌叢の変化とそれに伴う腸管バリア機能の低下を介して血清中のエンドトキシンレベルを上昇させることで、肝臓・脂肪組織における炎症を誘導し、その結果インスリン抵抗性が惹起されることを報告した。一方で、歯周組織局所で産生された炎症因子が全身性に及ぼす影響については十分な検証が行われていなかった。結紮誘導歯周炎モデルは、歯周組織へのプラーク蓄積により顕著な歯周組織の破壊および炎症が誘導されることから、ヒトの歯周炎と類似した発症機序と病態を示すモデルと考えられている。今回我々はこのモデルを用いて、歯周組織局所で産生された炎症因子が全身性に与える影響について検討した。

【材料および方法】 10 週齢雄 C57BL/6 マウスの上顎両側第 2 臼歯を絹糸にて結紮し実験的歯周炎を惹起した。結紮 14 日後にインスリン抵抗性試験、唾液中の非特異的 16S rRNA 遺伝子の検出による口腔内細菌量の定量、上顎骨歯槽骨吸収量の計測、歯肉組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現 (定量的 PCR 法) および組織学的解析 (Hematoxylin-Eosin 染色) を行った。また、肝臓および脂肪組織における炎症性サイトカインや糖・脂質代謝に関連する遺伝子発現解析、血清中の炎症性サイトカイン (ELISA 法) および内毒素レベルの測定 (LAL 試験)、そして腸内細菌叢 (メタ 16S rRNA 解析) および腸管における各種遺伝子発現解析を行った。

【結果および考察】 結紮群は非結紮群と比較して、口腔内細菌量の有意な増加、歯肉組織における IL-1 $\beta$  遺伝子発現レベルの有意な上昇、歯周炎の組織学的特徴である炎症性細胞の浸潤と結合組織性付着の破壊を認め、有意な歯槽骨吸収の増加が確認された。また、血清中における IL-6 レベルおよび肝臓組織における SAA 遺伝子発現レベルが結紮群で有意に上昇したことから、歯周組織局所で産生された炎症因子が全身性の炎症応答を誘導することが示唆された。一方で、歯牙結紮によって肝臓組織における糖代謝を調整する PCK1 と脂肪酸合成を調整する ACACA の遺伝子の発現レベルに有意な変動を認めたが、インスリン抵抗性は惹起されなかったことから、歯周組織で産生された炎症因子の糖代謝に対する影響は限定的であることが示唆された。また、歯牙結紮による腸内細菌叢の変動は極めて軽微で、腸管における炎症性サイトカインおよび上皮バリア機能関連遺伝子発現レベル、血清中の内毒素レベルにも有意な変化は認められなかった。このことは本モデルにおける糖代謝への影響が限定的であったことの原因のひとつである可能性が考えられる。

【結論】 本モデルにおける口腔内細菌量の増加および歯周組織局所の炎症は全身性の炎症応答を誘導するが、肝臓および脂肪組織に対する影響は限定的で、インスリン抵抗性は惹起されない。

## 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。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。しかしながら、歯周組織局所における細菌の増加や炎症が全身の炎症や代謝における影響は依然として明らかになっていない。そこで本研究ではC57BL/6マウスを用いて歯牙結紮モデルを作成し、口腔内由来細菌によるプラークの蓄積と歯周炎を誘導した際の肝臓・精巣上体脂肪組織、小腸・大腸における遺伝子発現、血中炎症マーカーの解析を行った。さらにインスリン負荷試験、腸内細菌叢の解析を行った。その結果、2週間の歯牙結紮は細菌の増加と歯肉組織の炎症、さらに歯槽骨の吸収を誘導した。歯肉における炎症性サイトカイン遺伝子の発現は有意に上昇した。血中のIL-6レベルは有意な上昇を示したが、内毒素、血清アミロイドAレベルに有意な上昇は認められなかった。また、耐糖能異常も誘導されなかった。脂肪組織、肝臓における遺伝子発現への影響は限定的で、肝臓においてPck1、Acacaレベルの上昇が認められた。腸内細菌叢に関しては結紮群と対照群の間で菌種の構成に有意な違いがみられたが、量的違いを含めた菌叢全体の構成には差が認められなかった。これらの結果は、歯周炎と糖尿病、動脈硬化性疾患、関節リウマチなどの非感染性疾患との関連メカニズムを考察する上で重要な知見を与える。すなわち、これまで主要な関連メカニズムと考えられてきた歯周ポケットからの細菌・細菌産生物、および炎症歯周組織で産生された炎症性サイトカインなどの血流を介した全身循環への流入は、少なくともマウス結紮モデルにおいては限定的であることが明らかになった。また、その全身への影響も歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 口腔投与モデルと比較して弱いことが明らかになった。本研究は歯周疾患が全身疾患を進行させるメカニズム解明に重要な示唆を与えただけでなく、歯周炎の腸内環境への影響を介した全身との関連の重要性をさらに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 結紮誘導歯周炎のモデルを使った理由は何か？また、このモデルは歯周炎を起こすことができるだけの *P. gingivalis*、もしくは他の歯周炎関連細菌が口腔内にいるのか？
- ② *P. gingivalis* 感染を ligation と組み合わせたモデルを使用しなかった理由は？
- ③ なぜ ligation を 14 日間と設定したのか？その他のタイムポイントにおける(継続的な)変化についてどのように考察するのか？
- ④ 歯周病が糖尿病や脂肪肝、動脈硬化のリスク因子であると書いているが、evidence としては何があるのか？
- ⑤ 歯周炎の歯肉ではどのようなサイトカインが産生されているのか？また、これらが systemic circulation に入って末梢器官に到達するというその根拠は？
- ⑥ 今回の研究で歯肉では Il1b のみが上昇していたが、その理由として何が考えられるか？なぜ、Il6 や Tnf には変化がなかったのか？
- ⑦ IL-1β は歯肉組織局所での作用のみと考えるのか？また、歯肉組織における他のサイトカインを含めて継続的な変化はないのか？
- ⑧ 歯肉組織におけるサイトカインの発現についてタンパク発現は解析したか？解析しなかった理由は？

- ⑨ 血清中の IL-6 レベルが上昇した理由は？また IL-6 のみを変動した理由は？
- ⑩ インスリン抵抗性が生じなかった理由は？
- ⑪ Fig1A で n=8 とは測定したサンプル数か？マウスの個体数か？(後者である場合に、それぞれの群で 8 匹ずつ解析し有意差がない場合に *tend to be higher* という解釈は正しいか？)
- ⑫ 歯肉組織の *gene expression* は、具体的にどの部分の歯肉をどのように解析したのか？
- ⑬ 歯周炎の評価方法について説明せよ。
- ⑭ Fig1B の *histology* で *ligation* をしたマウスで起こった歯肉や歯槽骨の変化が外傷によるものではないと考えた根拠は何か？
- ⑮ 肝臓での様々な遺伝子解析を行っているが、その中で変化があった 3 つの遺伝子 (*Acaca*, *Pck1*, *Saa*) によってできるタンパクの機能を具体的に説明せよ。また、これらの変化と先に述べた糖尿病や動脈硬化との関連についても説明せよ。
- ⑯ 脂肪組織において遺伝子発現に変化が生じなかった理由は？
- ⑰ 今回のマウスモデルで *serum* の IL-6 と肝臓の *Saa* が上昇していたということで、歯周組織局所で産生された炎症因子が全身性の炎症応答を誘導すると考えられると結論付けており、*serum* の IL-6 の上昇が肝臓の *SAA* の上昇を引き起こしているとしているが、その根拠は？
- ⑱ 腸管において遺伝子発現に変化が生じなかった理由は？
- ⑲ 本研究のテーマに関して、今後検討したいことは？

本研究は、歯周炎が全身に及ぼす影響に関するメカニズムを考える上で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。