

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17293

研究課題名(和文) 歯周病原細菌由来内毒素による自己免疫性ぶどう膜炎発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of autoimmune uveitis caused by endotoxin derived from periodontopathic bacteria

研究代表者

植原 治 (UEHARA, Osamu)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：00709248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌のLPSを投与したマウス眼球のRNA-seqのデータから，Hist1h2ad、Slit3、Mmp3などの遺伝子発現の低下が認められた。Sag、Krt12、Vps13c、Rn45s、Celsr3、4930470H14Rik、Pot1bなどの遺伝子発現の上昇が認められた。また、Hedgehog signaling pathwayおよびLysosomeが減少し、VEGF signaling pathwayが上昇した。しかし、これまでに報告のあるベーチェット病に関連する遺伝子発現の変化およびパスウェイは認められなかった。これらの遺伝子はベーチェット病以外の眼疾患に影響がある可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベーチェット病は口腔内アフタ性潰瘍、眼のぶどう膜炎、皮膚症状、外陰部潰瘍を4大主症状とする難治性炎症性全身疾患である。口腔領域からのアプローチを考えた時に、口腔疾患に起因する病原性細菌による影響について検討する必要がある。疾患の環境的発症要因が明らかになり、ベーチェット病発症高リスク者においては発症前から事前介入あるいは疾患予防に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The RNA-seq data of the eyeball of mice treated with LPS of periodontopathic bacteria showed decreased expression of genes such as Hist1h2ad, Slit3, Mmp3, Col14a1 and Chad while increased gene expression of Sag, Krt12, Vps13c, Rn45s, Celsr3, 4930470H14Rik, Pot1b, Epha2, Miat, Eps811 and lfi2712a was observed. On analysis of signaling pathways, the Hedgehog signaling pathway and lysosome pathway decreased while the VEGF signaling pathway increased in the LPS group as compared to the control. However, no changes in gene expression or pathways associated with Behcet's disease were observed. This suggests that these genes may affect eye diseases other than Behcet's disease.

研究分野：予防歯科学

キーワード：ベーチェット病 歯周病原細菌 RNA-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性ぶどう膜炎であるベーチェット病は、1937年トルコのベーチェットによって提唱された疾患で、多臓器侵襲性の難治性の病気である。口腔粘膜のアフタ性潰瘍、眼のぶどう膜炎、皮膚症状、外陰部潰瘍を主症状とし、急性炎症性発作を繰り返すことを特徴とする。地域的な分布を見てみると、世界的にはシルクロードに沿った帯状の地域に分布を示す。本症での失明率の高いことや、腸管型や血管型、神経型などの特殊型ベーチェット病の死亡が少なからずみられる。病因は未だ不明であるが、疾患の発症には遺伝要因と環境要因(外因)の双方が重要であると考えられている。ベーチェット病ではHLA-B51の陽性率が高く、発病にHLA-B51そのもの、あるいはこれに連鎖する素因の役割が重視されている。

2010年、日本およびトルコ・米国共同研究チームが全ゲノム解析(GWAS)によりIL23R/IL12RB2、IL10が疾患感受性遺伝子であることが報告され、また、IL-10の産生不全による炎症制御低下がベーチェット病の炎症増幅につながっている可能性を示している。その後、さらに詳細な解析が加わり、ERAP1、CCR1、STAT4、KLRC4、TLR4、NOD2、MEFVなどの疾患感受性遺伝子が次々と同定され、いずれも免疫応答や炎症に関わる分子をコードしていることが確認されている。

一方、発症には外因も重要で、遺伝要因に病原微生物をはじめとした外因が関わり、自己免疫異常や好中球機能過剰をはじめとした自然免疫系の異常を引き起こし、発症にいたると考えられている。微生物の認識に関わるTLR4、NOD2やNK細胞受容体であるKLRC4が疾患感受性遺伝子として同定されたことも、疾患への微生物の関与を指示する所見である。これまでの報告では、エンドキシン誘導実験的ぶどう膜炎(EIU、*S. typhimurium*由来LPS)における虹彩組織中のmiRNAの発現解析、機能解析単球やマクロファージに発現しているTLR4からの刺激によって誘導されたmiRNA-146がNF-κBの細胞内シグナルを抑制することで炎症反応を制御することが明らかになっている。

抜歯や扁桃炎があるとしばしば症状の増悪をみることがあることから、口腔細菌が病因に関与しているのではないかと考えられ、特にプラークの初期付着に関与している連鎖球菌(*S. sanguinis*)の役割が注目されてきたが、調査対象数や口腔細菌の培養方法などに問題点があり、特定の原因の同定には至っていない。単純な遺伝疾患や感染症ではなく、遺伝要因と環境要因の両者の相互作用が病気の成り立ちに重要と考えられる。

2. 研究の目的

近年、歯周炎の進行によって肺炎、心疾患、糖尿病、高血圧など種々の基礎疾患が増悪することが報告されている。口腔細菌による基礎疾患の増悪についての報告がある一方で、ベーチェット病などのぶどう膜炎との関連性に十分な知見があるとはいえない。今後、ベーチェット病における外因としての口腔細菌の具体的な関与について解明する必要がある。メカニズムの解明は治療のみならず、ベーチェット病の進行の予防につながる可能性がある。すなわち、口腔保健管理

によって一次予防や二次予防対策を講じることが可能となり、疾病予防や早期発見につながる
と考えられる。

本研究では、歯周病原細菌由来の内毒素（LPS）によるペーチェット病などのぶどう膜炎の発症
や進行のメカニズムを明らかにするとともに、将来的には予防および適切な治療法開発に結び
つけることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* 由来 LPS の抽出

P. gingivalis ATCC33277 株を 37.0 mg/ml の濃度の Brain Heart Infusion, 15.0 mg/ml の濃度
の AGAR, 5.0 μg/ml の濃度の Hemin, 4.0 μg/ml の濃度の Menadione と 5.0%羊脱繊維血液を加
えた血液寒天培地を用いて 37℃, 嫌気条件 (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) にて培養した後, 選択し
たコロニーを 37.0 mg/ml の濃度の BHI, 5.0 μg/ml の濃度の Hemin と 4.0 μg/ml の濃度の
Menadione を加えた液体培地にて 37℃ で 3 日間嫌気培養した。培養後, 菌体を遠心 (15,000 rpm,
15 分) により回収した。PBS で 3 回洗浄した後, ホルマリンにて死菌処理を行い, 凍結乾燥させ
た。凍結乾燥させた菌体から, ホットフェノール法にて LPS を抽出した。

(2) 動物

実験動物には, C57BL/6J 雄性マウスを用い, 北海道医療大学動物実験委員会の承認の後実施した。
マウスは, 透明なケージで 12 時間の明/暗サイクル環境下で標準的な飼料および水を自由に与
え, 特定の病原体のない条件で飼育した。

(3) *P. gingivalis* 由来 LPS の投与

P. gingivalis 由来 LPS (ATCC 33277 株) を Normal saline (NS) に溶解し, 5.0 mg/kg の濃度
で腹腔内注射した (以下, LPS 投与群, Harada et al., 2018)。対照群 (n=4) には実験群と同
期間で同量の NS を腹腔内注射した。眼球への影響を検証するため, 8-10 週齢の C57BL/6J 雄性
マウスに *P. gingivalis* 由来 LPS を 3 日毎に 30 日間投与し, 最終投与より 3 日後に深麻酔下で
頸椎脱臼によりマウスを屠殺した。眼球を摘出し, 一方を 10%中性緩衝ホルムアルデヒド溶液
で 24 時間固定し, 他方を RNA 抽出のため RNA later に浸漬した。

(4) 組織学的観察

眼球の組織学的変化を観察するため, 摘出した眼球について Hematoxylin eosin (H&E) 染色を
行った。眼球を 10%中性緩衝ホルマリン溶液で 24 時間浸漬固定の後, 通法に従いパラフィン包
埋を行った。その後, Microtome で厚さ 5.0 μm に薄切し, キシロールによる脱パラフィンの後,
H&E 染色を行った。

(5) RNA-seq による網羅的解析

眼球より RNeasy Mini キットを用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA の品質を,
Bioanalyzer にて評価した。次世代シーケンサー HiSeq 4000 を用い RNA-seq を行った。得られた
fastq ファイルからマッピングを行い, マッピングデータより発現量の正規化を行った後, トラ
ンスクリプトーム解析を行った。

(6) 再現性の確認

発現上昇，低下が認められた遺伝子について，定量的 real-time reverse transcription polymerase chain reaction 法により解析した．Total RNA を NanoDrop で測定し，2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度に調整し，ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて逆転写反応を行い complementary DNA (cDNA) を合成した．得られた cDNA は，Primer3Plus を用いて設計したプライマーおよび KAPA SYBR FAST qPCR Mix を用いて LightCycler Nano により，qRT-PCR 法を行った．PCR 条件は，50 で 2 分間，95 で 10 分間の初期インキュベーションを行なった後，95 で 15 秒間の熱変性，60 で 1 分間のアニーリングを 40 サイクル行った．リファレンス遺伝子として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い，Cq 法により，各 mRNA の相対的発現レベルを比較した．

(7) 生物学的解釈

Counts data を iDEP (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>) にアップし KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) パスウェー解析を行った．

4. 研究成果

(1) 組織学的観察

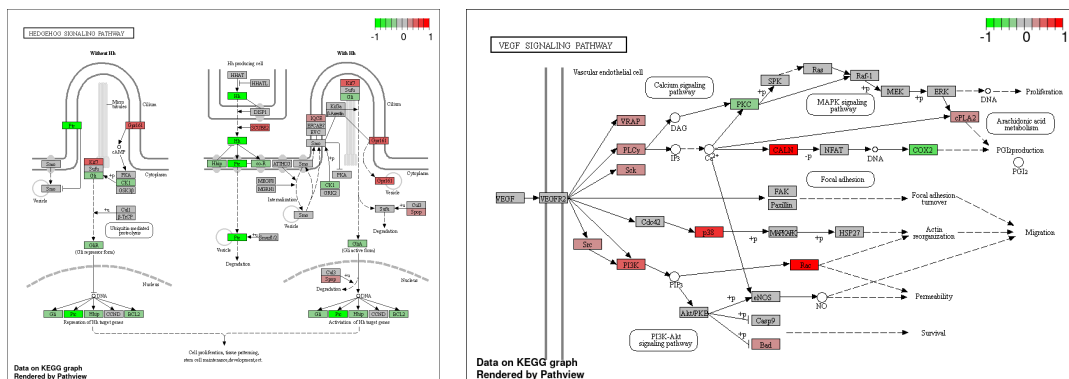
H&E 染色結果から角膜上皮厚などの所見は認められなかった．

(2) トランスクリプトーム解析

コントロール群と比較して *P. gingivalis* の LPS 投与群では *Hist1h2ad*, *Slit3*, *Mmp3*, *Col14a1*, *Chad* などの遺伝子発現の低下が認められた．*Sag*, *Krt12*, *Vps13c*, *Rn45s*, *Celsr3*, *4930470H14Rik*, *Pot1b*, *Epha2*, *Miat*, *Eps8l1*, *Ifi27l2a* などの遺伝子発現の上昇が認められた．

(3) パスウェー解析

コントロール群と比較して，*P. gingivalis* の LPS 投与群では，Hedgehog signaling pathway および Lysosome が減少し，VEGF signaling pathway が上昇した (図)．



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------