

令和元年6月17日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11444

研究課題名(和文) 歯周炎の誘導する早産発症過程におけるGalectin-3の役割に関する総合的研究

研究課題名(英文) An comprehensive study on the role of Galectin-3 in the preterm birth process induced by periodontitis

研究代表者

宮内 睦美 (Miyauchi, Mutsumi)

広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授

研究者番号：50169265

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)：広島大学病院妊婦症例156症例(早産46、正期産108)についてPg-FimA タイプ別血清抗体価、歯周炎活動度と早産の関係について解析した。Type II, IV, V 高値群は、歯周炎疾患活動度が高く、早産発症率もType I (オッズ比2.03)、Type II (1.88)と高値であった。よって、Type II との血清抗体価は、歯周炎関連早産の予測マーカーとなる可能性がある。一方、Gal-3血清抗体価は早産群で同時期の正期産群より有意に高く、一般的早産マーカーであった。In vitroでは歯周病原細菌は感染濃度依存的に胎盤細胞のGal-3、TNF- $\alpha$ などの早産関連因子の発現を増加させた。この作用はPgが最も強かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病原細菌特にPorphyromonas gingivalis (Pg)の歯性感染と早産との関係が明らかとなり、早産制御の戦略として、歯科治療の重要性を広く国民に知らしめる意義深い研究となった。特に、Pg FimA type II, IV, V 血清抗体価の歯周炎関連早産の予測マーカーとしての重要性を明らかにしたことは新たな検査方法の確立につながる。また、本研究で着目した血清Gal-3は歯周炎ばかりでなく多くの早産で上昇しており、Gal-3を標的とした診断システムや新しい治療戦略の開発にも展開可能である。よって、本研究は女性の健康増進ならびに新生児のQOLの向上に大きく貢献可能な社会的に意義ある研究である。

研究成果の概要(英文)：We enrolled 156 pregnant women of Hiroshima University Hospital (PTB:46, TB:108). They were segmented to Pg-Ab-titer low and high group (need periodontal treatment). The relations among periodontitis disease activity, Pg-Ab-titer and delivery outcome were examined. Type I, II, IV, V high groups showed higher PTB incident rate (Odds rates were 2.02, 1.66, 1.88, respectively). PISA and PESA scores were significantly increased in Type II, IV, V high groups. It was suggested that Type II and IV Pg-Ab-titer may be a potent predictive marker of periodontitis-induced PTB. In the case of pregnant woman with higher type II and IV Pg-Ab-titer, oral examination and followed periodontal treatment may be effective for preventing PTB. Whereas serum Gal-3 of PTB were significantly elevated than those of TB in 30-36W, indicating Gal-3 is general predictive marker of PTB. In vitro studies showed that periodontal pathogens induced PRB via production of PTB-related factors from infected trophoblasts.

研究分野：口腔病理学

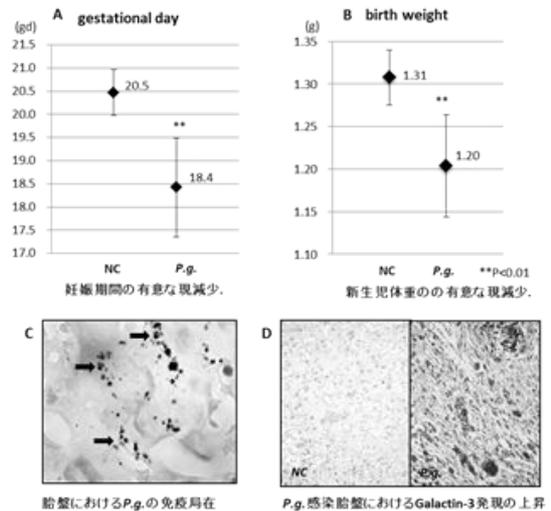
キーワード：早産マーカー 歯周炎 歯周病原細菌 Galectin-3 Pg血清抗体価 PISA 歯周炎活動度 早産関連因子

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

### 1. 研究開始当初の背景

早産は最も一般的な新生児の罹患や死亡の原因である。周産期死亡の **75%**が早産と関連し、新生児の長期疾患罹患児の約半数が早産である。早産の主な原因は妊婦の炎症である。近年、歯周病が早産や子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病などの危険因子であると、注目されている。妊婦の歯周炎と早産の関係については多くの疫学研究がなされているが、歯周炎妊婦では早産発症の危険率が **6倍**高いとする **Offenbuffer** らの報告や歯周病の罹患度と早産との間に有意な関連性はないとする **Davenport** らの報告など未だ異論が多い。また、早産の発症メカニズムについてもヒト妊婦慢性炎症を模倣する有用なモデルがないため不明な点が多く、有効な診断法や予防/治療方法も確立されていない。

我々は歯周病原細菌の一つである **Porphyromonas gingivalis(Pg)**をマウスの臼歯歯髄から感染させることで菌性感染モデルの作成に成功した(**Furusho et al. J Gastroenterol. 2013 Nov;48(11): 1259-70**)。このモデルを用い早産との関係を検討し、**Pg** 感染群は非感染群と比べて早産となり(妊娠期間 非感染群: 約 **20.5** 日、**Pg** 感染群: 約 **18.4** 日)、子宮内胎児発育遅延を認めた。また **Pg** 感染群では血清 **LPS** 濃度が上昇し、胎盤に **Pg** が高頻度に検出されたことから、**Pg** やその **LPS** によって誘導される慢性炎症が早産や子宮内胎児発育遅延の発症において強い関連がある可能性を報告した(**Ao et al. PLoS One. 2015 Aug 31;10(8):e0137249**)。興味深いことに **Pg** 感染胎盤では免疫調節因子として重要な役割を持つ **Galactin-3(Gal-3)** の発現が著明に亢進していた。**Gal-3** は胎盤細胞における **TNF- $\alpha$**  や **COX-2 PGE2** 合成酵素)の発現を促進するため、**Pg** の誘導する早産発症過程において **Gal-3** が重要な役割を果たす可能性を示唆した。さらに、**Gal-3** は羊水や血清中でも有意に上昇しており、血清中の **Gal-3** のモニタリングが早産の予測マーカーとなる可能性が示唆された。平成 **26-27** 年度萌芽研究では、**Gal-3** 抑制剤の投与は **Pg** 菌性感染による早産を抑制することを確認している。



### 2. 研究の目的

本研究では、広島大学病院受診の妊婦を対象に口腔内診査、血清、胎盤、の解析を行うことで、歯周病と早産の関係調べるとともに早産発症メカニズムにおける **Gal-3** の重要性を明らかにし、**Gal-3** を標的とした新しい早産の予防/診断システムや治療戦略構築のための基礎的データとすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1. 歯周炎と早産発症に関する臨床疫学的研究

広島大学病院産婦人科で健診並びに出産し、研究参加の同意が得られた妊婦を対象とし、以下の検討を行った。

##### 1. 歯周炎と早産の関与の検討

同意の得られた妊婦には出産後、歯周科にて口腔内診査 (**PESA**: 歯周ポケット面積、**PISA**: 炎症を伴う歯周ポケット面積の測定) と歯周病原細菌検出のための歯垢採取を行った。さらに **Pg-FimA** タイプ別血清抗体価を測定し、**Pg** 高値群と低値群に分け血清抗体価が歯周炎の状態を反映しているか、また歯周炎に関連した早産のマ-カ-になるかについて調べた。

P.g. low value group				P.g. high value group
A	B	C	D	E
Normal	Near normal	keep oral hygiene	Detailed examination needed	Have a periodontal treatment
<Ave	<Ave+1SD	>Ave+1SD	>Ave+2SD	>Ave+3SD

##### 2. 胎盤における歯周病原細菌の検出

PCR を用い **Pg-FimA** タイプ別に胎盤で検出される **Pg** を明らかにした。また、胎盤で **Pg** が検出されるかについて免疫組織化学的に検討した。

#### . 歯周炎関連早産と血清 Gal-3 値の関連性について

血清 **Gal-3** 値と早産の関係について調べ、血清 **Gal-3** が早産のマ-カ-になるかについて調べた。早産と関連が示唆されている他のマ-カ- (サイトカインや **CRP**) と比較し、**Gal-3** の有用性について検討した。

#### . 早産発症メカニズムにおける Gal-3 の役割の検討

**Pg** 菌性感染マウスモデルでは胎盤細胞への **Pg** 感染と壊死、胎盤細胞からのサイトカイン産生の上昇がみられ、その反応に **Gal-3** が関わる可能性が示唆された。そこで、胎盤細胞への **Pg**,

**Treponema denticola(Td), Tannerella forsythia(Tf), Fusobacterium nucleatum(Fn)**感染がサイトカイン発現に及ぼす影響と Gal-3 の関与を検討した。

#### 4. 研究成果

**.Pg - FimA type** の血清抗体価は歯周炎が関連する早産のマーカーになるか？

本研究に協力してくれた妊婦は早産 (PTB) 46 名 (平均 34 週) 正産 (TB) 108 名 (平均 38 週) の合計 154 名で、PTB の内訳は 35W が 35% で一番頻度が高く、次いで 36W の 27% であった。

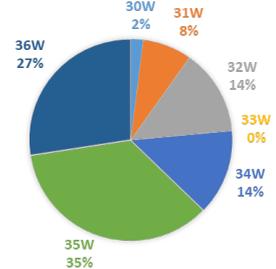
PESA				PISA			
P.g.-Ab-titer	p value	P.g. low	P.g. high	P.g.-Ab-titer	p value	P.g. low	P.g. high
Type I	0.116	1433.3	1579.2	Type I	0.061	215.9	364.7
Type II	<b>0.022</b>	1427.8	1629.9	Type II	<b>0.024</b>	213.4	387.1
Type III	0.124	1433.9	1548.5	Type III	0.079	215.0	344.3
Type IV	<b>0.020</b>	1420.3	1629.3	Type IV	<b>0.023</b>	201.0	426.4
Type V	<b>0.037</b>	1425.5	1581.6	Type V	<b>0.025</b>	206.2	377.5

**Pg FimA Type II,**

**Type IV** と **Type V** の値は有意に高値群が高く **Pg FimA Type II, Type IV** と **Type V** は、**歯周炎の疾患活動度のマーカー**となることが明らかとなった。

次に、血清抗体価高値 (歯周炎) 群と低値 (非歯周炎) 群で PTB の発生率を比較したところ、血清抗体価高値群では低値群に比べ罹患率が高く、そのオッズ比は、**Type1 = 1.22, Type2=2.03, Type3=1.63, Type4=1.89, Type5=1.31** で、**Pg FimA Type II, Type IV** の血清抗体価は早産のマーカーとなる可能性が示唆された。

PTB 出産週齢別割合

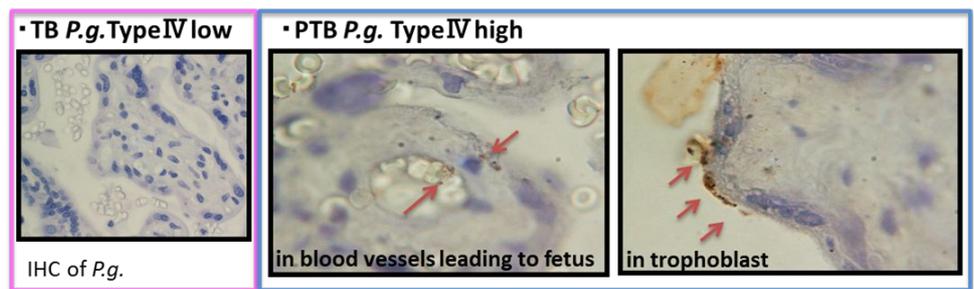


	Type1		Type2		Type3		Type4(W83)		Type5	
	PTB	TB	PTB	TB	PTB	TB	PTB	TB	PTB	TB
歯周炎+	10	20	12	16	9	14	12	17	8	15
歯周炎-	36	88	34	92	37	94	34	91	38	93
歯周炎+Odds	0.5		0.352941		0.243243		0.705882		0.210526	
歯周炎-Odds	0.409091		0.173913		0.148936		0.373626		0.16129	
Odds比	1.222222		<b>2.029412</b>		<b>1.633205</b>		<b>1.889273</b>		<b>1.305263</b>	

そこで、胎盤において **Pg FimA Type II** と **Type IV** の特異的な DNA や免疫局在が胎盤組織において検出できるか否かについて検討した。**Pg FimA Type IV** の胎盤組織において **44.4%** で DNA が検出されたが、血清抗体価正常群では検出されなかった。また、**Pg FimA Type IV** 血清抗体価高値群の胎盤では **Pg** の陽性所見が免疫組織化学的に認められた。血流を介して胎盤組織に移行し、感染していることが明らかとなった。陽性所見は、母親の欠陥に面する **Trophoblast** 表面から侵入し、胎盤の臍帯側の結合組織内にも検出され、胎児への感染も示唆された。一方、

**Pg FimA Type II**

血清抗体価高値群では、胎盤組織に **Pg FimA Type II** の高値群の胎盤には、**Pg FimA Type II** 特異的な遺伝子は検出されなかった。



よって、検査において **Pg-type** , **Type** の血清抗体価の高い妊婦では、**歯周炎の関係する早産を予防するために口腔診査と歯周治療を受ける必要性が示唆された。**

**.Gal-3** は、早産のマーカーとなるか？

**Pg FimA Type II** と **Type IV** の血清抗体価高値群で、歯周炎の状態を示す **PESA** と **PISA** の値は有意に高かったが、**PTB** 群と **TB** 群の **PISA/PESA** の値に有意な差は認められなかった。また、出産時の血清 **Gal-3** の値に **PTB** 群と **TB** 群で有意な差は認められなかった。そこで、**-19W, 30-36W, 37W** の 2 つの時期に分けて **Gal-3** 値を比較したところ、**TB** 群では **Gal-3** 値は経時的に徐々に増加し、出産時には **8.5ng/ml** と高くなることが明らかとなった。なお、**PTB** 群において出産時の **Gal-3** 値は **9.03ng/ml** で、同時期 (**30-36W**) の **TB** 妊婦の **Gal-3** の値 (**7.18ng/ml**)

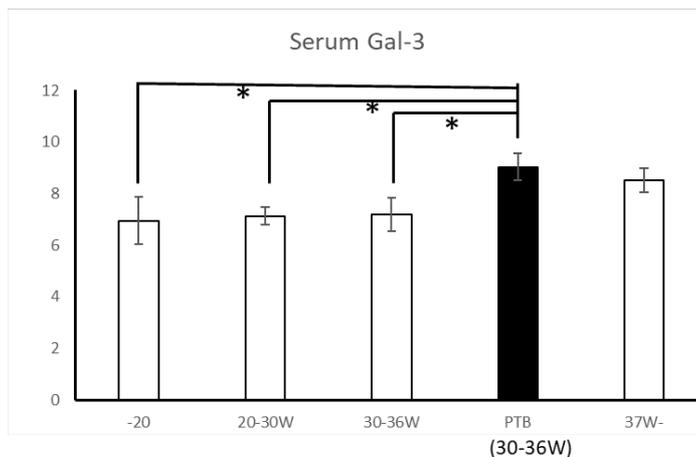
よりも有意に高い値を示した (  $p < 0.05$  )。

以上のことから、**Gal-3** は歯周炎関連早産だけでなく、一般的な早産のマーカーとなる可能性が示唆された。**Gal-3** を標的とした新しい早産の予防/診断システム構築の可能性が示された。

また、早産のマーカーとして報告がある **CRP** や **IL-1** についても検討したが早産との関連性は観察されなかった。

なお、**PTB** の中には **Gal-3** 上昇を伴わないものもみられたため、今後、症例を蓄積し **PTB** 原因別に **Gal-3** 上昇の有無を確認し、検査適応症を明らかにする必要がある。

	PTB		TB		p
PESA	1512.311 ±	443.3506	1455.144 ±	271.8397	0.418946
PISA	304.1087 ±	318.8816	268.1732 ±	277.3573	0.480171
Gal-3	9.027924 ±	3.677554	8.269389 ±	3.840974	0.27176



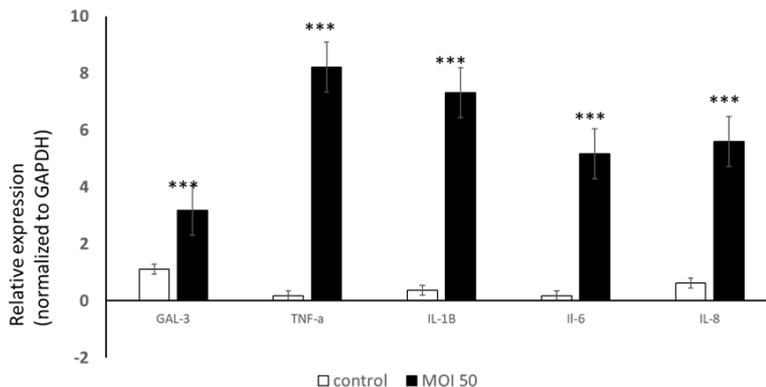
### ・ 早産発症メカニズムにおける **Gal-3** の役割の検討

胎盤細胞から産生される **Gal-3** が **PTB** を誘導するメカニズムについて、ヒト胎盤細胞株 (**HTR8**) を用いて検討したところ、**Pg** 感染により胎盤細胞の増殖は抑制され、**Gal-3** は **Pg** の胎盤細胞への感染率を高めることが明らかとなった。

また、胎盤細胞への **Pg**, **FN**, **Td** の感染は感染濃度依存的に、胎盤細胞からの早産関連因子

(**TNF- $\alpha$** 、**IL-8** や **COX-2**)

や **Gal-3** 産生を高め、早産に関与することが明らかとなった。( 図は **FN** による早産関連遺伝子の発現誘導を示す。)



## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

1. **Galectin-3 plays an important role in preterm birth caused by dental infection of Porphyromonas gingivalis: Miyauchi M, Ao M, Furusho H, Chea C, Nagasaki A, Sakamoto S, Ando T, Inubushi T, Kozai K, Takata T; Sci Rep, 査読あり, 8:2867, 2018.**

[ 学会発表 ] ( 計 11 件 )

1. **Serum antibody titer against FimA Type IV of Porphyromonas gingivalis is a possible marker for preterm birth cause by periodontitis: Takagi H, Frusho H, Miyauchi M, Ohara K, Fujita T, Urabe S, Kurihara H, Kudo Y, Takata T : 第 66 回国際歯科研究学会 日本部会総会・学術大会 ( 札幌 ), 2018 .**
2. **Suppression of Galectin-3 prevent preterm-birth by Porphyromonas gingivalis odontogenic infection: Furusho H, Miyauchi M, Konishi H, Urabe S, Kudo Y, Takata T: International Federation of Placenta Associations (IFPA) (Tokyo), 2018.**
3. **Porphyromonas gingivalis induces inflammation in amniotic mesenchymal cells: Konishi H., Urabe S., Teraoka Y., Miyoshi H., Miyauchi M., Takata T., Kudo Y: Society for Reproductive Investigation 65th Annual Scientific Meeting (San Diego), 2018.**
4. **Development of a prognostic/diagnostic examination system of preterm delivery, targeting serum galectin-3: Urabe S, Konishi H, Teraoka Y, Miyoshi H, Miyauchi M, Takata T, Kudo Y: Society for Reproductive Investigation: 65th Annual Scientific Meeting (San Diego), 2018.**

5. **Development of a prognostic / diagnostic examination system of preterm delivery targeting serum galectin-3: Urabe S, Konishi H, Teraoka Y, Miyoshi H, Miyauchi M, Takata T, Kudo Y** : 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会 ( 仙台 ), 2018 .
6. **Galectin-3 is possible predictive / diagnostic biomarker of spontaneous preterm birth caused by placental infection: Chou K, Miyauchi M, Furusho H, Sakamoto S, Takata T** : 第 65 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 ( 東京 ), 2017 .
7. **Dental infection of Porphyromonas gingivalis induces preterm birth through Galectin-3: Miyauchi M, Furusho H, Urabe S, Konishi H, Miyoshi H, Kudo Y, Takata T** : 第 69 回日本産科婦人科学会 ( 広島 ), 2017 .
8. **Galectin-3 抑制は Porphyromonas gingivalis 菌性感染による早産を予防する** : 石田えり, 長尾日香里, 趙 継美, 仏師田 丈, 坂本真一, 長崎敦洋, 古庄寿子, 宮内睦美, 高田 隆 : 第 23 回日本歯科医学会総会 ( 福岡 ), 2016 .
9. **血清 Galectin-3 を標的とした早産の予測・診断法の開発** : 宮内睦美, 高田 隆 : バイオジヤパン 2016 ( 横浜 ), 2016 .

〔図書〕(計 1 件)

歯周病 第 2 回 慢性菌性感染症と早産・低体重児出産 : 宮内睦美, 古庄寿子, 高田 隆 : Animus, 96 : アニムス編集委員会, 東京 : p.45-50, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 : 藤田 剛

ローマ字氏名 : **(FUJITA tsuyoshi)**

所属研究機関名 : 広島大学

部局名 : 医歯薬保健学研究科(歯)

職名 : 准教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : **80379883**

研究分担者氏名 : 占部 智

ローマ字氏名 : **(URABE satoshi)**

所属研究機関名 : 広島大学

部局名 : 病院(医)

職名 : 病院助教

研究者番号 ( 8 桁 ) : **10403536**

研究分担者氏名 : 古庄 寿子

ローマ字氏名 : **(FURUSHO hisako)**

所属研究機関名 : 広島大学

部局名 : 医歯薬保健学研究科 ( 歯 )

職名 : 助教

研究者番号 ( 8 桁 ) : **00634461**

### (2)研究協力者

研究協力者氏名 : 石原 和幸

ローマ字氏名 : **(ISHIHARA kazuyuki)**

研究協力者氏名 : 工藤 美樹

ローマ字氏名 : **(KUDO yoshiki)**

研究協力者氏名： 栗原 英見  
ローマ字氏名： **(KURIHARA hidemi)**

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、研究者個人に帰属されます。