

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19044

研究課題名（和文）歯周病原細菌由来LPSに着目した、歯周病によるCOPD重症化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of COPD aggravation due to periodontal disease focusing on LPS derived from periodontopathic bacteria

研究代表者

廣松 亮（Hiromatsu, Ryo）

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：80757914

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）：COPD患者の肺胞組織ではマクロファージや好中球が浸潤している状態であり、そこへ気道から到達した歯周病原細菌のLPS刺激が加わることでCOPDの病状を重症化させる可能性がある。

C57BL/6実験用マウスを用いて研究を行った。COPDモデルマウスを作製するために、マウスの肺胞内にエラスターゼを投与した。歯周病原細菌のLPS刺激によって肺胞壁の破壊や気腔の拡大は増加の傾向にはあったが、実験観察期間中にマウスが死亡するなど、トラブルも頻発し、プロトコール通りの実験が遂行できない期間もあった。今後は投与期間や方法、濃度などを正確に算出することが課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喫煙に曝露された肺胞組織ではマクロファージや好中球が浸潤している状態であり、そこへ気道から到達した歯周病原細菌のLPS刺激が加わることでCOPDの病状を重症化させる可能性がある。歯周病によるCOPD重症化メカニズムを明らかにすることは、COPD重症化の予防へとつながり、効果的な予防方法を示せると考えている。

研究成果の概要（英文）：Macrophages and neutrophils are infiltrated in the alveolar tissue of COPD patients, and LPS stimulation of periodontopathic bacteria arriving from the respiratory tract may aggravate the condition of COPD. Studies were conducted using C57BL / 6 mice. To generate COPD model mice, elastase was administered into the alveoli of the mice. Although the destruction of the alveolar wall and the expansion of the air cavity tended to increase due to LPS stimulation of periodontopathic bacteria, troubles such as the death of mice occurred frequently during the experimental observation period. In the future study, it has become an issue to accurately calculate the administration period, method, concentration, etc.

研究分野：歯周病学

キーワード：COPD 歯周病原細菌 LPS

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究の開始当初の背景

歯周病原細菌は、口腔内の病巣から容易に血管内に侵入し全身へと循環する。循環器の場合、アテローム性動脈硬化症と歯周病原細菌との関連がこれまでも多数報告されており、歯周病菌やその菌体成分などが、直接、血管に障害を与える作用に加え、炎症の起きた歯周組織で産生される炎症性サイトカイン（IL-1、TNF- α など）が血流を通じて心臓の血管に動脈硬化を増悪し、狭心症や心筋梗塞へとつながると考えられている。血液循環の過程で右心室から流れる血流は、肺でのガス交換を経て左心房へと流れる。血液の心臓への循環の過程で、通過点である肺の血管系においても歯周病原細菌およびその成分による悪影響が考えられる。

慢性閉塞性肺疾患(COPD) は世界の死亡原因の第 4 位であり、2001 年に発表された大規模疫学調査研究である NICE Study (Nippon COPD Epidemiology Study) により、日本にも約 530 万人の患者がいることが明らかとなった。歯周病患者における COPD の危険率は、Hayes ら (1998) は 1.77、Scannapiero(2001)らは 1.45 と報告しており、さらに、Hyman and Reid(2004) は、喫煙者かつ歯周病患者では、COPD の危険率が健常者と比較して 3.71 と上昇し、歯周病と COPD の強い関係性が報告されている。しかし、歯周病による COPD の重症化メカニズムについてはほとんど不明のままである。

COPD 患者の病理組織学的特徴としては、活性化肺胞マクロファージが放出するプロテアーゼ(MMP-1、9、12)による肺胞壁の破壊（肺の弾性線維の断裂）が挙げられる(A.Nagai.et al. 2006)。慢性的な喫煙に曝露された肺胞組織ではマクロファージや好中球が浸潤している状態であり、そこへ口腔内から血中を介して到達した歯周病原細菌の刺激が加わることで COPD の病状を重症化させる可能性がある。

歯周病原細菌はグラム陰性細菌であり、細胞壁成分であるリポポリサッカライド(LPS)は、様々な生理活性を有することが知られている。細菌感染により好中球が活性化すると、セリンプロテアーゼの 1 種である好中球エラスターゼが放出される。好中球エラスターゼはプロテアーゼ活性化受容体-2 (PAR-2)を介してシグナルを伝達し、肺胞マクロファージからプロテアーゼ（MMP-1、9、12）産生を誘導する。LPS シグナルを直接細胞内に伝える受容体は Toll 様受容体-4 (TLR-4)であるが、LPS は PAR-2 シグナルを増強することから(Chi L. et al. 2001)、PAR-2 と LPS 受容体は cross-talk していると考えられている。そして近年、PAR-2 と TLR-4 が共役していること、さらに PAR-2KO マウスおよび TLR-4KO マウスのマクロファージにおいて、LPS 反応性が低下したことから、PAR-2 と TLR-4 は互いにシグナルを増強していることが示唆された(Rallabhandi P. et al. 2008)。

歯周病原細菌としては、*Porphyromonas gingivalis* (Pg.)、*Tannerella forsythensis* (T.f.)、*Treponema denticola* (T.d.)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.)などが知られている。その中でも歯周病との関連が強いと言われている Pg.の LPS は、TLR-4 アンタゴニストとして作用し、TLR-2 活性をもつという報告もあり、LPS の反応性がその他の歯周病原細菌と異なっているという報告もある(Yoshimura.et al. 2004)。このことより歯周病原細菌の菌株によっても COPD への関与に違いが生じることが考えられる。

2.研究の目的

本研究の目的は、歯周病による慢性閉塞性肺疾患（COPD）の重症化メカニズムを解明することである。COPD は肺の閉塞性疾患であり、多くの高齢者が罹患し寿命短縮とともに QOL の低下を招く。その原因としては喫煙、慢性的な炎症、細菌感染などがあり、歯周病患者では、口腔の歯周病原細菌が血中を介して全身へと循環すること、また喫煙は COPD と歯周病の双方のリスク因子であることより、肺における COPD に歯周病が関与することが示唆されている（Hyman.et al. 2004）。しかしこれまでの研究は、疫学調査により COPD と歯周病との関連を示唆している報告がほとんどで、分子レベルでのメカニズムは不明のままである。申請者は本研究において、肺胞マクロファージがプロテアーゼを放出し肺胞壁を破壊する過程に着目し、歯周病原細菌が関与するメカニズムを解明することを目的とした。COPD に歯周病が関わるメカニズムを解明することは、歯周病治療が COPD 重症化の予防へとつながると考えている。

3.方法

C57BL/6 実験用マウスを用いて研究を行った。グループを 5 群とした。

1 群：PBS のみ

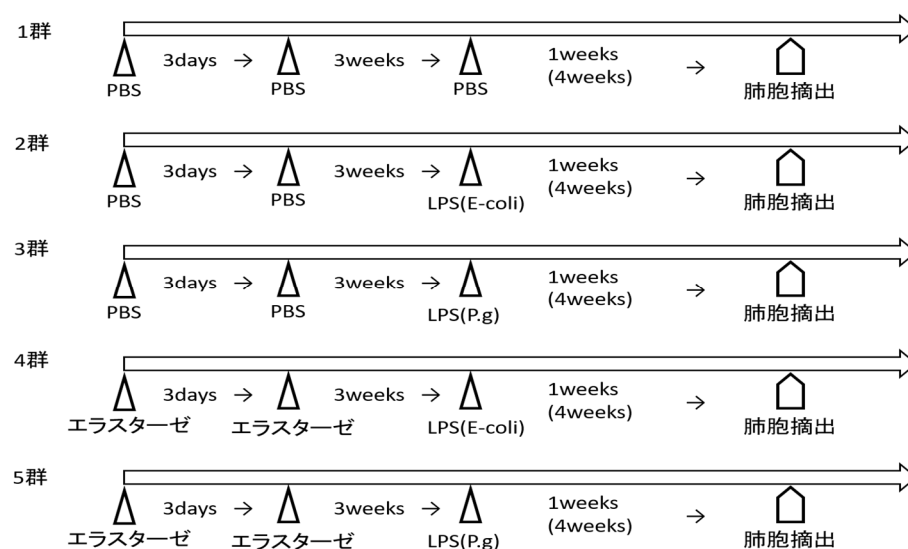
2 群：PBS + LPS(E-coli)

3 群：PBS + LPS(P.g)

4 群：エラスターゼ + LPS(E-coli)

5 群：エラスターゼ + LPS(P.g)

1 群につき 6 匹分のサンプルを用いた。COPD モデルマウスを作製するために、マウスの肺胞内にエラスターゼを直接投与した(5 群および 6 群)。直接投与の方法として、マウスを固定台に固定し、シリンジ式の小型噴霧器をマウスの気管内に挿入し、噴霧した。投与は 1 日目と 3 日目に同じ溶液を 2 度投与した。3 週間後に LPS を投与した。



投与終了 1 週後と 4 週後に肺胞を摘出し、肺胞壁の破壊の程度、気腔の拡大を評価した。

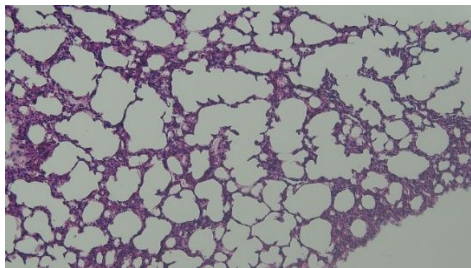
4. 研究の成果と考察

本実験計画は、動物実験に関わる様々な技術的な課題を克服した。実験計画の最終段階になってようやく解決した点もあり、科学研究費に申請していた実験期間は終了したものの、当初計画を達成すべく現在も実験を続けている。

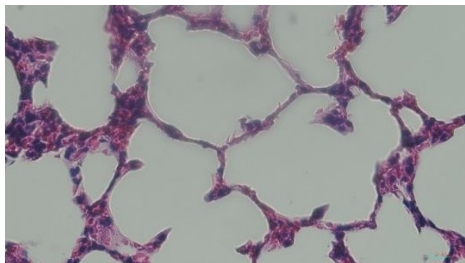
実験手技として最初に確立したものは、気管内への薬剤の噴霧である。夏目製作所の気管内噴霧スプレーを購入した。体外から LED ライトを声帯よりも下部に当て、声帯の間から漏れる光を頼りに確実にスプレー噴霧をすることが可能となった。ブタ脾臓から抽出されたエラストーゼと、*E. Coli* から採取した LPS は市販のものを購入した。また、*P.gingivalis* 由来の LPS はわれわれの研究室にて培養した菌を高熱処理後に乾燥粉末とし、LPS の力価を測定した。

我々のこれまでのマウスを使った動物実験では、腹腔内麻酔としてメドミジン、ミダゾラム、ブトルファノールを混合して使用してきた。しかしこの方法では、呼吸抑制が生じ、さらに咳嗽反射が低下するため、気管内に噴霧した薬液が原因となって、覚醒までの間にマウスが呼吸困難で死亡する事例が多発した。そこで、イソフルランによる吸入麻酔のみに切り替え、手技を素早くして術後覚醒を早める工夫をすることとした。当初の実験計画では、全ての病理組織データが揃う予定であったが、麻酔手技の変更が必要となったことから実験が計画通り進まなくなってしまった。このため現在も動物を再度購入して追加の再実験を行っている最中であり、結果が揃い次第、学会発表と学術雑誌への投稿を諮る予定である。

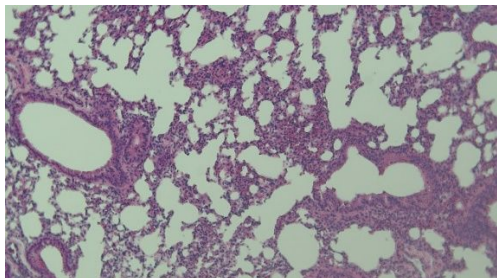
また、病理組織の作製に当たっては、当初は蛍光免疫染色をする予定であった。しかし、採取した肺をホルマリン固定し、凍害防止を目的としたショ糖浸漬して凍結標本を作ったが、コントロールにおいても組織破壊の程度は顕著であった。このため、肺胞のような微細な組織の検査においては、通常のパラフィン切片で行うしかないとの結論にいたった。本報告書では、パラフィン包埋後の HE 染色による結果の一部を示す。



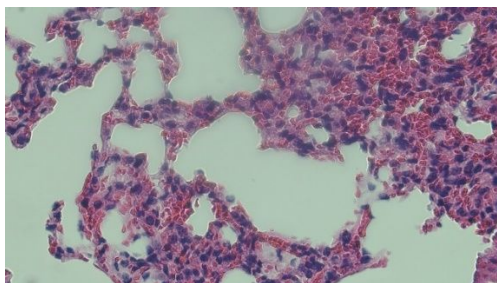
第3群 (×4) HE 染色 肺胞の破壊はほとんど認めない。



第3群(×40) HE 染色 強拡大としても肺胞の破壊はほとんど認めず、炎症性細胞浸潤もわずかであった。



第5群(×4) HE 染色 ところどころに肺胞壁の破壊と気腔の拡大が認められる。



第5群(×40) HE 染色 肺胞が破壊されて、若干肥厚している。炎症性細胞の浸潤も認められる。

第3群(生食+LPS)においては、肺胞壁の破壊はほとんど認めなかった。それに対して、第5群(エラスターゼ+LPS)では、所々に肺胞壁の破壊や気腔の拡大が認められたことから、歯周病原細菌 LPS が COPD 増悪に関与している可能性が示唆された。

5. まとめ

本研究は、歯周病による慢性閉塞性肺疾患(COPD)の重症化メカニズムを解明することを目的とした。エラスターゼによって惹起された肺の炎症に、歯周病原菌が作用することで肺胞壁の破壊を特徴とする組織変化が起こる可能性が示唆された。エラスターゼによる急性炎症の惹起はとそれに続く歯周病菌の LPS への暴露は、COPD 実験モデルとして有用である。COPD の発症メカニズムを詳細に解明することは、歯周病治療が COPD 重症化の予防へとつながると考えられる。今後、*P.gingivalis* の生菌を使うことによって、gingipain などの酵素による組織破壊の影響を調べることも視野に入れている。

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
---------	---------