

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	濱本 結太
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 感染関節リウマチモデルマウスにおける腸内細菌叢の変化が関節炎増悪に与える影響に関する研究			
論文審査担当者			
主査	教授	河口 浩之	印
審査委員	教授	杉山 英二	
審査委員	准教授	宮内 睦美	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯周炎は <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg)などの歯周病原細菌の感染によって、歯周組織の破壊が引き起こされる慢性炎症性疾患である。近年歯周炎が、糖尿病、血管障害、非アルコール性脂肪性肝炎、関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA)、アルツハイマー病などの疾患と関連があるという報告が数多くある。著者らの研究室では特に、歯周炎と RA の関連について研究を行ってきた。</p> <p>RAは anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA)のような自己抗体によって、関節組織の破壊が引き起こされる自己免疫疾患である。RA 患者は Pg に対する血清抗体価が健常者より高いことや、RA 患者で Pg に対する血清抗体陽性の患者は、血清中 ACPA が高値を示すなど、歯周炎と RA の関連を裏付ける報告が多くある。また、著者らの研究室ではこれまでに RA モデルマウスである SKG マウスにおいて、Pg を腹腔内に投与することによって関節炎が増悪することを示しており、更に Pg を口腔感染させても同様の結果を得た。</p> <p>歯周炎が RA を増悪させるメカニズムとして、菌血症、サイトカイン血症、C5a や NETosis など様々な因子について研究がなされてきた。近年その因子の一つとして腸内細菌叢の変化が注目されている。RA 患者は健常者と異なる腸内細菌叢を示し、また RA 患者の糞便を SKG マウスに腸内細菌叢移植 (fecal microbiota transplantation, FMT) することによって、マウスの関節炎が増悪することが報告されている。更に C57BL/6 マウスに Pg を口腔感染させると腸内細菌叢が変化するという報告もある。本研究は、Pg 感染によって変化した腸内細菌叢が RA 増悪に与える影響について明らかにすることを目的とした。</p> <p>材料と方法を示す。6-8 週齢、雌の SKG マウスに、B-グルカンの一種であるラミナリン (LA) 10 mg を腹腔内注射した。Pg W83 株を 10⁸ CFU/50 µl の濃度で 2%カルボキシメチルセルロース含有 PBS に懸濁し、週 2 回の頻度で 6 週間マウスの口腔内に塗布した。歯周炎は alveolar bone loss (ABL)、関節炎は arthritis score (AS)と距骨の HE 染色を用いて評価した。また、血清、歯周組織、関節組織、小腸、大腸中の interleukin-6 (IL-6) 濃度と血清中の ACPA を ELISA 法で測定した。腸内細菌叢は、新鮮便を採取し、DNA を PowerSoil kit にて精製後、次世代シーケンサー (イルミナ社、Miseq) でメタゲノム解析を行った。また FMT 実験では、採取した新鮮便を 10 mg/ml になるよう 20%グリセロール含有 PBS を加えて懸濁し、移植サンプルとした。レシピエントマウスは FMT 前にアンピシリン (1 g/l)、メトロニダゾール (1 g/l)、ネオマイシン (1 g/l)、バンコマイシン(0.5 g/l)を飲料水中に含ませ 1 週間飼育し、腸内細菌叢を調整した雌の SKG マウスを用いた。FMT はシリンジを用いて経食道で行い、250 µl を 2 回、計 500 µl 移植した。移植後に LA10 mg を腹腔内注射し、6 週間後に関節炎を評価した。</p> <p>LA を腹腔投与した SKG マウスに Pg を口腔感染させることで、ABL が増加し歯周炎が生じた。また AS が有意に上昇し、距骨 HE 染色においても著明な炎症性細胞浸潤とパンスの</p>			

形成を認めた。更に血清、歯周組織、関節組織、小腸、大腸中の IL-6 濃度は上昇した。腸内の IL-17 の mRNA 発現は増加する傾向を示した。加えて、Pg 投与 6 週間後のマウスの腸内細菌叢の変化が認められた。特に *Bacteroidetes* 門に属する菌の増加、*Firmicutes* 門と *Deferribacteria* 門に属する菌が減少した。また、炎症性大腸疾患に関与しているという報告のある *S24-7* 科に属する菌は増加し、制御性 T 細胞の分化誘導に関わると言われている *Clostridia* 目に属する菌は減少した。腸内細菌叢の恒常性は宿主と細菌の免疫応答、免疫寛容のバランスで維持されている。Pg 感染による dysbiosis の結果腸内免疫に異常をきたし、炎症性の変化が誘導されていると考えられる。FMT 実験では、レシピエントマウスに直接 Pg を感染させていないにもかかわらず、Pg 感染によって RA が増悪したマウスの腸内細菌を移植することによって、AS がより早期から増悪した。これは Pg 口腔感染によって引き起こされる dysbiosis が、FMT により早期に誘導されたためと考えられる。距骨 HE 染色においても、Pg 口腔感染実験同様、炎症性細胞浸潤とパンス形成を認めた。

以上の結果から、Pg 口腔感染は腸内細菌の変化を引き起こし、腸管粘膜の恒常性破綻の結果、炎症性の変化が引き起こされ、関節炎増悪に影響を及ぼすことが示唆された。

よって審査委員会委員全員は、本論文が濱本 結太に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	濱本 結太
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 感染関節リウマチモデルマウスにおける腸内細菌叢の変化が関節炎増悪に与える影響に関する研究			
最終試験担当者			
主査	教授	河口 浩之	印
審査委員	教授	杉山 英二	
審査委員	准教授	宮内 睦美	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年11月7日の第3回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月6日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 腸内細菌叢の変化と Th17 細胞の分化，リウマチ増悪との関係について 2 <i>P.copri</i> に関する本研究での知見について 3 <i>pgpad</i> 遺伝子欠失株群での ACPA などに対する影響について 4 <i>Pg</i> 感染関節炎マウスでの腸内細菌叢変化のメカニズムについて 5 <i>Pg</i> の菌種によるリウマチ増悪へ及ぼす影響について 6 今後の研究，展望および歯周炎とリウマチの臨床現場への関わり方について <p>これらに対して極めて適切な解答をなし，本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果，全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			