

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09565

研究課題名(和文) 口腔内歯周病菌が腸管免疫・腸内細菌へ与える影響と炎症性腸疾患への関連性の解明

研究課題名(英文) Influence of oral periodontal disease bacteria on intestinal immunity and intestinal bacteria, and its relation to inflammatory bowel disease

研究代表者

竹田津 英稔 (Takedatsu, Hidetoshi)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：80352144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)は腸管に慢性の炎症をきたす自己免疫疾患であり、細菌が関与していることが示唆されている。私たちは、歯周病菌の菌種や菌量がIBDに与える影響について検討を行った。健康人、クローン病患者、潰瘍性大腸炎患者で検討を行ったところ細菌量について健康人と比較しクローン病に多いことが認められ、歯周病関連菌であるFusobacterium nucleatumは潰瘍性大腸炎に多く認められた。このFusobacterium nucleatumのマウスへの経口投与は腸管への直接的な影響を認めなかった。またDSS腸炎マウスに対し、同様に経口投与を行なったが、腸管炎症には直接的に影響を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は口腔内の慢性炎症であり、全身疾患や自己免疫疾患、特に慢性関節リウマチと強い関連性が示されている。歯周病菌とIBDの関連性を検討する必要性が考えられた。今回の検討では対象患者に歯周病はなかったが、口腔内菌量がクローン病に多いこと、Fusobacterium nucleatumが潰瘍性大腸炎に多く認められることが分かった。

Fusobacterium nucleatumのマウスへの投与に対する反応は有意な差を認めなかったが、引き続きFusobacterium nucleatumが腸管炎症にどのように関わっているかが明らかとすることでIBDの炎症増悪の原因解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease (IBD) is an autoimmune disease that causes chronic intestinal inflammation. Intestinal microbiota is involved in the pathogenesis of IBD. In this study, we investigated the effects of periodontal bacterial species on IBD patients. We found that the amount of bacteria was higher in CD than in healthy controls. Fusobacterium nucleatum associated with periodontal disease was found to be more abundant in UC. Furthermore, Fusobacterium nucleatum was orally administered to mice. However, no direct effect on the mesenteric lymph nodes or intestine was observed. Fusobacterium nucleatum was also orally administered to a mouse model of dextran sulfate-induced colitis, however no direct effects on enteritis or inflammatory responses were observed.

研究分野：消化管免疫

キーワード：炎症性腸疾患 歯周病菌

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease: IBD)は潰瘍性大腸炎(Ulcerative colitis: UC)とクローン病(Crohn's disease: CD)からなり、腸管に慢性の炎症をきたす自己免疫疾患である。1990年には3万人程度であった患者数は、近年約20万人と著しく増加している。原因については遺伝的、環境的、免疫的要因が複雑に関与していると考えられている。環境的要因の一つとして、腸炎マウスモデルが無菌状態では腸炎を発症しないことより、細菌がIBDの発症や増悪に関与していることが分かっている。

歯周病は口腔内の慢性炎症であり、糖尿病や動脈硬化、心臓血管障害、腎臓病や肥満など全身疾患の誘因となることが明らかになってきた。(Zoellner H, Semin Thromb Hemost 2011) また、自己免疫疾患、特に慢性関節リウマチと強い関連性があることが示された。(Kaur S, J Dent Res 2013) 歯周病患者において口腔内細菌量は1~10億個/mlといわれており、1日約1000億~1兆個の細菌を毎日摂取していることとなる。歯周病菌である *P. gingivalis* のマウスへの反復経口投与は、腸内細菌の変化をきたし、全身の炎症反応の増加や脂質・糖代謝異常を発症することが報告されており(Arimatsu K, Sci Rep 2014)、歯周病菌の菌種や菌量がIBDに与える影響を検討することは重要であると考えられた。実際に歯周病菌の一つとされる *Fusobacterium nucleatum* については、IBD患者の腸管組織にてその存在が認められており、またATM療法(amoxicillin, tetracycline, and metronidazole)にて *Fusobacterium* を除菌することがUCの治療に有効であるという報告もある。(Koido S, PLoS One 2014) しかし、IBDと歯周病の関連を明確に示した報告は少なく、2013年Vavrickaらは113名のIBD患者において健常人と比較し、歯周炎を高率に認めることのみが明らかとなっている。(Inflamm Bowel Dis 2013) また国内外で十分に研究されておらず、歯周病菌とIBDの関連性について明確にする必要があると考えられた。

2. 研究の目的

歯周病は自己免疫や炎症性疾患の発症や増悪に影響を与えることが報告されている。IBDは腸管に慢性の炎症をきたす自己免疫疾患であり、遺伝や免疫的因子の他に食事・腸内細菌などの多因子が発症や増悪に関与している。また、プレバイオティクスによる治療法や糞便移植による治療法も報告されており、IBDの治療において腸内環境を整えることが重要と考えられる。

口腔内細菌、特に歯周病菌は、絶えず口腔から腸管へ移行するため、腸管内細菌叢に影響を与える因子として重要である。近年、歯周病菌の一つである *Fusobacterium nucleatum* とIBDや大腸癌との関連性が報告されていることも腸内細菌に影響を与えている可能性を示唆しているが、その基礎的および臨床的研究報告はほとんどない。

本研究では歯周病菌感染が、IBDの病態そしてIBDの病勢に及ぼす影響について臨床的に検討する。また基礎的研究としてマウスに歯周病菌の経口投与を行い、腸管上皮や腸管免疫に与える影響および、腸炎モデルマウスを使用し、IBD発症や増悪との関連性について検討する。

3. 研究の方法

(1) IBD患者における歯周病菌の検討

福岡大学病院および久留米大学病院に通院中のUC患者20名、CD患者10名、コントロールとして健常人10名に対し検査を行った。対象者の口腔内における唾液よりDNAを抽出し、PCR-インベーター法にて菌を定量的に検査する。口腔内唾液中の総菌量の測定、および目的菌種は歯周病関連菌である(1) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (2) *Porphyromonas gingivalis* (3) *Prevotella intermedia* (4) *Tannerella forsythensis* (5) *Treponema denticola* (6) *Fusobacterium nucleatum* とした。1. 患者重症度 2. 背景情報、3. 血液検査 4. 内視鏡検査などの患者情報と歯周病菌の菌量・菌種について解析を行い疾患および疾患活動性との関連性について評価を行った。

(2) 正常マウスにおける *Fusobacterium nucleatum* に対する反応

IBDとの関連を示唆された *Fusobacterium nucleatum* の大量培養を行い、マウスに 1×10^8 個経口投与を行い、非投与と投与群で比較検討を行った。1回の投与後1週間後に解析、週2回投与で計4回投与を行い、非投与群と腸管膜リンパ節および腸管における消化管免疫の変化について解析を行った。

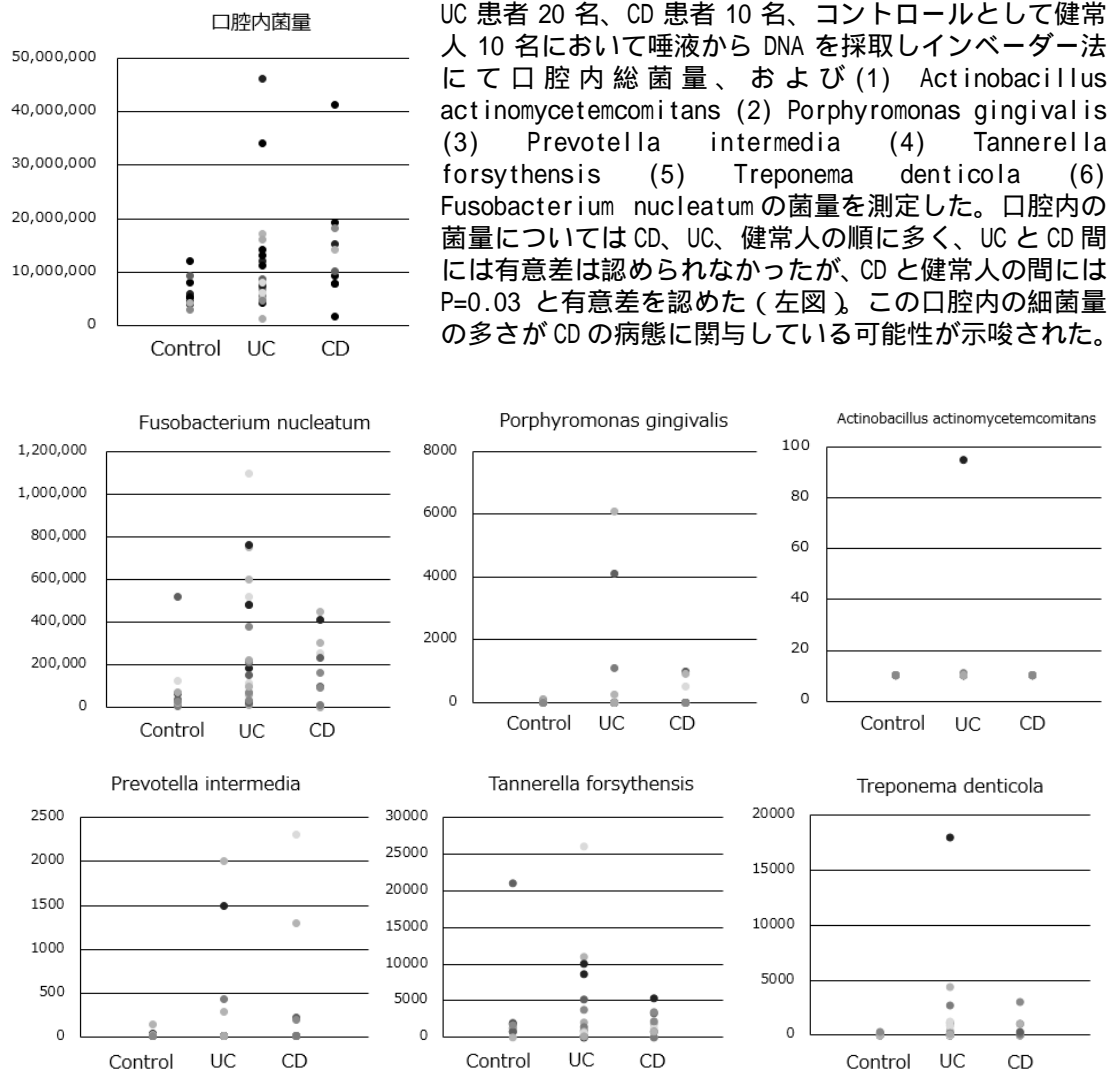
腸粘膜上皮における組織学的変化、腸間膜リンパ節および腸管におけるサイトカインをRT-PCRにて、投与群と未投与群の比較検討を行った。

(3) DSS腸炎モデルマウスにおける *Fusobacterium nucleatum* に対する反応

3%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を5日間飲水させたDSS急性腸炎モデルを使用し、 1×10^8 個の *Fusobacterium nucleatum* を経口投与することで腸炎がどのように変化するか、投与群と未投与群にて比較検討を行った。

4. 研究成果

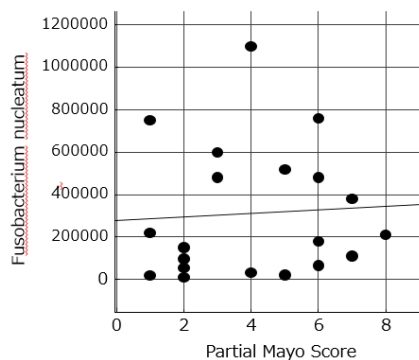
(1) IBDにおける歯周病菌の特徴



UC 患者 20 名、CD 患者 10 名、コントロールとして健常人 10 名において唾液から DNA を採取しインベーター法にて口腔内総菌量、および (1) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (2) *Porphyromonas gingivalis* (3) *Prevotella intermedia* (4) *Tannerella forsythensis* (5) *Treponema denticola* (6) *Fusobacterium nucleatum* の菌量を測定した。口腔内の菌量については CD、UC、健常人の順に多く、UC と CD 間には有意差は認められなかったが、CD と健常人の間には $P=0.03$ と有意差を認めた (左図)。この口腔内の細菌量の多さが CD の病態に関与している可能性が示唆された。

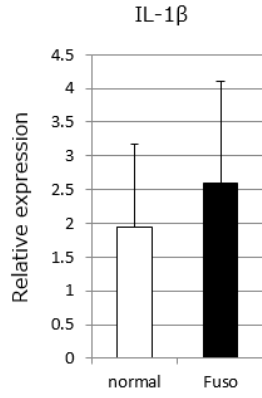
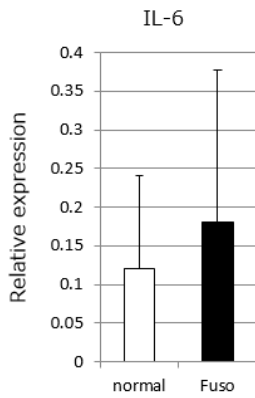
また、歯周病菌として特徴的とされる 6 種類の菌量についてそれぞれ測定を行ったところ *Fusobacterium nucleatum*、*Tannerella forsythensis*、*Treponema denticola* については UC、CD、健常人の順に多い傾向があった (上図)。*Fusobacterium nucleatum* については以前から報告がある通り、UC 患者に多く認められ、健常人と比較すると UC 患者で有意に菌量が多かった ($P = 0.042$)。その結果、歯周病菌の中でもとくに *Fusobacterium nucleatum* は UC と関連性が示唆された。

(2) *Fusobacterium nucleatum* と UC 疾患活動性との関連性について

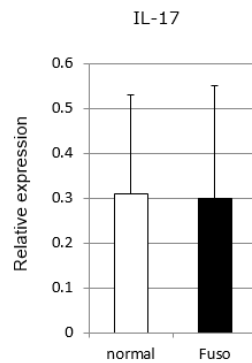
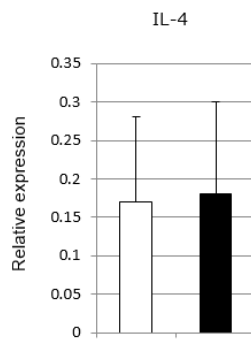
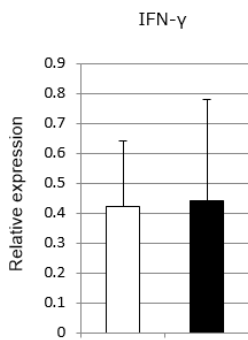


さらに私たちは *Fusobacterium nucleatum* の菌量と UC 疾患活動性との関連性について検討を行った。血小板数や ESR、CRP 値における炎症反応と菌量に相関は認められなかった。図は UC の疾患活動性を表す partial Mayo Score と菌量について相関を示している。相関係数は $r = 0.0634$ ($-0.3901 \sim 0.4921$) と有意な相関は認められなかった。

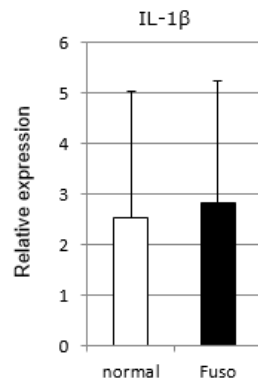
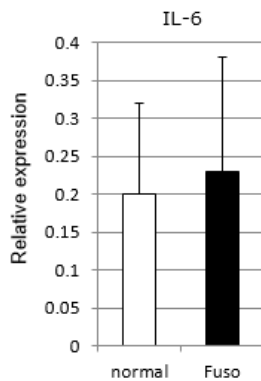
(3) Fusobacterium nucleatum 経口投与に対する反応について



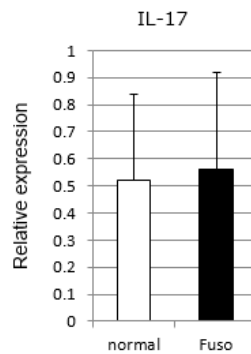
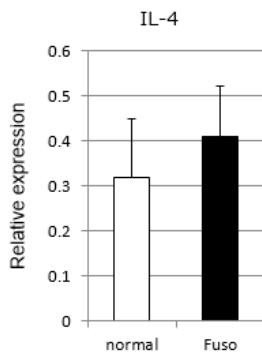
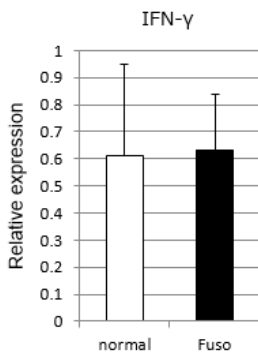
B6 マウスに 1×10^8 個の *Fusobacterium nucleatum* を経口投与し、1週間後に腸間膜リンパ節や腸管に対する影響について検討をおこなった。経口投与により腸間膜リンパ節の腫大や腸炎の発症は認められなかった。腸間膜リンパ節および腸管組織より RNA を抽出し、Real-time PCR にて炎症性サイトカインの変化について検討を行ったところ腸管において IL-6 や IL-1 について未投与群と比較するとやや発現の増加傾向は認められたが有意差はなかった。(左図)



さらに T 細胞系のサイトカインである IFN- γ 、IL-4、IL-17 の発現について検討を行ったところ未投与群と比較し有意な変化は認められなかった。(左図)

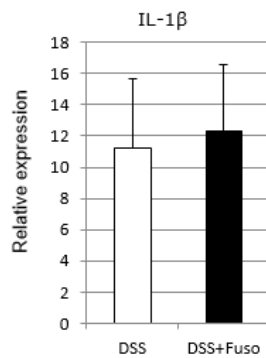
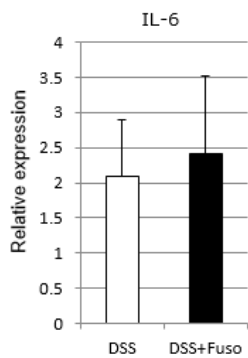
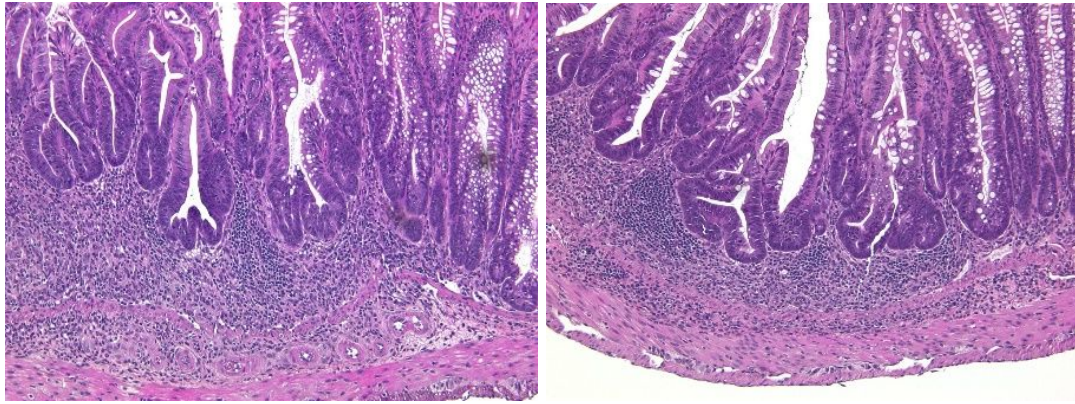


次に、B6 マウスに 1×10^8 個の *Fusobacterium nucleatum* を週 2 回の経口投与を行い、2週間後の反応について検討を行った。計 4 回にわたる投与にて腸管膜リンパ節および腸管における変化を確認した。同様に腫大や炎症は認めず、腸管からの炎症性サイトカインの発現にやや増加傾向が認められる程度の変化であった。(左図)

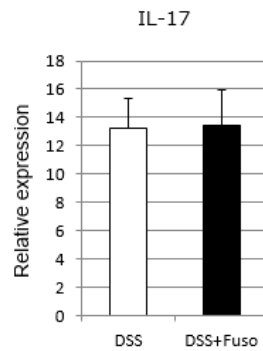
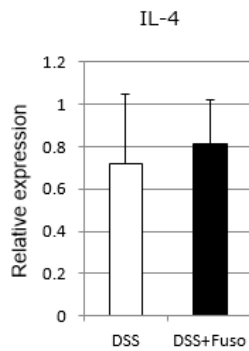
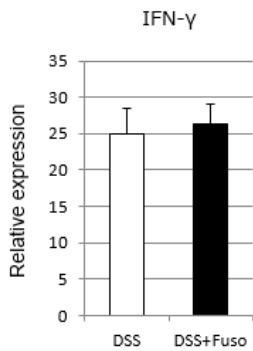


T 細胞系のサイトカインである IFN- γ 、IL-4、IL-17 の発現についても、未投与群と比較し変化は認められなかった。(左図)

(4) *Fusobacterium nucleatum* 経口投与による DSS 腸炎の反応



DSS 投与開始後 4 日目に 1×10^8 個の *Fusobacterium nucleatum* を経口投与し、1 週間後に腸炎に対する反応について検討を行った。
腸炎について肉眼的、組織学的に評価を行ったが、投与により明らかな変化は認められなかった。(左：未投与群、右：投与群)



腸間膜リンパ節および腸管組織より RNA を抽出し、炎症性サイトカインや T 細胞系のサイトカインについて比較したところ、有意な発現の増加は今回の研究では確認できなかった。(左図)

今回の結果より、CD 患者では健常人と比較し口腔内細菌の増加を認め、UC 患者では今までの報告同様に *Fusobacterium nucleatum* の増加が確認された。本研究は COVID19 の世界的な流行下にて行っていたため研究サンプルの協力に大きな制限があった。引き続き研究を継続し、口腔内細菌の増加や *Fusobacterium nucleatum* と UC の疾患活動性や特異性との関連性について検討を行う予定である。マウスの *Fusobacterium nucleatum* に対する反応については軽微にとどまっていた。今回は短期的な投与にて検討を行っており、引き続き長期的に投与を行い比較検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------