

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11982

研究課題名(和文)母体の歯周病感染が引き起こす胎児発育障害および成長後の耐糖能異常

研究課題名(英文) Maternal periodontal disease induce fetal failure and postnatal glucose intolerance

研究代表者

片桐 さやか (Katagiri, Sayaka)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60510352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎と早産・低体重児出産の結果との間には相関が認められているが、そのメカニズムは未だ不明である。本研究の目的は、Porphyromonas gingivalis(Pg)感染が出産に与える影響を明らかにすることである。ヒトを対象とした研究において、血清中の抗Pg-IgGサブクラス1の量は切迫早産に関連し、抗Pg-IgGサブクラス4の量は低体重児出産に関連することが明らかになった。Pgの静脈注射により、妊娠Slc:ICRマウスに菌血症を誘発することで菌血症モデルマウスを作成した。特に妊娠後期におけるPg感染は、低体重児出産および胎盤・臍帯における炎症を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産・低体重児は新生児の疾病罹患率、死亡率を増加させる有害な病態である。また、胎児発育不全は出生後の予後が不良となることもあり、周産期死亡率や精神発達遅滞の発症率も高く、成人後も疾病罹患率が高いなど軽視できない病態である。

本研究はP. gingivalis感染が低出生体重児出産を引き起こすことヒトおよびマウスモデルで示した点が非常に興味深く、歯周病が早産・低体重児出産に影響を及ぼすメカニズム解明の一助となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Growing evidence indicates an association between periodontitis and delivery outcome; however, the mechanism is unclear. This study aimed to investigate the influence of Porphyromonas gingivalis (Pg) infection on delivery outcome.

In the human study, lower anti P. gingivalis IgG 1 amounts are related to threatened preterm birth, while higher anti P. gingivalis IgG and IgG 4 are related with small for gestational age in threatened preterm birth.

A bacteremia model mouse was created by intravenous injection of Pg to pregnant Slc: ICR mice. Pg infection during the third trimester caused low birth weight and inflammation in the placenta and umbilical cord.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：歯周病 妊娠

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は早産・低体重児出産にも影響を及ぼすと考えられているが、近年、早産・低体重で生まれた子は、その後の成長で急激な体重増加がおこり、将来的に耐糖能異常、脂質代謝異常、そして糖尿病を発症するリスクが高い¹ことが報告されている。すなわち、歯周病の存在は、母胎に影響し低体重児の出産を引き起こすだけでなく、その子の成長後の糖尿病の発症にも影響をおよぼす可能性があるといえる。

胎児は子宮内の羊水中で成長するため、羊水・羊膜への細菌感染は早産や胎児発育不全の原因となり得る。歯周病により歯肉から出血が認められる状態では、口腔内の歯周病原細菌は血流にのり菌血症が生じるが、これら歯周病原細菌がヒトの母体羊水から検出されたとの報告がある。また、歯周病による持続的な慢性炎症は、PGE₂などの炎症性物質の産生に寄与することで出産に影響している可能性がある。

私たちはこれまでに、東京医科歯科大学大学周産女性診療科を受診中の患者に対して口腔内の状態と出産結果との関連を調べた。その結果、早産の妊婦から代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* が有意に高い頻度で検出されたこと、また歯周病原細菌に対する抗体のひとつが習慣性流産・血栓症を引き起こす抗リン脂質抗体症候群に類似した症状を引き起こす可能性を報告した¹。

2. 研究の目的

歯周病と早産・低体重児出産および母体の歯周病感染が子の生涯の健康に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) TMDU 母子コホート(東京医科歯科大学医学部附属病院に通院中の妊婦とその新生児を対象としたコホート)被験者のうち、切迫早産の妊婦 47 名、健常な妊婦 48 名、計 95 名を対象とした。歯周組織検査として、プロービングポケット深さ (PPD)、クリニカルアタッチメントレベル、プロービング時の歯肉からの出血 (BOP) を測定した。歯周病原細菌量測定として、ペーパーポイント法により、被験者の最深の PPD を示す歯周ポケットの 4 つの部位からプラークを採取した。また無刺激唾液も同時に採取し、これらをサンプルとして Taqman プローブを用いた quantitative PCR (qPCR) 法により、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* の量を測定した。末梢静脈血を採取し血清分離を行った後、*P. gingivalis* に対する IgG 抗体価および *P. gingivalis* に対する IgG 抗体における IgG1-4 のサブクラス量を ELISA 法にて測定した。

(2) マウス (Slc: ICR) を用いた歯周病原細菌感染が母体および仔に与える影響の検討

Slc: ICR マウスを妊娠 1~18 日目に生理食塩水 100 μ L を 1 日 1 回静脈注射するコントロール群 (C0)、*P. gingivalis* を妊娠 1 日目のみ 1.0×10^8 CFU 静脈注射する群 (GD1)、妊娠 15 日目のみ静脈注射する群 (GD15)、および妊娠 1 日目~18 日目まで毎日静脈注射する群 (ED) の 4 群に無作為に分けた。妊娠した母マウスの体重、妊娠期間、および仔の出生体重を記録した。妊娠 15 日目において、マウスはイソフルラン麻酔下で胎仔数を判定し、妊娠状態を確認した。また、胎仔の体重を評価し、妊娠 17 日目で血漿、胎盤および臍帯を採取した。組織サンプルは -80 $^{\circ}$ C で保存した。

インターロイキン (IL) -10、IL-17A、IL-6、IL-4、IL-2、腫瘍壊死因子 (TNF) およびインターフェロン (IFN) - γ を含む血漿中のサイトカインレベルを、BD 社のサイトメトリックビーズアレイを用いて測定した。また、ELISA 法にて 450 nm での吸光度測定を行い、*P. gingivalis* に対する抗体価を測定した。mRNA 発現の解析は qPCR 法 (インターカレーター法) にて行った。組織を粉砕した後、胎盤および臍帯から全 RNA を抽出し、500 ng の RNA で逆転写 PCR を行った。*P. gingivalis* の DNA 検出は、胎盤および臍帯から DNA を抽出し、qPCR (TaqMan プローブ法) を行った。

臍帯の遺伝子発現の網羅的解析は、Agilent 社の SurePrint G3 Unrestricted Gene Expression 8 \times 60K Microarray を用いて行った。全 RNA を C0 および ED 群のマウスの臍帯から抽出し、ラベル化 cRNA を生成した。その後、cRNA をハイブリダイズさせ、蛍光シグナルを検出した。マイクロアレイデータは、R ソフトウェアを使用して 75 パーセントアイル正規化および log₂ 変換を行った。発現変動遺伝子 (DEG) の同定は Limma Bioconductor を用いて行った。統計的有意性は、Benjamin and Hochberg の誤発見率 (FDR) によって評価した。DEGs は、FDR $q < 0.05$ および $|\text{fold-change}| > 2$ を満たすものと定義した。

組織学的評価は、パラフィン切片のヘマトキシリンおよびエオシン (HE) 染色にて行った。胎盤試料を 4 %パラホルムアルデヒドで 24 時間固定し、パラフィンに包埋した。続いて厚さ 5 μ m に薄切し、HE で染色した。定量は、Adobe Photoshop CC 2017 ソフトウェアを用いて、各サンプル毎に 5 ヶ所の切片における海綿状栄養膜細胞の面積を求め、解析を行った。

データ分布の評価は Shapiro-Wilk 検定を用いた。2 群比較はスチューデント t 検定を用いた。C0 群に対する多群比較にはボンフェローニ補正によるピアソンのカイ 2 乗検定またはダネット検定に続く一元配置分散分析を使用した。抗 Pg-IgG 抗体価の評価には一元配置分散分析、続いて複数群比較にはボンフェローニ補正による t 検定を行った。データを分析は SPSS v.22.0 ソフトウェアを用いた。統計的有意差は $p < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) 切迫早産の妊婦では、血清中の抗 *P. gingivalis* IgG サブクラス 1 の量が健康妊婦と比較して有意に低値を示した。47 名の切迫早産妊婦のうち、14 名が低体重児出産であった。低体重児出産であった妊婦では、PPD、CAL、PPD5mm 以上の割合、プラーク中の *P. gingivalis* の量、抗 *P. gingivalis* 抗体価および抗 *P. gingivalis* IgG サブクラス 4 は切迫早産であったが正期産であった妊婦よりも有意に高値を示した。さらに、多重ロジスティック回帰分析により、プラーク中の *P. gingivalis* 検出の有無および胎盤重量が切迫早産における低体重児出産と有意に関連していることが明らかになった。受信者動作特性曲線分析ではプラーク中の *P. gingivalis* が、86.45 コピー以上が切迫早産妊婦における低体重児出産の予測ができること(感度:0.786、特異度:0.727、AUC 0.792)を示した。本研究結果は、参考文献 2 に掲載された。

(2) 妊娠期間は *P. gingivalis* 感染の有無に関わらず、全て正期産であった。ED 群および GD15 群の平均出生体重は、C0 群よりも有意に低かったが、C0 群と GD1 群の間では、仔マウスの体重に有意差は認められなかった。妊娠 17 日目における ED 群の胎子の体重は、C0 群よりも低値を示した。妊娠マウスの体重および妊娠 17 日目における胎児生存率には有意差は認められなかった。妊娠 17 日目における血漿中の IL-10、IL-17A、TNF、INF- γ 、IL-6、IL-4 および IL-2 は検出限界以下となり、*P. gingivalis* の静脈注射が強い炎症応答を誘発しなかったことを示したが、血漿中の抗 *P. gingivalis* IgG 抗体の有意な増加は ED 群および GD1 群で認められた。抗 *P. gingivalis* IgG 抗体は GD1 群と比較して ED 群で劇的に増加したが、TaqMan プローブを用いた qPCR において胎盤または臍帯のいずれにおいても *P. gingivalis* は検出されなかった。持続的な *P. gingivalis* 感染は、胎盤における TNF および IL-6 の mRNA 発現増加をもたらした。妊娠 15 日目に *P. gingivalis* を注射した妊娠マウスは、胎盤における IL-6 および HIF-1 の mRNA 発現の上昇を示した。GD1 群と C0 群の間の胎盤における TNF、IL-6、および HIF-1 の mRNA レベルには有意差な差は認められなかった。臍帯では、*P. gingivalis* 感染による TNF および IL-6 の mRNA 発現の増加傾向が認められた。HIF-1 の mRNA 発現は、C0 群と比較して ED 群のマウスの臍帯で増加した。*P. gingivalis* 感染後の臍帯における遺伝子発現解析のため、C0 群および ED 群のマウスについて DNA マイクロアレイによる解析を行った。DEGs は存在しなかったが、 $|\text{fold-change}| > 2$ かつ $p < 0.05$ を示した 104 の遺伝子に注目して解析を行った。抽出された遺伝子のうち、炎症、出産、および胎児の成長に関連するものに焦点を当て qPCR を行ったところ、ED 群マウスの臍帯における ORM1、MGL2、RPS6KA3、TRIM15 の mRNA の発現上昇が認められた。胎盤切片の HE 染色においては、ED 群の胎盤の海綿状栄養膜細胞層に顕著な変化が観察されたが、迷路部と脱落膜には明らかな変化は認められなかった。海綿状栄養膜細胞層中の海綿状栄養膜細胞の割合は ED 群のマウスでは C0 群と比較して有意に減少した。本研究結果は参考文献 3 に掲載された。

参考文献

1. Ye C, Katagiri S, Miyasaka N, Bharti P, Kobayashi H, Takeuchi Y, Momohara Y, Sekiguchi M, Takamine S, Nagasawa T, Izumi Y. The anti-phospholipid antibody-dependent and independent effects of periodontopathic bacteria on threatened preterm labor and preterm birth. Archives of gynecology and obstetrics. 288(1): 65-72. 2013.
2. Ye C, Kobayashi H, Katagiri S, Miyasaka N, Takeuchi Y, Kuraji R, Izumi Y. The relationship between the anti-*Porphyromonas gingivalis* immunoglobulin G subclass antibody and small for gestational age delivery: a longitudinal study in pregnant Japanese women. International Dental Journal. 2020 Mar 17. doi: 10.1111/idj.12548.
3. Udagawa S, Katagiri S, Maekawa S, Takeuchi Y, Komazaki R, Ohtsu A, Sasaki N, Shiba T, Watanabe K, Ishihara K, Sato N, Miyasaka N, Izumi Y. Effect of *Porphyromonas gingivalis* infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight. Acta Odontologica Scandinavica. 76(6):433-441. 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohsugi Yujin, Aoki Akira, Mizutani Koji, Katagiri Sayaka, Komaki Motohiro, Noda Masahiro, Takagi Toru, Kakizaki Sho, Meinzer Walter, Izumi Yuichi	4. 巻 12(3)
2. 論文標題 Evaluation of bone healing following Er:YAG laser ablation in rat calvaria compared with bur drilling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biophotonics	6. 最初と最後の頁 e201800245-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbio.201800245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki Naoki, Katagiri Sayaka, Komazaki Rina, Watanabe Kazuki, Maekawa Shogo, Shiba Takahiko, Udagawa Sayuri, Takeuchi Yasuo, Ohtsu Anri, Kohda Takashi, Tohara Haruka, Miyasaka Naoyuki, Hirota Tomomitsu, Tamari Mayumi, Izumi Yuichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis Injection Aggravates Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Disrupts Glucose/Lipid Metabolism, and Alters Gut Microbiota in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 2470-2470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2018.02470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohtsu Anri, Takeuchi Yasuo, Katagiri Sayaka, Suda Wataru, Maekawa Shogo, Shiba Takahiko, Komazaki Rina, Udagawa Sayuri, Sasaki Naoki, Hattori Masahira, Izumi Yuichi	4. 巻 25(3)
2. 論文標題 Influence of Porphyromonas gingivalis in gut microbiota of streptozotocin-induced diabetic mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 868-880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.13044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aung Nay, Aoki Akira, Takeuchi Yasuo, Hiratsuka Koichi, Katagiri Sayaka, Kong Sophannary, Shujaa Addin Ammar, Meinzer Walter, Sumi Yasunori, Izumi Yuichi	4. 巻 37
2. 論文標題 The Effects of Ultraviolet Light-Emitting Diodes with Different Wavelengths on Periodontopathic Bacteria In Vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery	6. 最初と最後の頁 288 ~ 297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/photob.2018.4514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komazaki R, Katagiri S, Takahashi H, Maekawa S, Shiba T, Takeuchi Y, Kitajima Y, Ohtsu A, Udagawa S, Sasaki N, Watanabe K, Sato N, Miyasaka N, Eguchi Y, Anzai K, Izumi Y.	4. 巻 12;8(1)
2. 論文標題 Author Correction: Periodontal pathogenic bacteria, <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-23000-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Udagawa S, Katagiri S, Maekawa S, Takeuchi Y, Komazaki R, Ohtsu A, Sasaki N, Shiba T, Watanabe K, Ishihara K, Sato N, Miyasaka N, Izumi Y.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Effect of <i>Porphyromonas gingivalis</i> infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Odontol Scand.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1080/00016357.2018.1426876.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Katagiri S, Komazaki R, Takahashi H, Maekawa S, Shiba T, Takeuchi Y, Kitajima Y, Ohtsu A, Udagawa S, Sasaki N, Watanabe K, Sato N, Miyasaka N, Eguchi Y, Anzai K, Izumi Y.
2. 発表標題 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism.
3. 学会等名 The 103rd Annual Meeting of American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 宏和 (Takahashi Hirokazu) (20607783)	佐賀大学・医学部・講師 (17201)	