

論文内容要旨

The mechanism of preterm birth caused by *Porphyromonas gingivalis*
(*Porphyromonas gingivalis*による早産発症の機序)

1) Fetal Membrane Inflammation Induces Preterm Birth Via Toll-Like Receptor 2 in Mice With Chronic Gingivitis

(慢性歯周炎マウスでは Toll-like receptor 2 を介した卵膜の炎症が早産を誘導する)

Reproductive Sciences, 26(7):869-878,2019.

2) *Porphyromonas gingivalis*, a cause of preterm birth in mice, induces an inflammatory response in human amnion mesenchymal cells but not epithelial cells

(*Porphyromonas gingivalis*は、ヒト羊膜上皮細胞ではなくヒト羊膜間葉系細胞において、マウスと同様に早産の原因となる炎症を惹起する)

Placenta, 99:21-26,2020.

主指導教員：工藤 美樹 教授

(医系科学研究科 産科婦人科学)

副指導教員：宮内 睦美 教授

(医系科学研究科 口腔顎顔面病理病態学)

副指導教員：川上 秀史 教授

(原爆放射線医科学研究所 分子疫学)

小西 晴久

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

要 旨

早産は、新生児死亡及び脳性麻痺や慢性肺障害などの後遺症を引き起こす主な原因である。我が国の妊娠 37 週未満の早産の頻度は、全分娩の約 5~6 %で推移しており減少していない。そのため、早産発症の機序の解明は、早産の予防及びそれに引き続く児の罹患や予後の改善において極めて重要である。

早産と炎症は密接に関連し、子宮頸管炎から卵膜へ上行性の細菌感染が一般的な原因である。子宮や卵膜に炎症が起こるとプロスタグランジン (PG) の産生が増加し子宮収縮が増強することで早産に至る。近年、全身性の持続性慢性炎症性疾患である歯周病が早産の危険因子であると注目されている。歯周病が局所に炎症を引き起こす原因として、歯周組織で産生された炎症性サイトカインが血行性に全身へ影響を及ぼす機序以外に、歯周病原菌が血行性に伝播し局所で炎症を誘発する機序も報告されている。しかし、歯周病と早産の関連に一定の見解は得られておらず、特に歯周病原菌と子宮や卵膜などの局所炎症との関連については報告されていない。そこで、歯周病原菌により子宮や卵膜などの局所での炎症が誘発され、子宮収縮が増強して早産となる機序について検討した。

まず、歯周病原菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) を歯髄内に封入した菌性感染早産マウス (*P.g.* 群) を作製した。*P.g.* 群では、炎症性サイトカインの一つである interleukin (IL)-1 α の血清中濃度が正常マウス (正常群) と比べ高く全身性炎症の存在が示唆された。次に陣痛発来前の妊娠 18 日目の子宮平滑筋を採取し、収縮関連タンパク (oxytocin 受容体、connexin 43、PGF2 α 受容体) の発現を real-time PCR 法にて検証した。*P.g.* 群の子宮平滑筋では同時期の正常群と比べて 3 つの収縮関連タンパクの発現が有意に亢進していた。さらに tissue organ bath system を用いた子宮収縮実験により、*P.g.* 群では自然収縮が Area 解析で 1.6 倍亢進しており、また、oxytocin 感受性が亢進していた。以上より、*P.g.* 群では正常群よりも早い時期に収縮関連タンパクの発現が亢進し、子宮収縮が増強することで早産に至ると考えられた。

次に、収縮関連タンパクの発現を制御する IL-1 α と、PG の産生に関与する cyclooxygenase (COX)-2 遺伝子の発現変化を real-time PCR 法で検証した。子宮平滑筋では、*P.g.* 群と正常群間でこれらの遺伝子発現に有意な差を認めなかったが、卵膜では *P.g.* 群において IL-1 α と COX-2 の遺伝子発現がそれぞれ 5.7倍と 1.8倍に亢進していた。また免疫組織化学染色法により、卵膜内に *P.g.* のコロニー形成を認めた。そこで、卵膜での炎症に着目し、炎症性サイトカインの発現を誘導し炎症応答で中心的な役割を果たす Nuclear Factor (NF)- κ B 経路及び Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の活性化を Western blot 法で検証した。*P.g.* 群の卵膜では正常群に比べて、NF- κ B の subunit である p65 と、MAPK 関連タンパクである p38 がリン酸化され活性化していた。さらに病原菌の分子パターンを認識し細胞内の炎症経路を活性化する Toll-like receptor 2 (TLR2) の遺伝子発現は、*P.g.* 群の卵膜で有意に亢進して

いた。以上より、*P.g.* 群で見られる子宮収縮の増強は、卵膜に感染した *P.g.* が、TLR2 を介して NF- κ B、MAPK 経路を活性化し、IL-1 β と COX-2 の発現を亢進させたことが原因であると考えられた。

これまでヒト卵膜では、局所的な *P.g.* のコロニー形成が報告されているが、*P.g.* の感染と炎症惹起との関係は明らかではない。そこでヒト羊膜初代培養細胞を用いて、*P.g.* 感染による炎症応答の変化を検証した。選択的帝王切開を行った正期産の羊膜を、羊膜上皮細胞と羊膜間葉系細胞を分離・培養後、実験に用いた。ヒト羊膜間葉系細胞では、*P.g.* や *P.g.* - lipopolysaccharide の刺激により NF- κ B 経路が活性化され、IL-1 β と COX-2 の遺伝子発現および培養液中の IL-1 β と PG タンパクの分泌が増加した。一方、ヒト羊膜上皮細胞では有意な変化を認めなかった。

P.g. 菌性感染早産マウスでは、卵膜組織に感染した *P.g.* が TLR2 を介した炎症応答により子宮収縮を増強し、早産に至ると考えられた。また、ヒト羊膜間葉系細胞でも同様に、*P.g.* の刺激は子宮収縮の増強を促す炎症応答を引き起こした。以上のことから、歯周病原菌 *P.g.* はヒト卵膜内においても局所炎症を誘発し、子宮収縮を増強させることで早産発症に関与している可能性が示唆された。