

令和元年6月12日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20667

研究課題名(和文) 歯周病原細菌は腸管透過性亢進に関与するか？

研究課題名(英文) Does periodontopathic bacterial infection affect increased intestinal permeability?

研究代表者

宮沢 春菜 (Haruna, Miyazawa)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：50733721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では代表的な歯周病原細菌*P. gingivalis*が腸管透過性に与える影響を、腸上皮細胞、動物モデルを用いて検討した。*P. gingivalis*を用いて腸上皮細胞を刺激しただけでは、腸上皮細胞間の構造破壊に明確な変化を認めなかった。無菌環境下にて*P. gingivalis*を経口投与したマウスでも、炎症の惹起や腸管透過性への影響を認めなかった。*P. gingivalis*自体が腸管へ直接的に影響を及ぼすのではなく、歯周病原細菌の嚥下により腸内細菌叢バランスの変動を惹起することで腸管透過性が亢進され、全身に影響が及ぶことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸上皮細胞に対する*P. gingivalis*の特異的作用が検討できただけでなく、唾液とともに嚥下している他の歯周病原細菌や、それらにより変動した腸内細菌における腸管・生体への作用を比較検討する際にも応用できる。本研究は歯周炎と全身疾患との因果関係を検証していくうえで、常在細菌叢のバランス破綻が生体機能に及ぼす影響を解明する足がかりとなると考える。

研究成果の概要(英文)： We proposed a mechanism linking periodontitis and systemic diseases, in which orally administered *Porphyromonas gingivalis* affects gut microbiota composition and leads to systemic inflammation. However, the mechanism by which *P. gingivalis* generates systemic effects from the gut is unknown. The aim of this study is to investigate *P. gingivalis* infection affect the intestinal permeability.

Intestinal epithelial cell line were treated with *P. gingivalis* LPS, live bacteria or supernatant culture liquid. Gene expressions of adhesion molecules and the permeability tended to change concentration-dependent manner. However, there are no significant differences in lower concentration. *P. gingivalis* administration to germ-free mice didn't induce alveolar bone resorption, inflammatory response in intestinal tissue. Endotoxin and IL-6 levels in the serum were not different from those of sham-administered mice. There may be indirect mechanisms for gut-mediated systemic effects by *P. gingivalis*.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病原細菌 腸管透過性

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

1. 研究開始当初の背景

多くの疫学研究より、歯周炎と様々な全身疾患との関連が示唆されているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。歯周炎と関連するといわれている動脈硬化性疾患、インスリン抵抗性、糖尿病、肥満などの疾患では、腸内細菌叢のバランスの乱れ (Dysbiosis) とそれに伴う腸管透過性の亢進による endotoxemia が深く関わっていることが近年報告されている。申請者の研究グループでは、歯周病原細菌を経口投与したマウスモデルにおいて、腸内細菌叢のバランスの変動とともに、血清中エンドトキシンレベルの上昇と、様々な組織や臓器における炎症の惹起を確認したが、その詳細なメカニズムについて明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究では代表的な歯周病原細菌である *P. gingivalis* による腸上皮細胞への刺激実験による *in vitro* での検討、*P. gingivalis* を経口投与するマウスモデルを用いた *in vivo* での検討により、腸管透過性の亢進における *P. gingivalis* の関与について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腸上皮細胞への歯周病原細菌刺激による、腸管透過性に対する直接的な影響について

ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2) へ各々 *E. coli* LPS、*P. gingivalis* をはじめとする歯周病原細菌 LPS、生菌にて刺激し、細胞間接着分子の遺伝子発現、腸管透過性の機能的評価を行った。

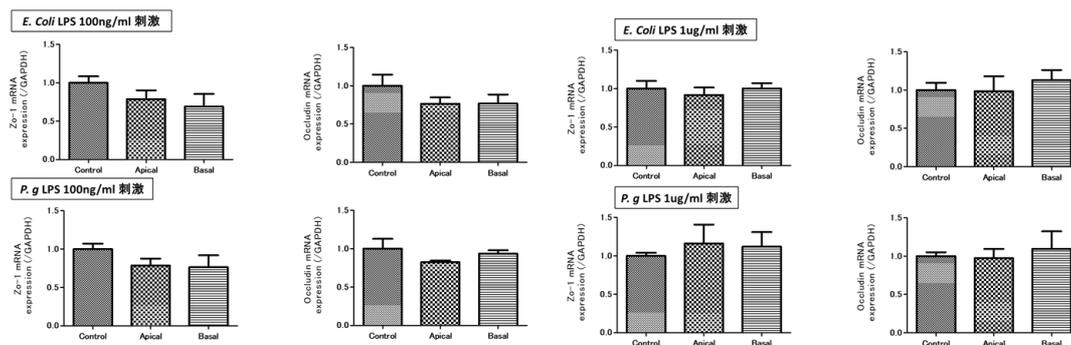
(2) *P. gingivalis* の嚥下が腸管透過性に及ぼす影響について

6週齢雄無菌マウス C57BL/6 に *P. gingivalis* W83 株を経口投与した *P. gingivalis* 群、コントロールとして *Lactobacillus salivarius* ATCC11741 を投与した *L. salivarius* 群、基材のみ投与した Sham 群に分け、週2回投与を5週間、計10回投与を行い、歯槽骨吸収解析、歯肉・腸管の遺伝子発現解析、血清中のエンドトキシンレベル・炎症性サイトカインレベルの解析を行った。

4. 研究成果

(1)-

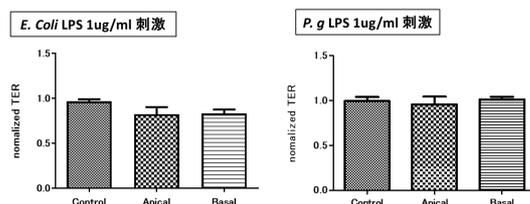
Transwell に播種し十分に分化させた Caco-2 に対し、Transwell の内側である Apical 側 (腸管側)、外側である Basal 側 (粘膜固有層側) に各々 *E. coli* LPS、*P. gingivalis* LPS 100ng/ml、1 μ g/ml にて刺激した。いずれの刺激においても細胞間接着分子 (Zo-1, Occludin) 遺伝子発現は有意な差は認められなかった。



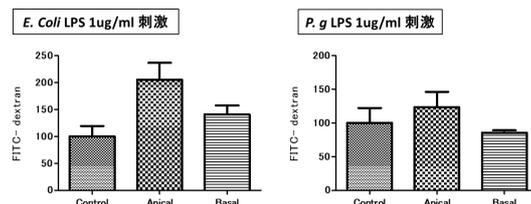
(1)-

Transwell に播種し十分に分化させた Caco-2 に対し、各々 *E. coli* LPS、*P. gingivalis* LPS 100ng/ml、1 μ g/ml にて刺激し、TER (Trans epithelial Resistance) 電気抵抗値測定、FITC 蛍光標識デキストラン透過性測定を行った。*P. gingivalis* LPS 刺激では透過性に有意差は認められなかった。

< TER 変化率 >

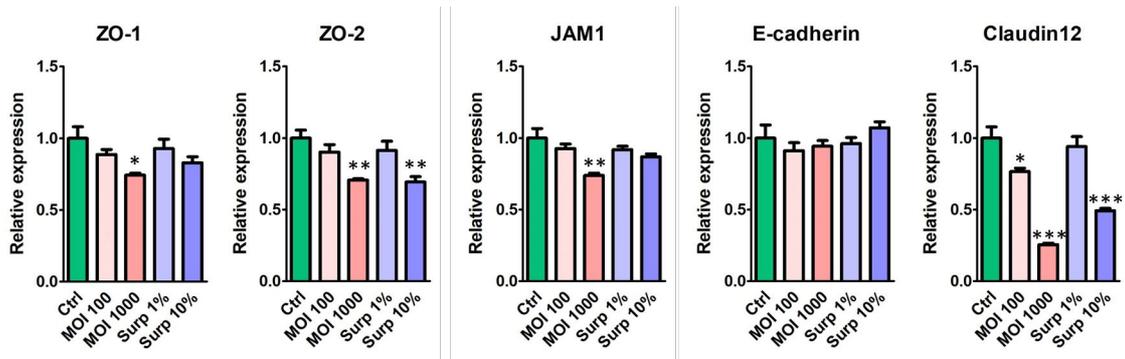


< FITC 蛍光標識デキストラン透過性測定 >



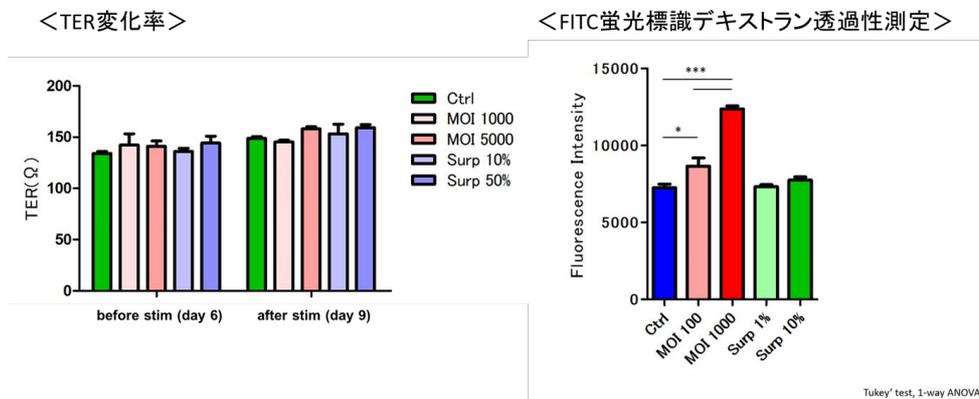
(1)-

培養した Caco-2 へ *P. gingivalis* 菌体 (MOI=100, 1000) または培養上清 (1%, 10%) にて刺激し、接着分子における遺伝子発現を解析した。濃度依存的に遺伝子発現の低下を認めたと、高濃度の菌体刺激でなければ有意な変動を認めなかった。



(1)-

Transwell に播種した Caco-2 に対し、*P. gingivalis* 菌体 (MOI=100, 1000) または培養上清 (1%, 10%) にて刺激し、TER 電気抵抗値測定、FITC 蛍光標識デキストラン透過性測定を行った。TER はいずれの刺激においても変動を認めなかった。FITC 蛍光標識デキストラン透過性測定にて菌体刺激では濃度依存的な透過性亢進を認めた

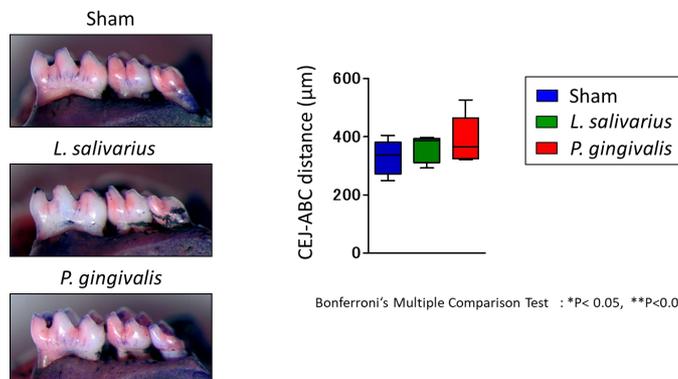


P. gingivalis 単独では上皮細胞における物理的バリア機能に及ぼす影響はそれほど大きくないことが示唆された。

(2)-

Germ-free 環境下にて上記条件下で *P. gingivalis* 口腔投与を行い、*P. gingivalis* が全身に与える影響を解析した。

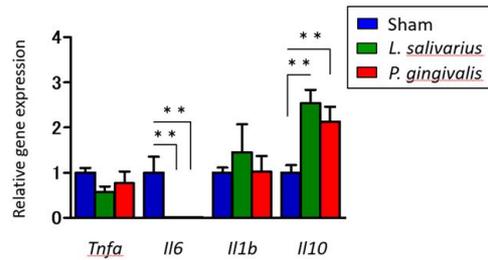
各群の歯周炎の重症度を評価するため、下顎骨歯槽骨吸収の測定を行った。各群の下顎第一臼歯近心のセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの距離を測定したところ、群間で有意差は認められなかった。Germ-free 環境では、*P. gingivalis* 口腔投与により歯槽骨吸収は惹起されなかった。



Bonferroni's Multiple Comparison Test : *P< 0.05, **P<0.01

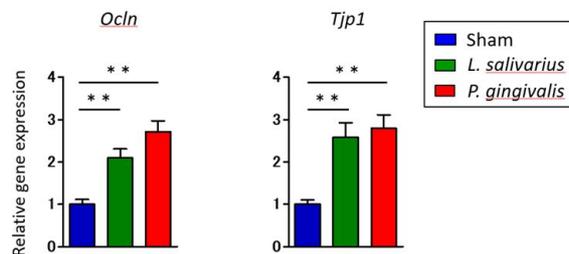
(2)-

Germ-free 環境下で *P. gingivalis* 口腔投与が歯肉組織の炎症に与える影響を検証するため、歯肉組織の遺伝子発現解析を行った。Sham 群と比較して、*L. salivarius* 群・*P. gingivalis* 群の歯肉 IL-6 遺伝子発現の減少、IL-10 遺伝子発現の増加が認められたが、*P. gingivalis* 群と *L. salivarius* 群で変動は認められなかった。



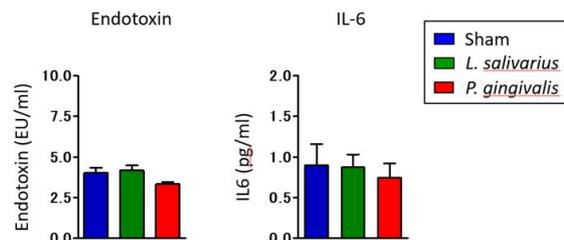
(2)-

P. gingivalis 口腔投与が腸管バリア機能に与える影響を検証するため、各群の腸管 Tight junction protein の遺伝子発現解析を行った。Sham 群と比較して、細菌投与群の腸管タイトジャンクションタンパク遺伝子の発現増加を認めたが、*P. gingivalis* 群と *L. salivarius* 群で変動は認められなかった。



(2)-

Germ-free 環境では、*P. gingivalis* 口腔投与による血清 Endotoxin レベル、IL-6 レベルへの影響は認められなかった。



これまでに、SPF 環境においては *P. gingivalis* 口腔投与により歯肉の炎症、歯槽骨吸収が生じること、嚥下された *P. gingivalis* が腸内細菌叢の変動を介して、腸管免疫応答に影響することで、関節炎症状が重症化すること、嚥下された *P. gingivalis* が腸内細菌叢を変動させ、腸管バリア機能に影響することで、内毒素血症及び全身性の炎症を誘導することが報告されている。一方本研究では、Germ-free 環境において、*P. gingivalis* 口腔投与による歯肉の炎症、歯槽骨吸収、腸管バリア機能、血清 Endotoxin レベルへの影響を認めなかった。

以上より、*P. gingivalis* 自体が腸管へ直接的に影響を及ぼすのではなく、腸内細菌叢バランスの変動を惹起することで腸管透過性が亢進され、全身に影響が及ぶことが示唆された。

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。