

令和元年6月13日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05554

研究課題名(和文) 歯周炎患者口腔細菌叢 - 腸内細菌叢連関を基盤とした全身疾患リスク因子の同定

研究課題名(英文) Identification of risk factors for systemic diseases in periodontitis patients based on the connection between oral and gut microbiomes

研究代表者

中島 貴子 (Nakajima, Takako)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：40303143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は動脈硬化性疾患、代謝性疾患、自己免疫疾患などのリスクを高めるといわれている。また、それらの疾患は腸内細菌の乱れとも関連するという報告がある。これまでの動物実験で示した、嚥下した歯周病原細菌が腸内細菌を変化させるというデータに基づき、ヒトでの実証を試みた。本研究課題では歯周炎患者腸内細菌叢が健常者と有意に異なることを初めて明らかにし、歯周病と全身疾患を関連づける新たなメカニズムを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで歯周病が全身疾患のリスクを高めるメカニズムは解明されていなかった。本研究課題において、歯周病と関連する口腔細菌を多量、かつ継続的に嚥下することで腸内細菌が乱れることを実際の患者においてはじめて示した。腸内細菌叢は全身の健康と密接に関連しており、歯周病治療が腸内細菌叢の改善を介して健康長寿に貢献することの学術的基盤を提供した意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is known to be associated with atherosclerotic vascular diseases, metabolic diseases, and autoimmune diseases. Gut dysbiosis is also implicated in these diseases. Based on our data in which swallowed periodontopathic bacteria induces gut dysbiosis, we aimed at clarifying these findings in fact take place in human periodontitis patients. We demonstrated that gut microbiota composition of periodontitis patients is significantly different from that of healthy subjects, providing new insight into the causal mechanism of periodontitis for systemic diseases.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 腸内細菌 マイクロバイオーム メタボローム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、口腔細菌叢のバランス異常・失調(dysbiosis)によって引き起こされる歯周病が糖尿病、動脈硬化性疾患など、様々な疾患のリスクを高めることが、主として疫学研究により明らかになってきた。共通の疾患感受性、共通のリスク因子が存在する可能性は否定できないが、因果関係を説明するメカニズムとして菌血症、炎症性サイトカイン、分子相同性に基づく自己免疫応答が挙げられている。しかし、direct evidenceは乏しい。

一方、歯周病が関連すると報告されている疾患の多くはまた、腸内細菌叢の dysbiosis と関連するという報告が蓄積されている。腸内細菌のバランスが崩れ、有害菌が増加すると、それらの細菌によって生成される腐敗産物、細菌毒素、発がん物質などの有害物質は腸管自体を直接傷害するのみならず、バリア機能の低下した腸上皮間隙から体内に吸収され、肝臓、心臓、腎臓、膵臓、血管などの様々な組織に障害を与える(Clemente et al. Cell, 2012)。

もし、構成異常を来した口腔細菌を毎日大量に飲み込むことで腸内細菌のバランスが崩れ、有害細菌の比率が高まり、有害物質が増加する状況が作られると、歯周病による様々な疾患リスクの増加に対する因果関係が合理的に説明できることになる。

我々はマウス口腔から *P. gingivalis* W83 株を投与し、代謝変動、脂肪組織・肝臓の炎症性変化、遺伝子発現変動について解析した。さらに糖代謝、炎症と腸内細菌の変化を明らかにするために、回腸細菌叢を 16S rRNA 遺伝子を指標に網羅的に解析した。その結果、*P. gingivalis* 投与により、耐糖能異常とインスリン抵抗性が誘導されることが明らかになった。この変化は脂肪組織におけるインスリン抵抗性関連遺伝子発現の上昇、インスリン感受性関連遺伝子の発現低下が関連していることが示された。肝臓においても脂肪組織と同様、炎症性サイトカイン遺伝子発現の上昇が認められた。さらに、脂肪蓄積に関与する遺伝子発現の上昇に伴って脂肪滴の蓄積が認められた(Arimatsu et al. Sci Rep, 2014)。

*P. gingivalis* 口腔投与に伴って腸内細菌叢はバクテロイデス門の比率が増加し、フィルミキューテス門の比率が低下した。さらに、腸管バリア機能に重要な役割を演じているタイト結合タンパクの遺伝子発現を低下させるとともに、血中内毒素レベルを上昇させた。

### 2. 研究の目的

腸内細菌叢の変化がメタボリックシンドローム関連疾患のリスクを高めることが報告されているがそれらの疾患は歯周疾患が関連する疾患と共通している。我々はマウスを用いて、嚥下した *Porphyromonas gingivalis* によって誘導される腸内細菌叢の変動と付随する腸管透過性の低下による内毒素血症が有力な関連メカニズムであることを示した。しかし、実際の歯周炎患者においてそのような現象が起こっているかは不明であり、さらに口腔細菌全体の影響についても明らかになっていない。本課題ではまず、歯周炎患者における口腔細菌叢と腸内細菌叢を網羅的に解析し、健康対照者と比較する。次に歯周炎患者口腔細菌を無菌マウスに投与し、糖・脂質代謝への影響を解析するとともに、定着細菌を同定し、腸内環境における口腔細菌の影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### ヒト歯周炎患者における細菌叢解析

(1) 未治療歯周炎患者 30 名の治療前後、および対照となる健常者 30 名の腸内細菌叢及び口腔細菌叢(唾液)のメタ 16S rRNA 遺伝子解析: 全身疾患を有しない歯周炎患者約 30 名、歯周組織を含む全身的に健康な者約 30 名を被験対象とした。治療前後に歯周組織検査を行うとともに唾液、歯肉縁下プラーク、糞便、血液を採取した。健常な対照者 30 名についても同様に検査と検体採取を行った。唾液、糞便についてはメタ 16S rRNA 解析を行った。得られたシークエンスをデータベースに参照し、細菌の系統アサインおよび機能アサインを行った。

(2) 上記歯周炎患者の歯周治療後の腸内細菌叢および口腔細菌叢のメタゲノム解析: 歯周治療終了後に上記と同様のサンプリングを行い、口腔細菌叢、並びに腸内細菌叢の変化を解析した。

(3) 血液より血清を分離し、multiplex immunoassay によりバイオマーカーの解析を行った。

#### 口腔細菌の腸内環境・腸管免疫に及ぼす影響

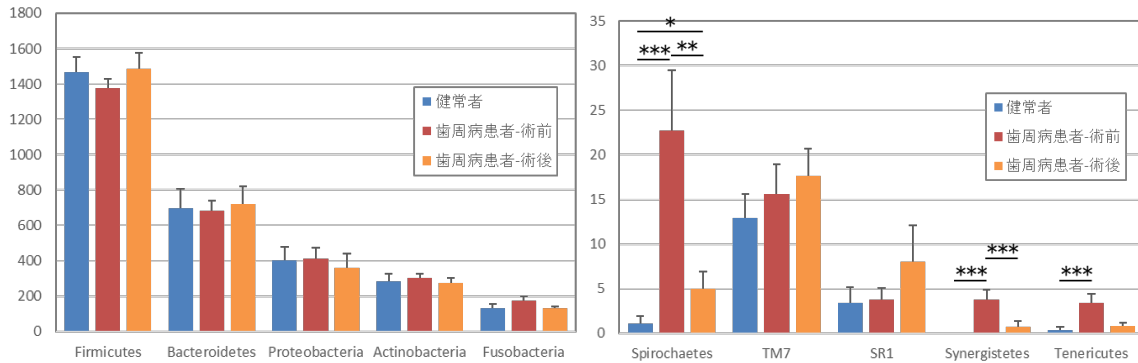
1) 歯周炎患者唾液細菌および健常者唾液細菌を代表する口腔細菌の無菌マウス投与による糖・脂質代謝、全身の炎症状態の変化: 6 週齢雄無菌マウス C57BL/6 を *P. gingivalis* W83 株を経口投与した *P. g* 群、コントロールとして *Lactobacillus salivarius* ATCC11741 を投与した *L. s* 群、基材のみ投与した Sham 群に分け、週 2 回投与を 5 週間行った。サンプリングを行った後、歯槽骨吸収解析、血清中のタンパク解析、腸間膜リンパ節・脾臓のリンパ球サブセット解析、歯肉・腸管・肝臓の遺伝子発現解析を行った。

### 4. 研究成果

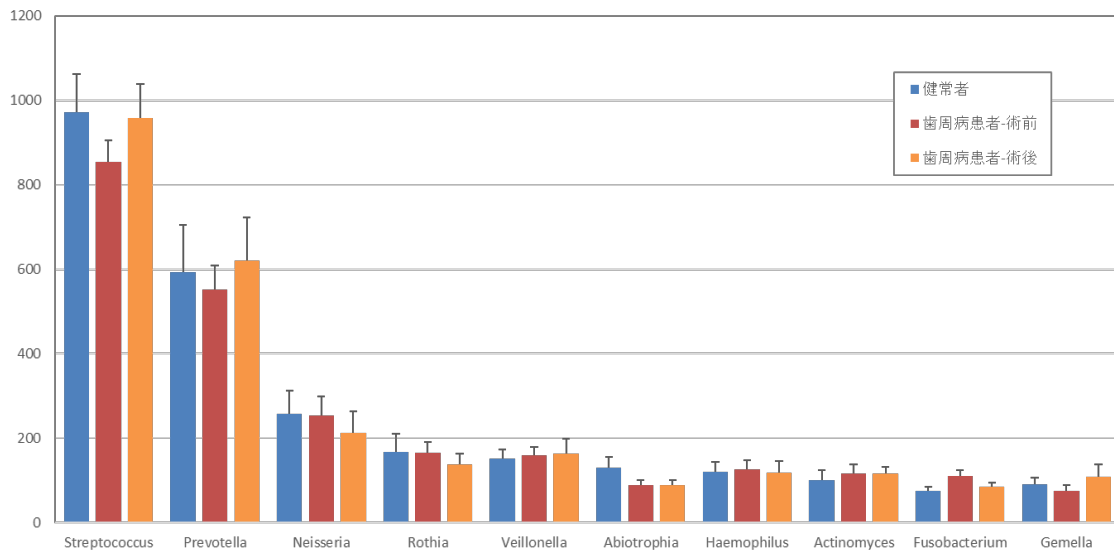
#### ヒト歯周炎患者における細菌叢解析

口腔細菌叢の変化: 歯周炎患者における歯周治療前の細菌叢は健常者と比較して多様性が高かった(Chao1,  $p < 0.001$ )。門レベルで相対的に高い比率を占めた上位 10 種類は Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, Spirochaetes, TM7, SR1, Synergistetes, Tenericutes であった。歯周炎患者術前において健常者と比較して Firmicutes が低い傾向にあり、Fusobacteria は高い傾向にあったが、いずれも統計学的に有意な違いは認

められなかった。マイナーな菌種である Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes は歯周炎 ( 図 1 )

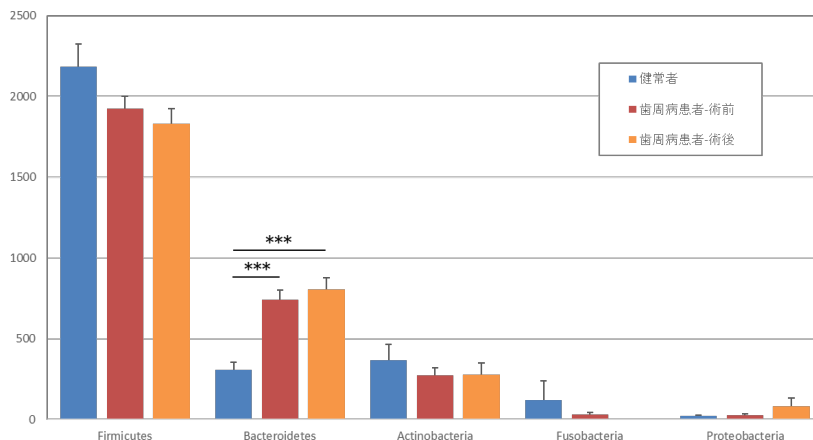


患者術前において健康者と比較して有意に高い比率を示した ( 図 1 )。属レベルでは Streptococcus が歯周炎患者術前において低い傾向にあり、術後に増加する傾向にあった。が、いずれの菌も有意な変化は認められなかった ( 図 2 )。Species レベルでは、Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis, Treponema genomsp, Prevotella intermedia, Filifactor alocis, Parvimonas micra など、いわゆる歯周病原細菌の比率が歯周炎患者術前において高く、術後に低下することが明らかになった。( 図 2 )



UniFrac 解析の結果、健康者と歯周炎患者術前の菌叢は有意に異なること、歯周炎患者術前と術後を比較すると有意な変化が見られること、術後においても健康者の細菌叢とは有意に異なることが明らかになった。歯周治療の前後における歯周病原細菌の比率の低下は、歯周組織の臨床的な改善と関連していた。

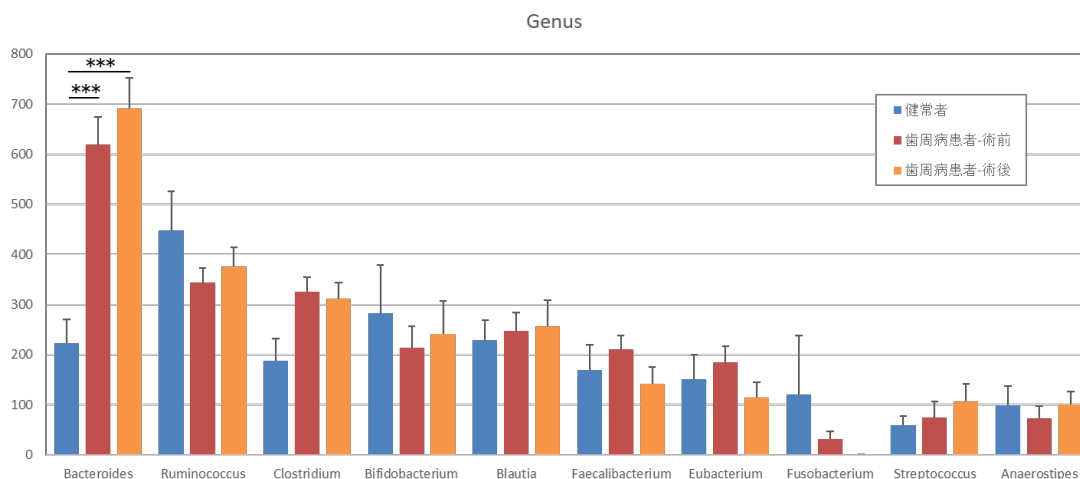
### 口腔細菌の腸内環境・腸管免疫に及ぼす影響 ( 図 3 )



腸内細菌叢の多様性に関しては OUT 数, chao1, Shannon ' s index のいずれも歯周炎患者と健康者、歯周炎患者の術前術後において有意な違いは認められなかった。門レベルで相対的に高い比率を占めた上位 5 種類は Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria であつ

た。この中で、Bacteroidetes の占める比率は健常者と比較して歯周炎患者の術前、術後とも有意に高く、術後では術前と比較してさらに高くなる傾向が認められた。一方、Firmicutes は健常者において歯周炎患者よりも菌叢に占める比率が高い傾向が認められた(図3)。Genus レベルでも Bacteroides が健常者と比較して有意に高い比率を占めていた(図4)。UniFrac 解析の結果、健常者と歯周炎患者術前の腸内細菌叢は有意に異なること、治療後においてもその差は明らかであった。

(図4)



### 血清バイオマーカーの解析

脂質代謝に関連する Angptl4、糖代謝に関連する Adiponectin のレベルは歯周炎患者において健常者と比較して有意に低下していた。一方、血中 LDL コレステロールレベル上昇と関連する PCSK9 は歯周炎患者において高い傾向が認められた。

以上のデータから全体的にいわゆる健康であっても、歯周病の罹患は腸内細菌叢に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。このことは健康や疾患と関連する腸内細菌叢の研究の際には歯周病の有無について検査することの重要性を示している。また、腸内細菌叢の変化は歯周病における疾患感受性にかかわっていることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Sato K, Yokoji M, Yamada M, Nakajima T, and Yamazaki K. An orally administered oral pathobiont and commensal have comparable and innocuous systemic effects in germ-free mice. J Periodont Res, 53, 2018, 950-960.

Sulijaya B, Takahashi N, Yamada M, Yokoji M, Sato K, Aoki-Nonaka Y, Nakajima T, Kishino S, Ogawa J, and Yamazaki K. The anti-inflammatory effect of 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid (KetoC) on RAW 264.7 cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. J Periodont Res, 53, 2018, 777-784.

Sato K, Takahashi N, Kato T, Matsuda Y, Yokoji M, Yamada M, Nakajima T, Kondo N, Endo N, Yamamoto R, Noiri Y, Ohno H, Yamazaki K. Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system. Sci Rep 7, 2017, 6955.

中島貴子. T 細胞免疫応答解析を基盤とした歯周炎と全身応答の関連解明、日歯周誌、58 巻、2016、51-57

[学会発表](計16件)

Takahashi N, 10-Hydroxy-cis-12-Octadecenoic Acid Ameliorates Gingival Epithelial Barrier Disruption via GPR40-ERK Signaling. 96th General session of the IADR, 2018.

Yokoji M, The Anti-Oxidative Function of 10-Oxo-trans-11-octadecenoic Acid in Gingival Epithelial Cells. 96th General session of the IADR, 2018.

Yamada M, Preventive Effect of Microbial Metabolite on Periodontitis in Mice. 96th General session of the IADR, 2018.

Benso Sulijaya, Bioactive metabolite inhibits proinflammatory cytokines by macrophage treated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via G-protein-coupled receptor 120, 第 61 回春季日本歯周病学会学術大会、2018 年

佐藤圭祐、*Porphyromonas gingivalis* 口腔投与が無菌マウスに与える影響の解析、第 61 回春季日本歯周病学会学術大会、2018 年

宮沢春菜、塩酸ミノサイクリン局所投与がサポートティブペリオドンタルセラピー（SPT）期歯周炎患者の歯肉縁下細菌叢に及ぼす影響、日本歯周病学会 60 周年記念京都大会、2017 年

中島貴子、歯周病と動脈硬化性疾患の関連、日本歯周病学会 60 周年記念京都大会、2017 年

山崎恭子、歯周炎患者腸内細菌叢における口腔内由来細菌の比率、第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2017 年

佐藤圭祐、Porphyromonas gingivalis 口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析、第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2017 年

中島貴子、塩酸ミノサイクリン局所投与がサポートティブペリオドンタルセラピー（SPT）期歯周炎患者の歯肉縁下細菌叢に及ぼす影響、第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2017 年

Nakajima T, Impact of local drug delivery of minocycline on the subgingival microbiota during supportive periodontal therapy: A pilot study, 12<sup>th</sup> Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, 2017.

中島貴子、歯周炎患者における腸内細菌叢の解析、第 60 回春季日本歯周病学会学術大会、2017 年

Yamazaki K, Periodontopathic bacteria increases the severity of collagen-induced arthritis by affecting gut microbiota, PgMelbourne, 2017.

Nakajima T, Impact of local drug delivery of minocycline on the subgingival microbiota during supportive periodontal therapy: A pilot study, UNCPERIO 2017 EXPO, 2017.

米澤大輔、成人健診データにおける歯槽骨吸収量と動脈硬化症リスクの関連解明、第 60 回秋季日本歯周病学会学術大会、2016 年

中島貴子、T 細胞免疫応答解析を基盤とした歯周炎と全身応答の関連解明、第 59 回春季日本歯周病学会学術大会、2016 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名： 山崎 和久

ローマ字氏名： Kasuhisa Yamazaki

所属研究機関名： 新潟大学

部局名： 医歯学系

職名： 教授

研究者番号（8桁）： 00182478

研究分担者氏名： 森田 英利

ローマ字氏名： Hidetoshi Morita

所属研究機関名： 岡山大学

部局名： 環境生命科学研究科

職名： 教授

研究者番号（8桁）： 70257294

研究分担者氏名： 齋藤 淳

ローマ字氏名： Atsushi Saito

所属研究機関名： 東京歯科大学

部局名： 歯学部

職名： 教授

研究者番号（8桁）： 60266559

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。