

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21002

研究課題名(和文)なぜ呼吸器感染症予防に口腔ケアが有効なのか？ 分子生物学的根拠の提示

研究課題名(英文)Why is oral care effective in preventing respiratory infections? -Presentation of Molecular Biological Evidence-

研究代表者

高橋 佑和 (TAKAHASHI, Yuwa)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：50962601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸器疾患と口腔内細菌に関して、歯周病原菌が肺炎やCOVID-19、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の発症・重症化に関与していることが臨床研究により報告されている。しかしながら、歯周病原菌がどのような機序で呼吸器に影響を示すのか、分子生物学的背景は不明な点が多々ある。本研究では、歯周病原菌がSARS-CoV-2の受容体であるACE2の発現およびウイルス活性因子であるTMPRSS2の発現を増強させる事、また、歯周病原菌が呼吸器上皮細胞の細胞間結合を構成する遺伝子発現を抑制することでバリア機能を低下させる事を明らかにした。以上の結果から、歯周病が呼吸器疾患を重症化させるメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今、全身疾患と歯周病との関連については注目を集めており、歯科医院に通院している患者の中にも認識されている方は多い。しかし、その根拠となる分子生物学的なメカニズムに関して、未だ解明されていない点が多い。

また、COVID-19やインフルエンザ、慢性閉塞性肺疾患(COPD)等の呼吸器疾患と比べると歯科は軽視されやすく、呼吸器疾患に罹患されている患者の口腔内は二の次になることも多いと考える。

本研究は、呼吸器疾患と歯周病の関係の一端を分子生物学的に解明しており、このことから患者および医療従事者に対して呼吸器疾患における歯科の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：With regard to respiratory diseases and oral bacteria, clinical studies have reported that periodontal pathogens are involved in both the development and severity of pneumonia, COVID-19, and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, the biological background at the molecular level of the mechanisms by which periodontal pathogens exert their effects on the respiratory tract remains unclear.

In this study, we found that periodontal pathogens enhanced ACE2 (a receptor for SARS-CoV-2) expression and TMPRSS2 (a virally active factor for SARS-CoV-2). In addition, periodontal pathogens reduced the barrier function of respiratory epithelial cells by suppressing the expression of genes that constitute intercellular junctions. These results may provide a mechanism by which periodontal disease may contribute to respiratory disease severity.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯周病 呼吸器疾患 COVID-19 SARS-CoV-2

1. 研究開始当初の背景

誤嚥性肺炎や SARS-CoV-2 により発症する新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) などの呼吸器感染症により、多くの高齢者の命が奪われている。そのため、超高齢社会を迎えた我が国において、呼吸器感染症予防対策の構築は重要である。呼吸器感染症の発症・重症化に、歯周病や不良な口腔衛生状態が悪影響を及ぼしているとの報告が臨床研究により多数されている。歯周病患者では、肺炎のリスクが高く肺から口腔細菌が検出されること、さらに COVID-19 の死亡率が有意に高いことが報告されている。とくに誤嚥性肺炎の予防に口腔ケアが有効であることから、高齢者施設や周術期において多職種連携による口腔健康管理が積極的に行なわれるようになった。しかしながら、口腔と呼吸器感染症は密接に関連していることは明らかなものの、なぜ不良な口腔衛生状態が呼吸器感染症の発症・重症化を促進させるのか、その分子生物学的背景は明らかではない。申請者は、口腔の健康を維持することが呼吸器感染症の予防対策として有効であることを示す分子基盤の確立を目指してきた。その成果の一つとして、SARS-CoV-2 の受容体であるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) の発現が、歯周病原菌 *Fusobacterium nucleatum* (F.n.) の刺激で亢進されることを初めて明らかにした。また、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* の線毛が肺炎の発症・進展に重要な役割を果たしていることも明らかにした。

2. 研究の目的

今回の研究では、SARS-CoV-2 感染に歯周病原菌がさらなる影響を及ぼすか、また呼吸器疾患と歯周病の関係性について他の観点から影響を及ぼすか解明することを目的とした。

(1) SARS-CoV-2 が宿主細胞に感染するにあたって受容体の他にも、ウイルス表面のスパイクタンパク質を切断する細胞膜上の酵素 (TMPRSS2) の存在も重要となる。歯周病原菌が TMPRSS2 に及ぼす影響について検討を行った。

(2) 呼吸器の生体防御機能において、上皮細胞の細胞間結合から成るバリア機能は非常に重要な役割を果たすことが知られている。これまでの研究では、歯周病原菌の作用により炎症性サイトカインや受容体の発現が上昇することを見出しているが、生体のバリア機能の関しては未だ検討されていない。歯周病原菌が呼吸器疾患の増悪に関与していることをこれまでの研究で明らかにしているため、呼吸器上皮細胞のバリア機能にも影響を及ぼすのではないかと考え検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺上皮細胞株 (Calu-3) に歯周病原菌 F.n. の培養上清を添加し、TMPRSS2 の発現をリアルタイム PCR および Western Blotting にて解析した。

(2) ヒト気管支上皮細胞株 (16HBE) をトランスウェルプレート (上層と下層がメンブレンで仕切られている 2 層構造の培養プレート) で培養し、上層と下層の経日的な電気抵抗値の差 (TER) を計測。また、3 日目に上層から下層にかけてのデキストラン透過性を計測。次に、16HBE とプライマリ細胞を F.n. で刺激し、細胞間結合に関わる遺伝子発現についてリアルタイム PCR で検討。最後に、マウスに F.n. を誤嚥させ、マウスの肺および血清中の変化を検討した。

4 . 研究成果

(1) Calu-3 を F.n. の培養上清で刺激をしたところ、TMPRSS2 の遺伝子発現の増加を認めた。また、タンパク発現においても Western Blotting で増加を認めた。

(2) 呼吸器のバリア機能に歯周病原菌が及ぼす影響

16HBE をトランスウェルプレートで培養し、F.n. で刺激したところ、刺激後 2 日目 3 日目において濃度依存的に TER の低下を認めた。また、3 日目に上層にデキストランを滴下し、1 時間後 下層のデキストランの吸光度を測定したところ、F.n. の濃度依存的に吸光度が亢進することを認めた。

このことから、F.n. により上層と下層の間のメンブレンが破壊されたことで TER の低下およびデキストラン透過性の亢進が起きたと考えられる。

細胞間結合の特にタイトジャンクションに関わる 17 種の遺伝子発現に対する影響を 16HBE およびプライマリ細胞を用いてリアルタイム PCR で検討した結果、両細胞において F.n. により JAM-A や CLDN1 等の遺伝子発現の低下を認めた。

このことから、F.n. により細胞間結合が一部確立されない可能性が示唆された。

マウスを用いての検討も行った。対照群には PBS を、実験群には F.n. を 3 日間連続で誤嚥させ、解剖 1 時間前に両群にデキストランを誤嚥させ解剖を実施。その結果、肺の HE 染色で F.n. 誤嚥群のマウスの肺胞が破壊され、肺胞間距離が増加していることを認めた。また、肺の PCR で JAM-A および CLDN-1 の遺伝子発現が低下していることを認めた。さらに、血清中のデキストランを測定した結果、肺に誤嚥させたのにも関わらず F.n. 誤嚥群で血清中のデキストランが上昇していることを認めた。

このことから、歯周病原菌は細胞間結合を構成する遺伝子を抑制することで、呼吸器上皮のバリア形成の破壊し、そのことにより細菌やウイルスなどの感染が惹起され呼吸器疾患の増悪に参与していることが示唆された。

これらの結果から、呼吸器疾患の増悪に歯周病原菌が及ぼす影響に関して分子生物学的なメカニズムの一端を明らかにした。近年、世界的に問題となっている COVID-19 や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの呼吸器疾患の増悪に歯周病が関与している事が明らかになり、歯周病の予防・治療が呼吸器疾患増悪の抑制につながる可能性があることを患者および医療従事者に示せたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Karahashi Yukihiko, Cueno Marni E., Kamio Noriaki, Takahashi Yuwa, Takeshita Ikuko, Soda Kaori, Maruoka Shuichiro, Gon Yasuhiro, Sato Shuichi, Imai Kenichi	4. 巻 682
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum putatively affects the alveoli by disrupting the alveolar epithelial cell tight junction, enlarging the alveolar space, and increasing paracellular permeability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 216 ~ 222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.10.026	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuwa Takahashi, Toshimithu Iinuma, Kenichi Imai
2. 発表標題 Aspiration of periodontopathic bacteria due to poor oral hygiene potentially contributes to the aggravation of COVID-19 - Expression of SARS-CoV-2 Receptor:ACE2 and proinflammatory cytokines Induced by Fusobacterium nucleatum -
3. 学会等名 IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 佑和, 今井 健一, 飯沼 利光
2. 発表標題 歯周病原菌誤嚥と COPD 増悪との関連 -Fusobacterium nucleatum はマウス肺のバリア形成を阻害する-
3. 学会等名 日本老年歯科医学会第34回学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 佑和, 長谷川 義明, 今井 健一
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis Mfa1線毛による 呼吸器細胞からの炎症性サイトカイン誘導機構
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋佑和、今井健一、飯沼利光
2. 発表標題 なぜ口腔細菌は誤嚥性肺炎の原因となるのか？ -Pg菌の短線毛による呼吸器細胞からのサイトカイン誘導-
3. 学会等名 第33回日本老年歯科医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahashi Y, Iinuma T, Imai K
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis Gingipains Induce Production of Mucin5AC in Mouse Lung
3. 学会等名 2022 IADR/APR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2022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