

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 佐藤 圭祐
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第400号
学位授与の日付 平成30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 Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system.
(*Porphyromonas gingivalis* 経口投与は腸内細菌叢と腸管免疫応答に影響することで、コラーゲン誘導性関節炎を増悪させる)

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】

歯周炎は関節リウマチ(RA)を含む様々な全身疾患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で明らかとされている。その関連メカニズムとして、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* が、RA の主要な自己抗原となるシトルリン化タンパク質を生成する細菌性の peptidyl arginine deiminase (PAD) を発現することから注目されてきた。しかし、*P. gingivalis* PAD の関与に関して否定的な報告もあり、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。近年、腸内細菌叢が RA の発症と進行に関与していることが報告されている。我々はこれまでに、嚥下された *P. gingivalis* が腸内細菌叢を変化させることで、全身性の軽微な炎症を誘導することを報告した。そこで今回、コラーゲン誘導性関節炎 (Collagen-induced arthritis : CIA) モデルマウスを用いて、嚥下された *P. gingivalis* が腸内細菌叢と腸管免疫応答に影響することで関節炎症状の重症化を促進する可能性について検討した。

【材料および方法】

6週齢雄 DBA/1J マウスを *P. gingivalis* W83 株を経口投与した *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、週 2 回感染を 5 週間 (合計 10 回感染) 行った。その後、II 型コラーゲンを免疫し実験的関節炎を発症させ、6 週間後にサンプリングを実施した。関節炎症状の解析、糞便中の細菌叢の解析、腸管膜リンパ節・パイエル板・鼠径リンパ節・脾臓のリンパ球 subset 解析および培養上清中 IL-17 レベルの測定、血清中炎症マーカー、RA 関連抗体の抗体価の測定、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】

P. gingivalis 群は Sham 群、*P. intermedia* 群と比較して、関節炎症状の重症化が認められた。マイクロ CT 像により四肢の骨破壊が確認でき、組織学的解析より膝関節滑膜への炎症性細胞浸潤と破骨細胞の増加を認めた。*P. gingivalis* 群では、他の 2 群と比較して腸内細菌叢の有意な変動を認めた。また、*P. gingivalis* 群では腸管免疫応答に関連する腸間膜リンパ節・パイエル板において Th17 への分化誘導の促進を認めたが、鼠径リンパ節・脾臓では変化が認められなかった。*P. gingivalis* 群では Sham 群、*P. intermedia* 群と比較して血清・リンパ球培養上清中の IL-17 レベルの有意な上昇が観察されたが、抗コラーゲン抗体価、抗シトルリン化タンパク抗体価に有意差は認めなかった。*P. gingivalis* 群で腸管における炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの上昇を認めた。

【結論】

CIA モデルマウスにおいて、*P. gingivalis* 口腔感染は腸内細菌叢を介した腸管免疫応答への影響により、関節炎症状を増悪させることが示唆された。

審査結果の要旨

歯周疾患は2型糖尿病、動脈硬化性疾患、脂肪性肝疾患などと同様、自己免疫疾患である関節リウマチ（RA）の発症・進行のリスクを増悪させることが疫学研究により明らかにされている。動物実験においても代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* 感染がコラーゲン誘導関節炎モデルにおいて病態の重症化を誘導することが数多く報告されている。歯周病と RA は喫煙や特定の HLA 型など共通のリスク因子が関与することに加え、疾患メカニズムも類似しているが、因果関係を説明するメカニズムとして最も注目されてきたのが抗シトルリン化タンパク抗体（抗 CCP 抗体）の産生誘導である。抗 CCP 抗体は RA の発症に先行して出現する自己抗体であり、RA の診断基準を満たさない関節炎を呈する患者で抗体陽性であれば後に RA に進展する可能性が高いことが知られている。*P. gingivalis* はタンパクのシトルリン化を担う酵素 Peptidyl arginine deiminase (PAD) を保有していることから、RA の病態への関与が注目されてきた。しかし、臨床研究においても動物実験においても *P. gingivalis* 感染や抗 CCP 抗体と RA 関連については相反する報告が拮抗しており、明確な結論は得られていない。近年、腸内細菌叢の変動が RA などの自己免疫疾患にも関与することが明らかになってきた。申請者らはこれまで、*P. gingivalis* が腸内細菌叢を変動させ、腸管バリア機能の低下と内毒素血症を誘導して全身的に軽微な炎症を誘導することを報告した。そこで本研究ではコラーゲン誘導関節炎モデルマウスに *P. gingivalis* を感染させ、関節炎の動態と腸内細菌叢に注目して病因メカニズムの解明を試みた。その結果、*P. gingivalis* 口腔投与は関節炎の重症化を誘導するという先行研究と同様の結果を得ている。一方、PAD を保有しない別の歯周病原細菌である *Prevotella intermedia* は関節炎の重症化を誘導することはなかった。しかし、抗 CCP 抗体のレベルは投与菌種に関係なく上昇したことから PAD の関与は否定された。*P. gingivalis* 投与により腸内細菌叢の変化とそれに伴う腸管免疫系における Th17 細胞の活性化、血中 IL-17 レベルの上昇が誘導されたが、*P. intermedia* ではこのような変化が誘導されなかった。IL-17 は RA の病因において重要な役割を演じていることが多くの報告で明らかにされている。さらに、人工胃液を用いた耐酸性実験から *P. gingivalis* が *P. intermedia* と比較して耐酸性が強いことも初めて明らかにされた。これらの結果は、歯周炎と関節リウマチの関連メカニズムを考察する上で新たな重要な知見を与える。すなわち、*P. gingivalis* 由来 PAD による自己免疫応答の誘導や炎症歯周組織で産生された炎症性サイトカインが血流を介して病変に増悪化を誘導するという、これまで考えられてきた主要な関連メカニズムは少なくともマウス結紮モデルにおいては関与していな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 *P. gingivalis* が *P. intermedia* と比較して耐酸性を有する理由
- ② 関節炎誘導後、血清中抗 *P. gingivalis* IgG 抗体量が増加しているが、腸管に由来するものか？口腔からの影響の可能性はあるのか？
- ③ 関節炎の誘導によって抗 CCP 抗体価が増加しない理由
- ④ *P. gingivalis* 口腔投与にとって Bacteroidetes 門の割合が減少、Firmicutes 門の割合が増加する理由

- ⑤ *Bacteroidetes* 門の変動について、*P. gingivalis* 投与以外の影響は考えられるか？
- ⑥ マウス糞便中菌叢解析で *P. intermedia* 群では門レベルの変動は認めないが、属レベルでの変動を認める理由
- ⑦ Th17 の分化誘導が促進しているのに血清中 IL-6 が変動していない理由
- ⑧ パイエル板では Th17 の分化誘導が促進しているが、IL-17 産生が亢進していない理由
- ⑨ 鼠径リンパ節、脾臓において Th17 の分化誘導は促進していないが、IL-17 産生能が亢進している理由
- ⑩ 回腸・大腸における遺伝子発現と腸管膜リンパ節、パイエル板のリンパ球 subset の違いについての考察
- ⑪ *P. gingivalis* W83 株を用いた理由、関節炎モデルマウスとして CIA モデルマウスを用いた理由
- ⑫ コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) はヒトにおけるどのような病態と考えればよいか？
- ⑬ 今回の実験系はヒトの疾患にどれくらい反映されると考えるか？
- ⑭ Figure 3 の実験方法について説明、細菌による耐酸性の違いが生じる理由
- ⑮ Figure 5 について、腸管膜リンパ節とパイエル板においてのみ Th17 細胞への分化誘導が認められるが、リンパ球ホーミングの影響はあるのか？
- ⑯ Figure 6 で IL-27 についての解析を行っていない理由、IL-27 の作用について説明
- ⑰ Supplementary figure S2 について、糞便中より細菌が検出できなかった理由

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。