

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893086

研究課題名(和文) 歯周病原細菌による腸管dysbiosisと動脈硬化との関連解明

研究課題名(英文) Analysis of relationship between intestinal dysbiosis by periodontopathic bacteria and atherosclerosis

研究代表者

宮沢 春菜 (Miyazawa, Haruna)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：50733721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6マウスへのPorphyromonas gingivalis単回口腔投与群において有意な腸内細菌叢の有意な変化、血清中エンドトキシンレベルの上昇、肝臓中Universal 16S rRNA遺伝子検出量の上昇を認めた。また感染群の腸管において腸管透過性に関与するOccludinの遺伝子発現が減少した。以上より歯周病原細菌の嚥下が全身疾患の誘導に大きく影響を及ぼすことが示唆された。動脈硬化性病変の進展への作用については、今後動脈硬化病変発症モデルを用い更なる検討を行う。

研究成果の概要(英文)：Once orally administration of Porphyromonas gingivalis significantly altered gut microbiota, increased serum endotoxin levels and gene expression of Universal 16S rRNA in the liver of C57BL/6 mice. In the intestinal tissues of the infected mice, gene expression of Occludin, which is related to intestinal permeability, was significantly downregulated. These results suggest that disturbance of the gut microbiota composition by orally administrated periodontopathic bacteria may be a causal mechanisms linking periodontitis and systemic disease. Further studies are required to examine the relationship between intestinal dysbiosis and development of atherosclerotic lesion by periodontal infection using mouse model of atherosclerosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周病原細菌 腸管dysbiosis

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎が冠動脈疾患、糖尿病など、メタボリックシンドロームに関連した疾患のリスクを高めることが多くの疫学研究、症例対照研究、動物実験などで報告されている。しかし全身的な炎症メディエーターの上昇が歯周組織局所で産生されたそれらを反映したものかは明らかにされていない。

一方、肥満やメタボリックシンドロームと腸内細菌との間に関連性があることを示す研究が相次いで発表されている (Science, 2012; 他)。腸内細菌叢の変化は、エネルギー摂取効率の向上と同時にグラム陰性菌由来のリポ多糖を増加させ、門脈を経て全身を循環し (J Clin Invest, 2006) 代謝性内毒素血症 (Metabolic endotoxemia) を発症させる。同時に白色脂肪細胞や肝臓、筋肉など糖代謝に重要な組織において軽度の炎症状態を引き起こし、その結果誘導される全身的なインスリン抵抗性により、メタボリックシンドロームのリスクを高める要因になるとされている。

我々の研究グループではこの腸内細菌叢の変化が歯周炎患者の唾液中の細菌によっても引き起こされる可能性があると考えた。歯周炎患者の唾液 1ml 中には  $10^7 \sim 10^8$  の細菌が含まれている (J Dent Res, 1995) といわれており、胃や十二指腸から口腔細菌が検出されることから、少なくとも一部は胃液による分解や変性を免れ下部消化管に到達していることが明らかにされている (PLoS ONE, 2008)。そこで嚥下した細菌による腸内細菌叢の変化とそれに伴う Metabolic endotoxemia の誘導により炎症メディエーターによる影響が及ぶと仮説を立て検証したところ、*P. gingivalis* 口腔感染が腸内細菌叢を変動させ、各組織・臓器における炎症性変化、インスリン抵抗性を誘導することを確認した。

一方動脈硬化発症のメカニズムとして、脂質異常を背景とした免疫の活性化、それに伴う炎症の存在が関与していることが明らかになってきている。我々は ApoE<sup>-/-</sup> マウスを用いた *P. gingivalis* 口腔感染モデルにおいて全身の臓器に炎症を誘導し、血管壁や肝機能さらに脂質代謝に影響を及ぼすことで、動脈硬化を促進することを明らかにした (PLoS ONE, 2011)。

また、動脈硬化発症のメカニズムとして、脂質異常を背景とした免疫の活性化、それに伴う炎症の存在が関与していることが明らかになってきている。炎症性サイトカインの作用により血管壁内へ浸潤したマクロファージは、細胞表面のスカベンジャー受容体を介して変性 LDL を取り込み、蓄積し、泡沫化マクロファージとなる。活性化した泡沫化マクロファージは炎症性サイトカイン産生によりスカベンジャー受容体発現が高まり、さらに泡沫化と炎症のサイクルが亢進する。近

年腸内細菌が産生する代謝産物の増加により、マクロファージのスカベンジャー受容体の発現が上昇し、泡沫化が増加することが報告され (Nature, 2011; N Engl Med, 2013; 他)、腸内細菌と動脈硬化性疾患の関連についても注目が高まっており、歯周炎と動脈硬化性疾患との関連メカニズムにおいて、腸内細菌叢の変動が関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周炎の動脈硬化性疾患の関連メカニズムにおいて、炎症・脂質代謝異常の亢進に加え、腸内細菌叢の変動の関与を確認し、歯周炎が腸内細菌叢の変動により動脈硬化疾患の進展に作用するかについて検証することである。

*P. gingivalis* の複数回口腔投与により腸内細菌叢が変動し、全身性に炎症が誘導されることを確認したが、まずはその詳細なメカニズムを解明するために、*P. gingivalis* 単回投与による全身への影響について検討した。

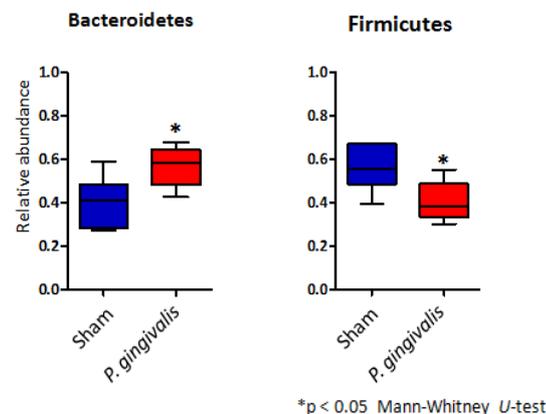
## 3. 研究の方法

6週齢雄の C57BL/6 マウスに *P. gingivalis* W83 株あるいは基材のみを口腔より 1 回投与し、2 日後に糞便、血液、肝臓、小腸のサンプルを回収した。糞便及び肝臓より DNA を抽出し、PCR 増幅した 16S rRNA の配列を次世代シーケンサーにて網羅的に解析した。また、血清中のエンドトキシンレベルを *Limulus amoebocyte lysate test* にて測定した。さらに、Real-time PCR 法にて腸管組織におけるタイトジャンクションプロテインと炎症性サイトカインの遺伝子発現解析を行った。

## 4. 研究成果

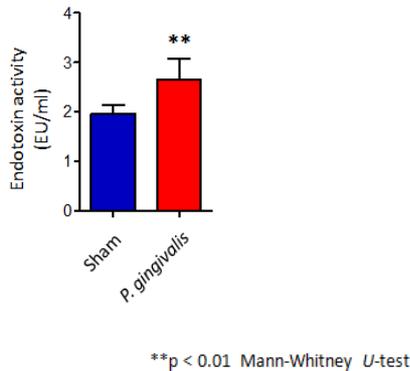
### (1) 腸内細菌叢の変動

*P. gingivalis* 単回投与を行った群の腸内細菌叢において Bacteroidetes 門に属する菌の比率が有意に上昇し、Firmicutes 門に属する菌の比率が有意に減少した。



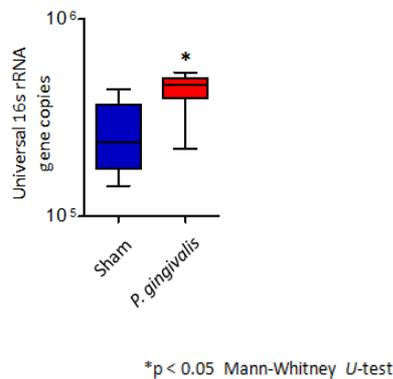
(2) 血清エンドトキシンレベルの変化

*P. gingivalis* 単回投与群において、腸内細菌叢の変動とともに血清中エンドトキシンレベルの有意な上昇が認められた。



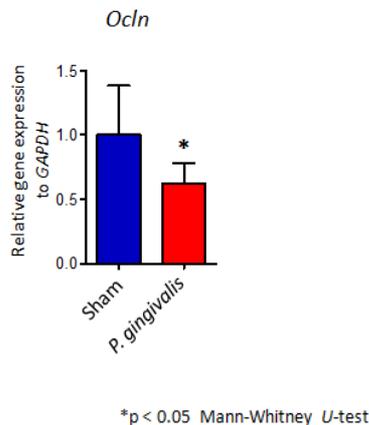
(3) 肝臓組織における細菌量の変化

*P. gingivalis* 単回投与群の肝臓組織において非特異的 16S rRNA 遺伝子検出量の有意な上昇が認められた。一方 *P. gingivalis* 特異的 16S rRNA 遺伝子は検出されなかった。

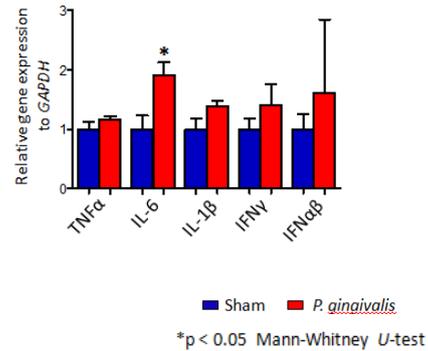


(4) 腸管における遺伝子発現の変化

*P. gingivalis* 単回投与群の腸管において、タイトジャンクションプロテインの遺伝子発現の有意な減少が認められた。



さらに、*P. gingivalis* 単回投与群において炎症性サイトカインの遺伝子発現のうち、IL-6 において有意な上昇が認められた。



以上より *P. gingivalis* のわずか単回投与でも腸内細菌叢の変動に伴い腸管透過性が亢進し、その結果体内への細菌の播種及び内毒素血症が誘導されることが示唆され、歯周病原細菌の嚥下が全身疾患の誘導に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。

この結果をもとに今後動脈硬化病変発症モデルを用い、歯周病原細菌感染における腸内細菌叢の変動と動脈硬化病変への作用や *P. gingivalis* 摂取の腸管免疫への影響など更なる検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. Sci Rep. 2014; 4: 4828 (査読あり)  
DOI: 10.1038/srep04828.

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Matsuda Y, Arimatsu K, Takahashi N, Miyazawa H, Yamada H, Minagawa T, Nakajima M, Tabeta K, Nakajima T and Yamazaki K : Effect of Local Inflammation of Periodontal Tissues on Metabolic Diseases. 93rd General session of the IADR, Boston (USA), March 11-14, 2015.

(2) Arimatsu K, Domon H, Yamada H, Nakajima M, Miyazawa H, Miyauchi S, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K: *P. gingivalis* induces systemic diseases via dysbiosis of gut

microbiota . 92nd General session of the IADR, Cape Town (South Africa), June 25-28, 2014.

(3) 有松 圭, 山田ひとみ, 宮内小百合, 宮沢春菜, 中島麻由佳, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久: *Porphyromonas gingivalis* 経口投与によるマウス 腸内細菌叢の変動と内毒素血症の関連. 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市), 2014 年 5 月 23 日

(4) 山田ひとみ, 土門久哲, 宮内小百合, 宮沢春菜, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久: マウス *Porphyromonas gingivalis* 口腔感染で誘導される小胞体ストレス応答と歯槽骨吸収の関連. 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市), 2014 年 5 月 23 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮沢 春菜 (HARUNA MIYAZAWA)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号: 50733721

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者