

論文内容要旨

Porphyromonas gingivalis 菌性感染は非アルコール性脂肪性肝炎関連肝癌の発生や進行を促進する

主指導教員：高田 隆 教授

(医歯薬保健学研究科 口腔顎顔面病理病態学)

副指導教員：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：宮内 睦美 准教授

(医歯薬保健学研究科 口腔顎顔面病理病態学)

坂本 真一

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【諸言】

非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic Steatohepatitis; NASH) はメタボリックシンドロームの肝臓での表現型の 1 つで、アルコール多飲、ウイルス感染や免疫学的異常などの要因が関わらないものと定義されている。NASH は進行性疾患でその 10~20% が肝硬変や肝臓に移行すると言われている。私の所属する教室では高脂肪食 (HFD) 誘導 NASH マウスモデルを用い、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivlis* (*P.g.*) 歯性感染が肝臓の炎症や線維化を促進することで NASH の病態を増悪させることを報告している。しかしながら *P.g.* の歯性感染と肝臓の発生や進行との関係は未だ明らかでない。そこで本研究では、*P.g.* 歯性感染が NASH 関連肝臓の発生や進行に関与するかどうかを明らかにするため、以下の実験を行った。

実験 1. NASH 関連肝臓の発生や進行に対する *P.g.* 歯性感染の及ぼす影響について

P.g. 歯性感染が NASH 関連肝臓の発生や進行に及ぼす影響を明らかにするために、HFD 誘導 NASH 関連肝臓マウス (C57B1/6J) モデルを用いた検討を行った。このモデルでは、HFD を 60 週投与することにより約半数の動物に肝臓腫瘍が発生することが報告されている。本実験では、マウスに HFD を 8 週間投与し、その半数に *P.g.* を歯性感染させ (HFD-*P.g.* (+), HFD-*P.g.* (-))、60 週後の肝臓における腫瘍の発生状況を評価した。また、普通食 (CD) 飼育、*P.g.* 非感染マウス (CD-*P.g.* (-) 群) の肝臓を陰性コントロールとして評価した。その結果、感染 60 週において、HFD-*P.g.* (-) 群では 61.5%、CD-*P.g.* (-) 群では 11.1% に腫瘍が観察されたのに対し HFD-*P.g.* (+) 群では全例に腫瘍形成を認め、*P.g.* 歯性感染によって腫瘍の発生が有意に促進されていることが明らかになった。また、腫瘍の大きさや数について検討したところ、HFD-*P.g.* (+) 群では他群と比較し腫瘍径の有意な増大を認め、腫瘍の数も CD-*P.g.* (-) 群より有意に増加していた。さらに、組織学的解析では、腫瘍内に癌化を示すマウスの割合は CD-*P.g.* (-) 群では 0%、HFD-*P.g.* (-) 群では 7.7% であったのに対し、HFD-*P.g.* (+) 群では 33.3% と高値であり、*P.g.* 歯性感染によって癌の発生率も有意に高い値を示すことが明らかとなった。

実験 2. *P.g.* 歯性感染による NASH 関連肝臓の発生や進行促進メカニズムについて

P.g. 歯性感染が NASH 関連肝臓の発生や進行を促進する分子メカニズムを明らかにするために以下の検討を行った。

1) *P.g.* 感染肝細胞、非感染肝細胞における網羅的プロテオーム解析による検討の結果、155 のタンパクが *P.g.* 感染肝細胞にのみ検出された。その発現量の多いタンパクに integrin $\beta 1$ シグナル伝達分子で、肝臓発生や進行への関与が報告されている Focal adhesion kinase (FAK) が検出されたため、*P.g.* 感染肝細胞における integrin $\beta 1$ シグナルタンパク発現を確認した。*P.g.* 感染肝細胞では FAK, AKT, ERK のリン酸化亢進が認められ、FAK, AKT のリン酸化亢進は siRNA を用いた integrin $\beta 1$ のノックダウン細胞では、抑制された。マウス肝臓において、同様に integrin $\beta 1$ シグナルタンパク発現をウェスタンブロット法で調べたところ、HFD-*P.g.* (+) 群で FAK, AKT, ERK の活性化傾向を示した。これらの結果から、肝細胞に *P.g.* が感染す

ると integrin $\beta 1$ 経路の活性化を介して肝癌の発生や進行に関与する可能性が示唆された。

2) integrin $\beta 1$ シグナルが肝細胞の増殖、アポトーシス、遊走に及ぼす影響を明らかにするために、*P.g.* 感染ならびに非感染肝細胞の細胞数を計測するとともに、ドキソルビシン (DOX) の誘導するアポトーシス関連因子発現に対する *P.g.* 感染の影響をウェスタンブロット法にて検討した。遊走能については wound healing assay を用いて検討した。その結果、*P.g.* 感染によって増殖能が有意に上昇し、DOX の誘導する PARP や caspase-3 の切断阻害によってアポトーシスが抑制され、さらに遊走能が有意に上昇することが示された。また、これらの *P.g.* 感染による影響は integrin $\beta 1$ のノックダウンにより抑制された。

3) NASH 関連肝癌発生には慢性炎症、特に炎症性サイトカインである TNF- α の関与が示唆されているため、*P.g.* 菌性感染による NASH 関連肝癌の発生や進行の促進における TNF- α の関与を調べた。非結節部から抽出した組織溶解液を用い、TNF- α 発現を確認したところ、HFD-*P.g.* (+) 群で TNF- α の著明な発現上昇が観察された。免疫組織化学的に、HFD-*P.g.* (+) では HFD-*P.g.* (-) 群に比べて、crown-like structure (CLS : 細胞死に陥った脂肪細胞を炎症促進性マクロファージが取り囲み、貪食・処理する組織学的構造) が増加し、多くが強い TNF- α 陽性を示した。さらに、ヒトマクロファージ細胞株 (THP-1) を用いた *in vitro* の実験では、*P.g.* 感染により THP-1 細胞からの TNF- α の産生が有意に増加した。*P.g.* 感染により CLS を構成するマクロファージ から過剰に産生された TNF- α が NASH 関連肝癌の発生や進行に関わると考えられた。

【結論】

以上の結果より、*P.g.* 菌性感染は integrin $\beta 1$ 経路の活性化による細胞増殖、抗アポトーシス、細胞遊走能の上昇に加え、*P.g.* 感染による CLS を構成するマクロファージからの TNF- α 産経路の活性化を介して、NASH 関連肝癌の発生や進行を促進することが明らかとなり、NASH 関連肝癌の予防や進行抑制における *P.g.* を標的とした歯科治療の有用性が示唆される。