

令和元年6月25日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02578

研究課題名(和文) 口腔-腸管連関を基盤としたペリオドンタルメディスン病因論の統合的解明

研究課題名(英文) Integrated analysis of perio-systemic association based on the oral-gut connection

研究代表者

山崎 和久 (Yamazaki, Kazuhisa)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00182478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 26,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は様々な全身疾患のリスク高めるといわれている。これまでその因果メカニズムとして、歯周ポケットからの内毒素血症や炎症歯周組織由来の炎症メディエーターが全身循環を介して遠隔の組織・臓器に炎症性的変化を誘導することによる、と考えられてきた。我々は口腔細菌叢の乱れが腸内細菌叢の dysbiosis を誘導することにその本態があると考え、マウスを用いて口腔から投与した歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* が腸内細菌を変化させ、その結果、バリア機能の低下とそれによる内毒素血症や腸管免疫系の Th17 優勢へのシフトが誘導されることが各種臓器の炎症性変化を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで考えられてきた歯周病が全身疾患のリスクを高めるメカニズムには様々な矛盾点が含まれていた。本研究課題において、歯周病と関連する口腔細菌を多量、かつ継続的に嚥下することで腸内細菌が乱れ、それにより様々な全身疾患で見られる病理学的変化が誘導されることをはじめて示した。歯周病と全身疾患を関連づける新たなメカニズムとして口腸連関を世界で初めて提唱した。腸内細菌叢は全身の健康と密接に関連しており、歯周病治療が腸内細菌叢の改善を介して健康長寿に貢献することの学術的基盤を提供した意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological evidence suggests that periodontitis is associated with an increased risk of various diseases such as atherosclerotic vascular diseases and type 2 diabetes. Although bacteremia/endotoxemia and inflammatory mediators resulting from periodontitis lesion are hypothesized as underlying mechanisms by which periodontitis increases the risk of systemic diseases, there is not sufficient evidence to support the hypothesis. In this research project, we demonstrated that oral administration of *P. gingivalis* induced gut dysbiosis and systemic inflammation. Given that recent findings have implicated an altered gut microbiota as a contributor to various diseases with which periodontitis is also associated, it is reasonable to assume that the systemic inflammatory and metabolic changes seen in *P. gingivalis*-administered mice could be attributable to this altered gut microbiota. We propose this as a novel mechanism linking periodontal disease and systemic diseases.

研究分野：歯周病学

キーワード：口腔細菌 歯周病原細菌 腸内細菌 代謝性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患や歯周病原細菌は全身疾患と関連: 歯周炎患者では冠動脈心疾患、虚血性脳血管疾患、糖尿病、非アルコール性脂肪性肝疾患、膵臓がんの罹患率が高いことが疫学調査により報告されている。その他関節リウマチ、低体重児早産に関しても多くの臨床研究により歯周炎との関連が示唆されている。大腸がんと *Fusobacterium nucleatum* との関連(Rubinstein, et al., Cell Host Microbe, 2013)、関節リウマチと *Prevotella* 属の関連(Scher et al., Elife, 2013)など、口腔細菌と全身疾患の関連について言及している報告も近年増えてきている。しかもそれらの菌は腸内から検出されている(Qin et al., Nature, 2014)。また、唾液中 *Prevotella* と炎症性腸疾患の関連(Said et al., DNA Res, 2014)も報告されている。

推測されている関連生物学的メカニズムの問題点: 現在のところ歯周炎が全身疾患のリスクを高めるメカニズムとして、1)歯周ポケットからの歯周病原細菌の侵入による菌血症または内毒素血症、2)歯周炎局所で産生された炎症メディエーターの全身循環への流入による遠隔組織での炎症の誘発、3)細菌抗原分子と生体分子の分子相同性による組織傷害、を中心に研究が進められてきた。しかし、これらの仮説には問題点が存在する。例えば肝臓や血管壁において口腔細菌の検出が報告されているが、菌の侵入と炎症との関連は明らかにされていない。歯周炎患者では明らかに血中の炎症メディエーターが上昇しており、適切な歯周治療によりそのレベルは低下する(Yamazaki et al., JPR 2005, CEI 2007)。しかし、上昇した炎症メディエーターが歯周炎局所由来であるという証拠はどこにもない。分子相同性仮説は動脈硬化病変との関連を説明するには合理的であるが、その他の疾患との関連を説明することはできない。

***Porphyromonas gingivalis* 口腔投与はマウスにおいて腸内細菌叢の変動とメタボリックな変化を誘導する:** 我々は平成 25 年度-26 年度挑戦的萌芽研究課題において、*P. gingivalis* 口腔投与に伴って腸内細菌叢が有意な変化を示すこと、腸管組織に於いてタイトジャンクションタンパクの遺伝子発現が低下することを明らかにした。これらより病的口腔細菌が腸内細菌叢のバランスを崩し、その結果、腸の透過性が亢進し、そこから入った内毒素が血流を介して様々な臓器・組織に軽微な炎症を持続させることが新たに歯周病と全身疾患を結びつける有力なメカニズムとして示唆された(Arimatsu, Yamazaki et al., Sci Rep 2014)。しかし、他の細菌の影響や腸内細菌変動のメカニズム、全身に与える影響の分子基盤、とくに腸管免疫との関連は依然として明らかになっていない。

2. 研究の目的

歯周疾患による全身的な炎症の誘発と自己免疫応答の亢進の観点から、歯周病原細菌感染モデルマウスを作成して腸内細菌を中心とした病因メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯周炎モデルマウスの作成: 歯周病原細菌投与モデル; 2%CM セルロースに懸濁した歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis* W83 株、*Prevotella intermedia* ATCC 25611 株) の生菌を 10^9 CFU/100 μ l の濃度に調整し、1 週間に 2 回、5 週間、あるいは単回口腔より投与す。

結紮誘導歯周炎モデル; 上顎第 2 臼歯の歯頸部に絹糸を 1 週間結紮した。コラーゲン誘導関節炎モデルの作成: DBA/1J マウスに歯周病原細菌を 5 週間投与した後、2 型コラーゲンを免疫、3 週間後に追加免疫を行いその 3 週間後に解析した。

(2) 歯槽骨破壊の定量: 実験期間終了後組織解析のため一部は還流固定し、断頭後、余剰組織を除去して脱灰、固定、包埋を経て組織切片を作成した。H-E 染色を施し、炎症性細胞浸潤を解析した。さらに TRAP 染色により破骨細胞数を解析した。一部個体の上顎骨はさらに軟組織を可及的に除去し、第一臼歯の近遠心部位のセメント-エナメル境から歯槽骨頂までの距離を計測した。

(3) 遺伝子発現解析: 歯肉、脂肪組織、肝臓、小腸、大腸より全 RNA を抽出し、定量的 PCR 法により歯周炎誘発による組織における遺伝子発現変化を解析した。

(4) 実験終了時に糞便を採取し、RNA later™を含む保存液に回収する。検体より DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子 V5-V6 領域に対するプライマーを用いて PCR を行ったのち、PCR 産物を次世代シーケンサーでハイスループットに配列決定する。解析ソフトウェアを用いて得られた配列データをもとに、既知微生物 16S rRNA 配列データベースに対して相同性解析を行い、由来生物種を同定した。

(5) 免疫応答の解析: 腸管膜リンパ節、鼠径部リンパ節および脾臓のリンパ球を分離し、Th17、Treg の比率について解析する。血清中の投与細菌に対する抗体価は ELISA 法で測定した。また、血清中の炎症性サイトカインは ELISA 法で、内毒素レベルはリムルステストで測定した。

(6) メタボローム解析: 糞便・血清中の代謝産物の測定は理研設置の LC-TOF-MS を用いて実施。ピーク産物のアノテーションを KEGG にて行った。

(7) 歯周病原細菌の耐酸性の検討: 口腔から投与した細菌が下部消化管に到達するためには胃液での分解に耐える必要がある。そこで種々の pH の人口胃液を作成し、液体培地で培養した細菌、人工バイオフィルム状にした細菌を 2 時間暴露させ、生存率を測定した。

4. 研究成果

(1) 歯周病原細菌の腸内細菌叢に及ぼす影響: *P. gingivalis* 口腔投与は recipient マウスの腸内細菌叢を有意に変動させた。また、単回投与であっても有意な変動を引き起こすことが明らかになった。一方、*P. intermedia* 投与はそのような変化は誘導しなかった。Phylum レベルでは Bacteroides 門の有意な上昇と Firmicutes 門の有意な低下が認められた。これら腸内細菌の変化に伴って、肝臓への細菌の流入量が増加し、血中内毒素レベルが上昇した(図1)。

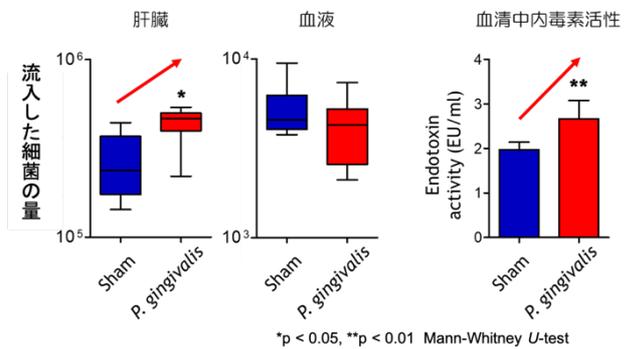


図1: *P. gingivalis* 口腔投与の影響

(2) 結紮誘導歯周炎の腸内細菌叢に及ぼす影響: 絹糸結紮による腸内細菌叢への影響は極めて軽微なものであった(図2)。また、結紮 + *P. gingivalis* 投与では *P. gingivalis* 投与のみと同様、腸内細菌叢の有意な変動が認められた。主座標分岐の結果からは、結紮誘導歯周炎群は対照群と類似の分布を示し、*P. gingivalis* + 結紮群は *P. gingivalis* 投与群と類似の分布を示すことが明らかになった。

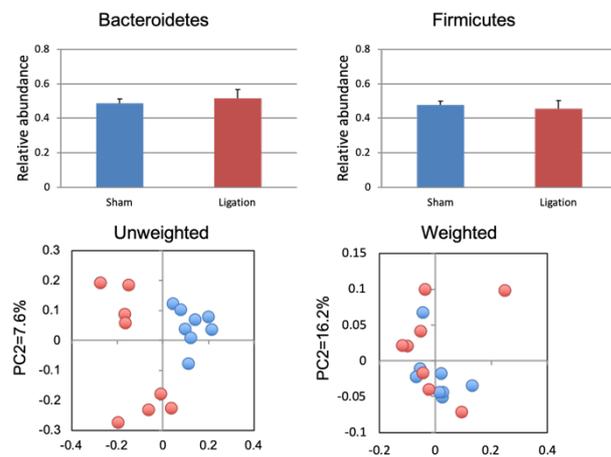


図2: 結紮歯周炎の腸内細菌叢への影響

(3) 歯槽骨破壊と歯肉における遺伝子発現: 結紮歯周においては歯槽骨吸収の著明な亢進が認められ、炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6、IL-17 の発現が上昇していた。

(4) コラーゲン誘導関節炎モデル: DBA/1J マウスにおいても *P. gingivalis* 10 回投与は腸内細菌叢の変化を誘導した。関節炎スコアは *P. gingivalis* 投与群では悪化が認められたが、*P. intermedia* 投与群では Sham 群との差は認められなかった。組織学的解析により、*P. gingivalis* 投与群では滑膜に強い炎症性細胞浸潤が認められ、破骨細胞の増加が顕著であった。

腸内細菌叢の有意な変動は *P. gingivalis* 投与群でのみ認められ、その変化は細菌投与終了後6週間経過しても認められた(図3)。血中 IL-17、血清アミロイド A は *P. gingivalis* 投与群でのみ上昇していた。

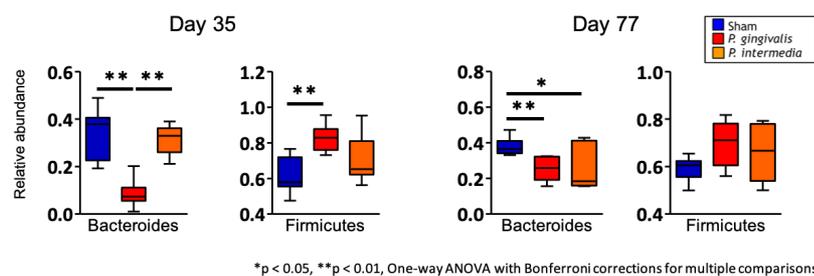


図3: CIAモデルにおける歯周病原細菌口腔投与の影響

CIA モデルにおける関節炎重症度は抗コラーゲンタイプ II 抗体レベルと相関することが知られているが、抗体価に3群間で相違は認められなかった。また、*P. gingivalis* による関節炎重症化に関与していると報告されている抗シトルリン化

タンパク抗体価においても *P. gingivalis* 投与群で有意に上昇しているとの所見は得られなかった。これらの結果はこれまで報告されているものとは別のメカニズムが関与していることを示唆した。

腸管免疫系の解析により、*P. gingivalis* 投与により腸間膜リンパ節、パイエル板における Th17 の比率が上昇すること、腸間膜リンパ節、鼠経リンパ節、脾臓から分離した細胞の IL-17 産生能の亢進が認められ、Th17 優位な応答が誘導されることが明らかになった。

また、小腸において IL-17 の遺伝子発現上昇が認められた。

(5) *P. gingivalis* の腸内細菌メタボライト産生への影響: マウス糞便中の脂溶性代謝物の解析から、乳酸菌がリノール酸を代謝して産生する 10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸 (10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid: HYA) の有意な低下が認められた。この物質は腸管上皮細胞におけるバリア機能の維持に重要な働きをしており、*P. gingivalis* 投与による内毒素血症の誘導との関連が示唆された。

(6) 歯周病原細菌の耐酸性：液体培地で培養した *P. intermedia* は pH5 であっても人口胃液暴露 2 時間後にはほとんど死滅していた。一方 *P. gingivalis* は pH5 で 1% 程度、pH3 でもわずかに生存が認められた。人口バイオフィルム形成後においても *P. intermedia* の生存率は変わらなかったが、*P. gingivalis* は pH3 で 40% 程度、pH1 でも 1% 使用生存率を示した。これらの結果は *P. gingivalis* が高い耐酸性を示し、下部消化管まで生菌として到達していることを強く示唆した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Tabeta K, Du X, Arimatsu K, Yokoji M, Takahashi N, Amizuka N, Hasegawa T, Crozat K, Maekawa T, Miyauchi M, Matsuda Y, Ida T, Kaku M, Hoebe K, Ohno K, Yoshie H, Yamazaki K, Moresco E.M.Y., Beutler B. An ENU-induced splice site mutation of mouse Col1a1 causing recessive osteogenesis imperfecta and revealing a novel splicing rescue. *Sci Rep* 7: 11717, 2017. (査読あり)

Sato K, Takahashi N, Kato T, Matsuda Y, Yokoji M, Yamada M, Nakajima T, Kondo N, Endo N, Yamamoto R, Noiri Y, Ohno H, Yamazaki K. Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system. *Sci Rep* 7: 6955, 2017. (査読あり)

Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, de Jong PR, Bertin S, Tabeta K, Yamazaki K. Neuronal TRPV1 activation regulates alveolar bone resorption by suppressing osteoclastogenesis via CGRP. *Sci Rep*.2016; 6:29294. doi: 10.1038/srep29294. (査読あり)

Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Matsuda Y, Sato K, Takahashi N, Nakajima T, Yamazaki K. Brazilian propolis mitigates impaired glucose and lipid metabolism in experimental periodontitis in mice. *BMC Complement Altern Med* 16:329, 2016. (査読あり)

Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Sato K, Ohno H, Yamazaki K. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating IL-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. *J Periodont Res*. 51(5):639-46, 2016. (査読あり)

Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, Ohno H, Yamazaki K. Oral administration of *P. gingivalis* induces dysbiosis of gut microbiota and impaired Bbarrier function leading to dissemination of enterobacteria to the liver. *PLoS One*. 2015 Jul 28;10(7):e0134234.doi:10.1371/journal.pone.0134234. (査読あり)

Yamada H, Nakajima T, Domon H, Honda T, Yamazaki K. ER stress response and bone loss in experimental periodontitis in mice. *J Periodont Res*. 50(4): 500-508, 2015. (査読あり)

Minagawa T., Okui T., Takahashi N., Nakajima T., Tabeta T., Murakami S., Yamazaki K. Resveratrol suppresses the inflammatory responses of human gingival epithelial cells in a SIRT1-independent manner. *J Periodont Res*. 50(5): 586-593, 2015. (査読あり)

山崎和久. 口腔細菌による腸内細菌叢の変化と代謝に及ぼす影響. *無菌生物* 45(1) ,48-49 , 2015 .

山崎和久・本田朋之. 糖尿病 - 歯周病連関における新たなメカニズム. *新潟医学会雑誌* 129(7) , 364-367 , 2015 .

[学会発表](計 20 件)

Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Yokoji M, Sulijaya B, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Beneficial role of a microbial metabolite on gingival epithelial barrier. 65th Annual meeting of JADR, Tokyo, November 18, 2017.

佐藤圭祐、高橋直紀、中島麻由佳、松田由実、山田実生、横地麻衣、中島貴子、山崎和久 *Porphyromonas gingivalis* 口腔投与のカラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析. 第

147 回日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会、盛岡市マリオス、2017 年 10 月 27 日

山崎恭子, 中島貴子, 高橋直紀, 宮沢春菜, 皆川高嘉, 佐藤圭祐, 伊藤晴江, 山崎和久. 歯周炎患者腸内細菌叢における口腔内由来細菌の比率. 第 147 回日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会、盛岡市マリオス、2017 年 10 月 26 日

Yamazaki K, Sato K, Takahashi N, Kato T, Matsuda Y, Yokoji M, Yamada M, Yamazaki K, Nakajima T, Hiroshi Ohno. Periodontopathic bacteria increases the severity of collagen-induced arthritis by affecting gut microbiota. PgMelbourne, Melbourne, Australia, May 15, 2017.

中島貴子, 高橋直紀, 皆川高嘉, 宮沢春菜, 伊藤晴江, 佐藤圭祐, 山崎和久. 歯周炎患者における腸内細菌叢の解析. 第 60 回春季日本歯周病学会学術大会, 福岡, 2017 年 5 月 13 日

Sato K, Takahashi N, Matsuda Y, Yamada M, Yokoji M, Tabeta K, Nakajima M, Yamazaki K. A novel mechanism linking periodontitis and rheumatoid arthritis. 95th General session of the IADR, San Francisco, March 24, 2017.

Matsuda Y, Minagawa T, Okui T, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Effect of resveratrol on alveolar bone loss induced by the experimental occlusal trauma in mice. 95th General session of the IADR, San Francisco, March 24, 2017.

Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Yokoji M, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. A bacterial metabolite ameliorates *P. gingivalis*-induced gingival epithelial barrier disruption. 95th General session of the IADR, San Francisco, March 24, 2017.

Yokoji M, Tabeta K, Miyazawa H, Matsuda Y, Sato K, Yamada M, Yamazaki K. PCSK9 induction by *P. gingivalis* independent of inflammatory response. 95th General session of the IADR, San Francisco, March 24, 2017.

佐藤圭祐, 高橋直紀, 中島麻由佳, 松田由実, 山田実生, 横地麻衣, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久. *Porphyromonas gingivalis* 口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析. 平成 28 年度新潟歯学会第 2 回例会, 2016 年 11 月 5 日

山田実生, 高橋直紀, 松田由実, 佐藤圭祐, 横地麻衣, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久. 口腔細菌脂質代謝に由来する機能性脂肪酸 HYA は歯肉上皮バリア機能の低下を抑制する. 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 新潟, 2016 年 10 月 7 日

Sato K, Takahashi N, Nakajima M, Kato T, Matsuda Y, Yokoji M, Yamada M, Ohno H, Yamazaki K. Periodontopathic bacteria increases the risk of rheumatoid arthritis by affecting gut immune system. International Congress of Immunology 2016, Melbourne, Australia, August 24, 2016.

松田由実, 皆川高嘉, 高橋直紀, 佐藤圭祐, 横地麻衣, 山田実生, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久. 外傷性咬合により誘導される歯槽骨吸収に対する Resveratrol の影響. 第 144 回日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会, 宇都宮, 2016 年 6 月 10 日

佐藤圭祐, 高橋直紀, 中島麻由佳, 松田由実, 山田実生, 横地麻衣, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久. *Porphyromonas gingivalis* 口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析. 日歯周誌 58 巻 春季特別号 116 ページ. 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 鹿児島, 2016 年 5 月 20 日

松田由実, 高橋直紀, 中島麻由佳, 佐藤圭祐, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久. 結紮誘導歯周炎モデルマウスにおける全身への影響とそのメカニズムの解析. 第 49 回新潟歯学会総会, 2016 年 4 月 23 日

Matsuda Y, Minagawa T, Okui T, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Effect of Resveratrol on alveolar bone loss induced by the experimental occlusal trauma in mice: 63rd Annual meeting of JADR, Fukuoka, October 30, 2015.

Sato K, Takahashi N, Matsuda Y, Yamazaki K: Effects of *Prevotella intermedia*

administration on systemic inflammation in mice : The 11th APSP 2015, Bali, Indonesia, October 8, 2015

松田由実、高橋直紀、有松 圭、中島麻由佳、佐藤圭祐、多部田康一、中島貴子、山崎和久：歯周組織局所の炎症および *P. gingivalis* による腸内細菌叢の変動が全身に及ぼす影響とその分子機構の比較. 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会、浜松、2015.9.12

高橋直紀、有松 圭、中島麻由佳、松田由実、佐藤圭祐、多部田康一、中島貴子、加藤 完、大野博司、山崎和久. 歯周炎モデルマウスにおける腸内細菌叢の変動と免疫応答への影響. 第 19 回腸内細菌学会、東京、2015.6.18.

中島麻由佳、有松 圭、高橋直紀、皆川高嘉、松田由実、佐藤圭祐、中島貴子、多部田康一、山崎和久. *Porphyromonas gingivalis* 経口単回投与によるマウス腸内細菌叢の変動. 第 48 回新潟歯学会総会、2015.4.18.

〔図書〕(計 3 件)

山崎和久：ヒトマイクロバイオーム研究最前線(服部正平監修)第 5 編腸管以外のマイクロバイオームの生態と機能 第 1 章口腔マイクロバイオームの生態と機能 第 2 節口腔細菌が及ぼす腸内細菌叢への影響 - 歯周病と全身疾患の関連・腸内細菌叢 dysbiosis からの視点 - 331 - 342 ページ 株式会社エヌ・ティー・エス 2016 年 3 月 10 日

Kazuhisa Yamazaki. Chapter 15 New paradigm in the relationship between periodontal disease and systemic diseases: effects of oral bacteria on the gut microbiota and metabolism. 243-261 In: Eds; Luigi Nibali and Brian Henderson. John Wiley & Sons, Inc. Oxford, UK; 2016.

高橋直紀・山崎和久：腸内細菌・口腔細菌と全身疾患(落合邦康監修)【第 III 編 口腔細菌と疾患】第 14 章 腸内細菌叢への影響 195 - 203 ページ シーエムシー出版 2015 年 12 月 21 日

〔その他〕

ホームページ等

http://www.dent.niigata-u.ac.jp/yamazaki_lab

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大野 博司

ローマ字氏名：Hiroshi Ohno

所属研究機関名：国立研究開発法人・理化学研究所

部局名：生命医科学研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号(8桁)：50233226

研究分担者氏名：加藤 完

ローマ字氏名：Tamotsu Kato

所属研究機関名：国立研究開発法人・理化学研究所

部局名：生命医科学研究センター

職名：リサーチアソシエイト

研究者番号(8桁)：20632946