

# 論文要約

## *Porphyromonas gingivalis* 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

主指導教員：栗原 英見 教授  
(医歯薬保健学研究科 歯周病態学)

副指導教員：柴 秀樹 教授  
(医歯薬保健学研究科 歯髓生物学)

副指導教員：香西 克之 教授  
(医歯薬保健学研究科 小児歯科学)

濱本 結太

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

歯周炎は *Porphyromonas gingivalis* (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、歯周組織に限局した慢性炎症性疾患である。近年この局所的な炎症が、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様々な全身疾患と関連があるという報告が数多くある。その中でも本研究室では特に、歯周炎と RA の関連について研究を行ってきた。

RA はシトルリン化タンパク(citrullinated protein, CP)に対する自己抗体である anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA)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 は関節組織という局所において慢性炎症を引き起こす結果、骨組織が破壊されるという点で歯周炎の病態と非常に類似している。統計学的にも 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、本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。

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。口腔と腸は繋がっており、上部消化管である口腔内の細菌叢の変化が、下部消化管である腸内の細菌叢の構成に影響を与えている可能性は十分にあると言える。現に 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がある。また RA 患者は健常者と異なる腸内細菌叢を示し、更に 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。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。加えて Pg が RA 増悪に関与する因子として PgPAD がある。PAD はタンパク質中のアルギニンをシトルリンへと脱イミノ化する酵素で、生体内にも存在し生理的機能を有する反面、好中球の NETosis への関与のように炎症や疾患との関与が報告されている。また主に PAD4 により生体内に生じる CP が免疫系から異物と認識されるため、自己抗体産生に関与していると言われており、炎症を起こしているヒト歯肉中に PAD4 と CP が増加しているという報告がある。Pg は報告されている中で細菌の中で唯一 PAD を保持しているため、PgPAD による CP 産生が RA 増悪に関与している可能性がある。本研究では、PgPAD が RA 増悪に与える影響を明らかにすることも目的とした。

## 【材料と方法】

6-8 週齢、雌の SKG マウスに、β-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  $10^8$  CFU/50  $\mu$ l 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、歯肉、関節組織、小腸、大腸中の CP の濃度を dot blot で測定した。更に Th 関連遺伝子として、腸内の *Stat3*、*Rorg*、*Il17*、*Foxp3* の mRNA 発現を real-time PCR 法で解析した。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 週間飼育することで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  $\mu$ l を 2 回、計 500  $\mu$ l 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。

同様にマウスに LA を注射し、Pg ATCC33277 株 (WT 株) 及び *pgpad* 遺伝子欠失株 (KO 株) をそれぞれ  $10^8$  CFU/50  $\mu$ l 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)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) 濃度を ELISA 法で、歯肉、関節組織、小腸、大腸中の CP の濃度を dot blot で測定した。更に Th 関連遺伝子として、腸内の *Stat3*、*Rorg*、*Il17*、*Foxp3* の mRNA 発現を real-time PCR 法で解析した。

#### 【結果と考察】

LA を腹腔投与した SKG マウスに Pg W83 株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ヌスの形成を認めた。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ヌス形成を認めた。

同様に、LA を腹腔投与した SKG マウスに WT 株を口腔感染させることで、ABL が増加したが、KO 株を口腔感染させても ABL の有意な増加は認めなかった。また両者の AS は KO 群のほうが低値を示す傾向にあったが、有意な差は認めなかった。これは遺伝子欠失株として用いた

Pg ATCC33277 株が元々病原性の低い菌株で、及ぼす影響の差が少なかったためと考えられる。更に各組織中の IL-6 濃度と CP 産生量はほとんどの組織において、KO 群で有意に低値を示した。これらは PgPAD が、炎症誘発や CP 産生を引き起こして RA 増悪に大きく関与する重要な因子の 1 つである可能性を示唆している。また、PgPAD が RA 増悪だけでなく単に歯周炎発症における病原因子であることも示唆された。今後は病原性の強い Pg W83 株の *pgpad* 遺伝子欠失株を用いて検討する必要があると考える。

## 【結論】

以上本研究から、歯周病原細菌である Pg の口腔感染は、関節炎モデルマウスにおいて RA の病態を増悪させた。そのメカニズムの 1 つとして、腸内細菌叢の変化が考えられる。つまり Pg 口腔感染により何らかのメカニズムで腸内の *dysbiosis* が引き起こされ、その結果腸管免疫の恒常性が破綻し、更に恒常性が破綻したことで引き起こされる過剰な免疫反応による炎症性変化が全身に波及し、RA 増悪に関与していると考えられる。特に、FMT の実験では Pg の直接的な暴露を受けていないレシピエントマウスで関節腫脹がより早期から発現し、またその症状がより増悪することからも、Pg 口腔感染によって引き起こされた腸内の *dysbiosis* が RA 増悪に大きく関与している可能性が伺える。加えて引き起こされる炎症性変化が、*pgpad* 遺伝子欠失株を用いることで概ね抑制されることから、PgPAD の存在が RA 増悪に関連する重要な因子の 1 つであると考えられる。

近年、歯周炎が RA のみならず糖尿病や心疾患、脳血管障害など様々な全身疾患に関与しているという報告が数多くなされ、口腔と全身の健康が関連していることが歯科分野のみならず医療界全体に浸透しつつある。今後ますます高齢化を迎えていく中で、歯周病患者や RA 患者の数は増加の一途をたどることが予想される。歯周病がどのようなメカニズムで RA 増悪に関与するかを明らかにすることは、歯周治療が RA 治療の一端を担う可能性を証明することにつながり、歯科医療が口腔のみならず全身の健康の増進に寄与していることを示す上で極めて重要であると考えられる。更に RA のみならず、歯周病が増悪に関与していると言われているその他の全身疾患においても、その詳しいメカニズムを明らかにする糸口となり得る。本研究は、多くの患者が全身の健康維持のために歯科を受診したり口腔衛生維持に努める動機づけになるとともに、医科歯科連携を深める基盤となることが期待される。本研究で得た知見をもとにさらなる研究を行うことで、両疾患の新規治療法や検査法の開発に繋がり、国民の健康維持への一助となれば幸いである。