

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17011

研究課題名（和文）歯周炎関連細菌が引き起こす多発性硬化症増悪化メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of progression of Multiple sclerosis by periodontitis associated bacteria

研究代表者

岡野 徳壽 (Okano, Tokuju)

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：70886663

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：臨床研究あるいは動物モデルを用いた研究から、歯周炎関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*, Pg) は自己免疫疾患の一つ多発性硬化症 (MS) を増悪化させることが示唆されている。本研究ではマウス骨髄由来マクロファージ (BMDMs) の RNA sequencing の解析結果から、TRIF の欠損に伴って HIF-1 α の遺伝子発現が低下し、同時に核移行が有意に減少することを見出した。さらに、TRIF 欠損マウスの BMDMs では *P. gingivalis* 感染によるインフラマソームの活性化が HIF-1 α 欠損時と同様に減少することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、長年議論されてきた歯周炎と MS に関する研究に大きなインパクトを与えることができる。また、増悪化メカニズムを理解することによって、歯周炎と MS を併発した患者さんのための新たな抗歯周炎-MS薬の開発へとつながることが予想される。さらに本研究は、多発性硬化症のみならず、歯科学において長年議論され続けている様々な歯周炎と自己免疫疾患、または歯周炎と全身疾患の連関メカニズムを解明する足掛かりとなっていくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Previous studies demonstrated that *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*, Pg), periodontitis associated bacteria can exacerbates Multiple Sclerosis (MS) in clinical study. In this study we investigated ROS production and TRIF expression level controls inflammasome activation under hypoxic condition by RNA sequencing analysis of bone marrow derived macrophages (BMDMs). Actually ROS inhibitor suppress the inflammasome activation by Pg infection in BMDMs. We also checked TRIF deficient BMDMs infected with Pg under normoxia and hypoxia. Inflammasome activation is low level compared to wild-type BMDMs. These tendency is same as HIF-1 deficiency.

研究分野：口腔感染症

キーワード：歯周炎 多発性硬化症 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

細菌性食中毒の原因菌 *Campylobacter jejuni* や歯周炎関連細菌 Pg などの一部の病原性細菌は、感染局所のみならず全身へと炎症を拡散させ、関節リウマチやギランバレー症候群、そして多発性硬化症などの全身性疾患を誘導、または増悪化させることが知られているが、その詳細な誘導・増悪化メカニズムについては未だに不明である。

現在、わが国の成人歯周炎の罹患率は軽度のものを含めて約 80%にも達している。歯周炎は歯周組織の炎症に始まり、末期には歯牙を支持する歯槽骨の破壊と吸収を経て歯牙の脱落をきたす慢性疾患であり、その原因として特定の歯周病原細菌群が指摘されている。それらはリスク別に分類されており、特に red complex と呼ばれている細菌のひとつが *Porphyromonas gingivalis* (Pg) である。実際に、歯周炎患者の歯周ポケット内から高頻度で分離され、その頻度や血清中の抗体価が歯周炎の重症度を推定する一指標となっている (日本歯周病学会、歯周病の検査・診断・治療計画の指針、2008)。

歯周炎患者が自己免疫疾患を併発しやすいとされる報告は数多く存在する。実際に歯周炎によって自己免疫疾患が惹起されるのか、という疑問については長年議論されてきたが、未だにその関連を決定づける確固たるエビデンスは見つかっていない。前述した多発性硬化症 (Multiple Sclerosis、MS) もその一つである。

MS は、世界で約 230 万人、日本で約 2 万人の患者がいる脳や脊髄などに対する炎症が引き金となって脱髄が引き起こされる中枢神経系脱髄性の自己免疫性疾患である。

主な原因としては T 細胞由来のサイトカイン分泌の増加を中心とした免疫不均衡や、炎症性サイトカイン IL-1 の分泌を制御しているインフラマソームというタンパク質複合体の活性化が挙げられている。先行研究では、マウスモデルを用いて Pg が MS を増悪化させる可能性を示唆しているが、その詳しい増悪化メカニズムは全く不明である。先行研究と同様に EAE を用いて予備実験を行なったところ、Pg による EAE 病態の増悪化が観察された。さらに申請者が注目していた因子の一つである低酸素誘導因子 HIF-1 が Pg 感染における EAE 増悪化に重要であることを見出した。また、リンパ節、脾臓および脊髄における IL-1 の産生量を定量したところ、HIF-1 依存的に上昇していた。これらの結果から、Pg は口腔内または全身において炎症反応を増幅させ、脾臓中の IL-1 の産生量を HIF-1 依存的に上昇させることによって、EAE の病態を増悪化させることが示唆された。しかしながら、HIF-1 がどのように Pg 感染時にインフラマソームの活性化を亢進しているのかというメカニズムは全くわかっていない。

2. 研究の目的

MS 増悪化に関連した Pg 感染によるインフラマソーム活性化メカニズムについて、分子レベルで詳細に解析し、原因となる代謝産物および宿主因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

Pg 感染によって誘導される HIF-1 依存的なインフラマソーム活性化に必要な宿主由来代謝産物 X、および宿主遺伝子 Y の同定

LysMCre マウスおよび *Hif1a^{fl/fl}LysMCre* (HIF1a 骨髄特異的欠失) マウス由来 BMDMs へと感染させ、低酸素環境 (酸素濃度 1% 以下) にて 12 時間培養後細胞を回収し、メタボローム解析、または RNA sequencing を行い、HIF-1 依存的に亢進した代謝産物 X または遺伝子 Y の候補をスクリーニングした。X の候補となる代謝産物の購入または精製を行い、*Hif1a^{fl/fl}LysMCre* (マウス BMDMs へ添加後、Pg によるインフラマソーム活性化の評価を行った。また、遺伝子 Y の候補となる遺伝子ノックダウンまたは阻害剤の添加をマウス BMDMs へ行い、Pg によるインフラマソーム活性化が抑制されるか評価を行った。

4. 研究成果

RNA sequencing の結果から、HIF-1 特異的に活性酸素種 ROS に関連した遺伝子の発現変動が観察された。BMDMs へと Pg を感染させた後 ROS の蛍光強度を CellRox で調べてみたところ低酸素環境特異的な Pg 感染により蛍光強度が亢進されていることが見出された (図 1)。さらに ROS の阻害剤 N-Acetylcysteine (NAC) が Pg によるインフラマソームの活性化を減弱させるか調べてみたところ、有意に活性化を抑制していることがわかった (図 2)。以上の結果から、HIF-1 は ROS 産生に関与しており、その産生が Pg によるインフラマソームの活性化を制御している可能性が示唆された。また、さらなる RNA sequencing による発現解析から、HIF-1 は自然免疫において I 型インターフェロン産生に関与している Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adapter-inducing interferon- (TRIF) によって遺伝子の発現が制御されていることを見出し

た。(図3)。さらに TRIF ノックアウト BMDMs では HIF-1 α の遺伝子発現の減少に伴って HIF-1 の核移行も減少していた(図4)。さらに TRIF ノックアウト BMDMs では Pg 感染におけるインフラマソームの活性化が有意に減少していた(図5)。以上の結果から、TRIF は HIF-1 の発言を制御し、さらにその下流で Pg によるインフラマソームの活性化レベルにも影響を与えていることが示唆された。これらの結果をまとめて現在国際学術誌に投稿中である。

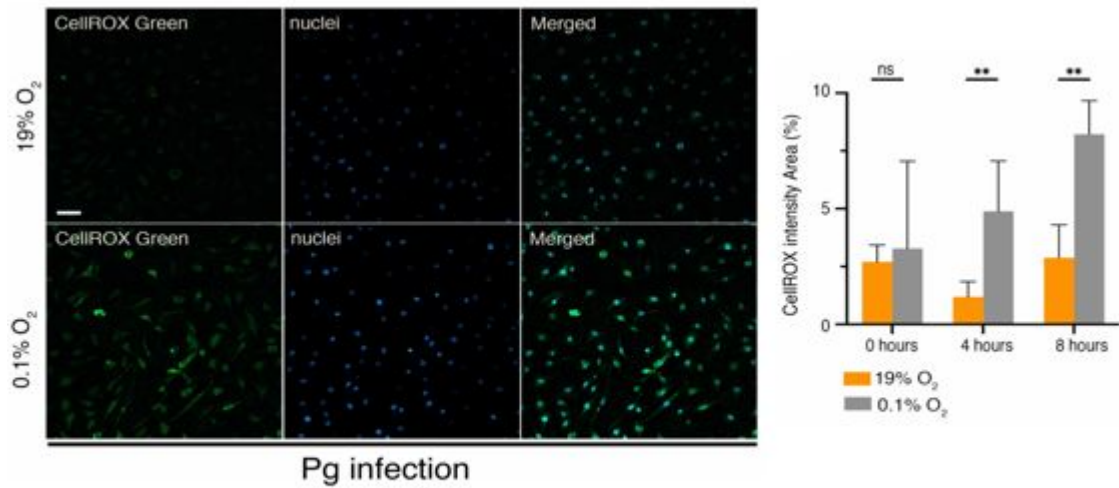


図1 低酸素特異的なPg感染はROSの産生を亢進する。

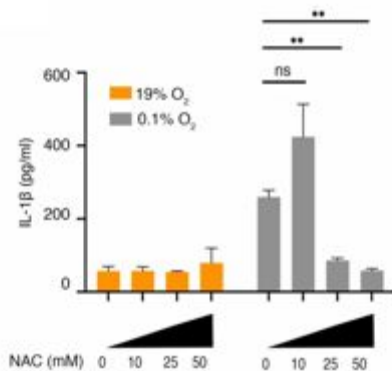


図2 ROS阻害剤NACは低酸素特異的なPg感染によるインフラマソームの活性化を抑制する。

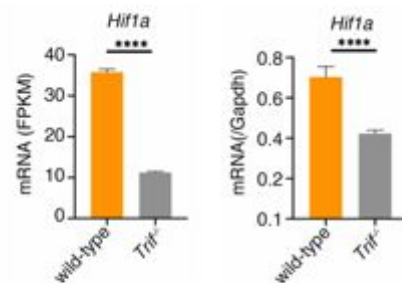


図3 TRIFはHIF-1 α の発現量を制御している。

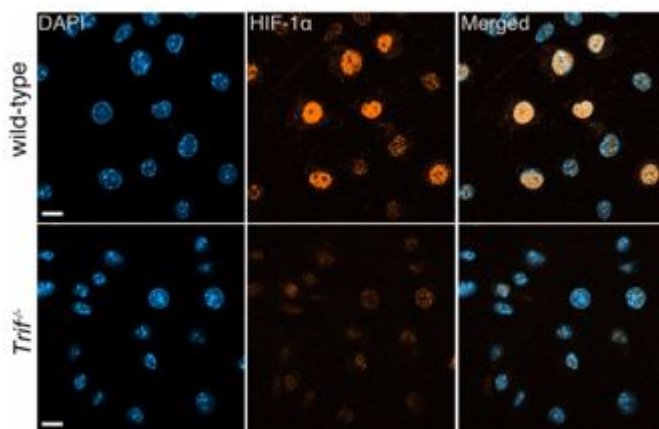


図4 TRIFはHIF-1 α の核移行を制御している。

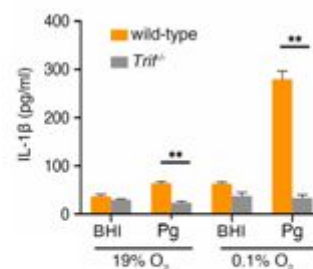


図5 TRIFはPg感染によるインフラマソームの活性化を制御している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tokuju Okano, Toshihiko Suzuki
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis infection triggers enhancement of severity for EAE following inflammasome activation in macrophages.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tokuju Okano, Toshihiko Suzuki
2. 発表標題 Oral infection of P. gingivalis induces exacerbation of neurological manifestation in mice
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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