

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10089

研究課題名(和文) P.gingivalis 歯性感染による早期出産におけるTLR2の役割の解明

研究課題名(英文) The role of TLR2 in preterm birth caused by P.gingivalis odontogenic infection

研究代表者

向下 寿子(古庄寿子)(Mukoshita(Furusho), Hisako)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：00634461

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)：P.g. 歯性感染におけるTLR2経路の重要性を明らかにするために研究を行った。動物実験で、TLR2K0マウスを用いたP.g. 歯性感染モデルでは、早産は起きないことを明らかにした。細胞実験で、ヒト胎盤細胞のTLR2経路の阻害により、P.g. -LPS刺激やP.g. 感染による出産関連因子の発現が抑制されることを示した。実際の妊婦患者をP.g. 線毛に対する血清抗体価のうち、Type2および4の低値群と高値群に分け、出産後の胎盤で検討した。両群にTLR2発現を認め、高値群では出産関連因子の発現が上昇していた。以上より、P.g. 歯性感染により、誘導される早産にTLR2経路は影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では、妊娠中の口腔ケアにより、口腔環境を整え、歯周炎を予防することが早産の発症を抑制につながるとされ、社会的にも周知されつつある。しかしながら、歯周炎により早産が起こる機序やメカニズムについて明らかでないところも未だ多い。本研究において、歯周病原細菌の歯性感染により早産が引き起こされる機序にTLR2経路が関わることを示された。早産を制御するための戦略の一つとして歯科的アプローチを含め、TLR2を標的とした早産の予防・管理法が挙げられる可能性を示すことができた点で、学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the importance of the TLR2 pathway in P.g. dental infection. In vivo experiments, I used TLR2K0 mice and make the P.g. odontogenic infection model. In the model mice, it was not caused preterm birth. In vitro experiments, inhibition of the TLR2 pathway in human placental cells suppressed the expression of birth-related factors induced by P.g.-LPS stimulation and P.g. infection. In the patient's placentas after delivery, we divided the patients into two groups, low- and high-level group, according to serum antibody titers against P.g. fimbriae. I observed TLR2 expression in both groups and no difference, but the expression of birth-related factors was elevated in the high-level group. These results suggest that the TLR2 pathway affects preterm birth induced by P.g. gingival infection.

研究分野：歯周病と全身疾患

キーワード：P.gingivalis 歯性感染 早期出産

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における、早産率は年々増加し、1980年の4.12%から5.9%に上昇している。早産は、新生児の長期疾病や死亡のリスクを増加させるため、早産の予測や予防は必要不可欠であるが、その対処法は未だ確立されていない。早産の主な原因は、子宮内感染/炎症に伴う絨毛膜羊膜炎で、一般的な感染経路は経膈感染であるが、歯周炎のような母体の他部位に生じた軽微な持続的感染も早産原因として注目されている。歯周炎は世界で最も頻度の高い感染症で、30歳代でも約80%が歯周組織の異常を伴っている。Offenbacherらは歯周炎に罹患した妊婦では早産のリスクが7倍高いことを報告している(1996)。近年、歯周病患者妊婦の胎盤から単離した絨毛膜細胞で、*P.gingivalis*(*P.g.*)の検出、TLR2の発現上昇、炎症性サイトカインの発現上昇(Hasegawa-Nakamura. Periodontal research. 2011)が報告されたが、その詳細なメカニズムについて十分に明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

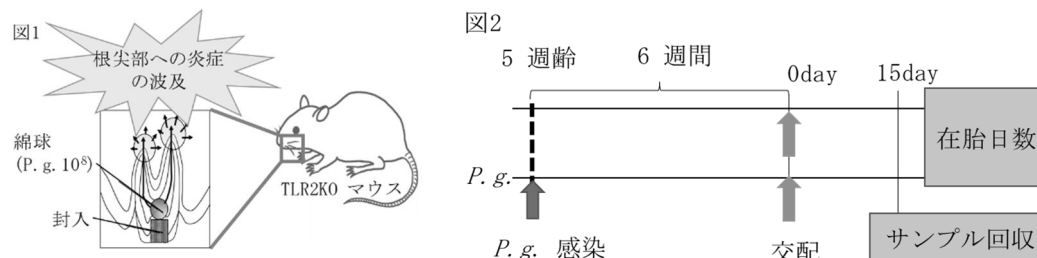
これまで *P.g.* 歯性感染マウスモデルを使い、*P.g.* が血流を介して胎盤に移行し、胎盤細胞の出産関連因子(TNF- $\alpha$ 、COX-2、Gal-3)の発現を促進して、早産を発症させること(Ao, Miyauchi, Furusho et al. PLoS One 2015) の際、*P.g.* 由来のリポポリサッカライド(LPS)が胎盤細胞に作用して、出産関連因子の発現を上昇させることを報告し(Miyauchi, Furusho et al. Scientific reports 2018)、*P.g.* 歯性感染の誘導する早産におけるTLR2(*P.g.*-LPSの受容体)経路の関与を示唆した。我々はこのモデルマウスを用いて、1)*P.g.* 歯性感染時に胎盤におけるTLR2発現上昇を介した出産関連因子の産生促進が早産発生に重要な役割を果たすか、2)TLR2の抑制が歯性感染の誘導する早産を予防できるか、さらに3)実際に歯周炎に罹患した妊婦の胎盤でTLR2発現の上昇と出産関連因子の産生増加がみられるか明らかにする目的で研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1)*P.g.* 歯性感染マウスモデルの胎盤におけるTLR2発現上昇を介した出産関連因子の産生促進が早産発生に果たす役割の解明

##### 1)TLR2ノックアウト(KO)マウスを用いた*P.g.* 歯性感染による早期出産におけるTLR2の関与についての検討

TLR2 KO (TLR2KO) 雌性マウスの半数に対し、上顎第1臼歯歯髄を歯科用切削器具(ラウンドバー)で露髄させたのち、*P.g.*(W83株)10<sup>8</sup>個を含ませた綿球を留置し、感染群(*P.g.*+群)とし(図1)、もう一方を非感染群とした(*P.g.*-群)。図2に示すように、感染6週後にTLR2KO雄性マウスと交配し、在胎日数を記録するとともに、妊娠15日後の胎児体重、胎盤、および母体の顎骨を回収し、下記の検討を行った。



#### TLR2KOによる在胎日数および胎児体重の変化の検討

TLR2KO *P.g.*(-)群および *P.g.*(+)群の在胎日数を比較し、これまでに得た野生型マウス *P.g.*(-)群および *P.g.*(+)群の在胎日数の変化と比較した。

#### TLR2KOにおける組織の変化の検討

##### ) TLR2 KOによる根尖部歯周組織の変化の検討

回収した顎骨により、第1臼歯近心根を含む標本を作成し、HE染色および抗 *P.g.* 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、根尖部歯周組織の変化を比較検討した。

##### ) TLR2KOマウス胎盤における *P.g.* の検出

回収したTLR2KOマウス胎盤組織からDNAを抽出し、PCR法を用いて *P.g.* の検出を試みた。また、胎盤組織の組織標本により抗 *P.g.* 抗体を用い、免疫組織化学染色を行い、組織学的に検討した。

### ）TLR2KO マウス胎盤組織変化の比較検討

回収した TLR2KO マウス胎盤の組織標本を作成し、HE 染色および出産関連因子 (TNF- $\alpha$ 、COX-2、Gal-3) 抗体を用い、免疫組織化学染色を行い、組織学的に比較検討した。

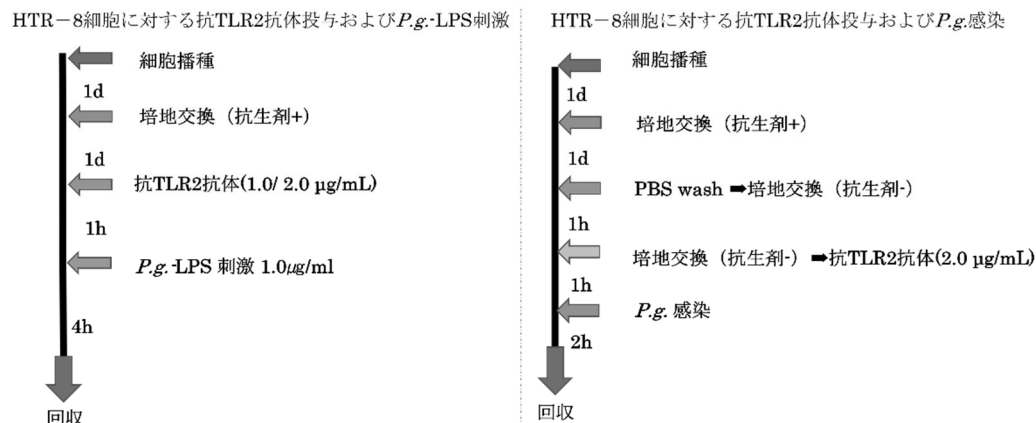
### ）TLR2KO マウス胎盤における mRNA 発現変化の比較検討

回収した胎盤から抽出した mRNA を用いて、PCR 法により出産関連因子 (TNF- $\alpha$ 、COX-2、Gal-3、KC (IL-8)) の発現の変化を比較検討した。

## (2) *P.g.*-LPS および *P.g.*生菌感染により誘導された炎症性サイトカイン発現への TLR2 阻害の及ぼす影響についての検討

ヒト胎盤細胞(HTR-8 株)を使用した。TLR 阻害には、抗 TLR2 抗体を作用させた (図 3)。

図3



### 1) *P.g.*-LPS 刺激における TLR2 経路の意義についての検討

刺激 1 日前に播種した HTR-8 細胞に対し、抗 TLR2 中和抗体により TLR2 阻害を行い、1 時間後に *P.g.*-LPS により刺激した。刺激 4 時間後に回収し、早産促進因子(Gal-3、TNF- $\alpha$ 、COX-2、IL-8)の mRNA 発現について検討した。

### 2) *P.g.*感染における TLR2 経路の意義についての検討

刺激 2 日前に播種した HTR-8 細胞は、1 日後に抗生剤なしの培地に交換し、1 日培養後、抗 TLR2 中和抗体により TLR2 阻害を行い、1 時間後に *P.g.* を感染させた (MOI(Multiplicity of infection) 25/50)。 *P.g.* を感染 2 時間後に回収し、炎症性サイトカイン mRNA 発現(Gal-3、TNF- $\alpha$ 、COX-2、IL-8) について RT-PCR で検討した。

## (3) 歯周炎罹患妊婦の胎盤における TLR2 発現上昇を介した出産関連因子の産生増加の検討

*P.g.*の線毛 (Fimbriae : Fim) には Type1 ~ 5 までである。特に病原性が高いとされるのが Type2 および 4 である。広島大学病院で出産し、かつ、歯科を受診した患者の Fim type1 ~ 5 の血清抗体価を測定、その結果から Type2・4 の血清抗体価の低い群 (Low 群) と高い群 (High 群) を選出した (各 20 例)。

### 1) 胎盤組織における組織学的変化の比較検討

両群の胎盤組織を使用し、TLR2、出産促進因子 (Gal-3、TNF- $\alpha$ 、COX-2)、*P.g.*の免疫組織化学染色を行い、TLR2 発現の有無、また出産関連因子の発現との関連について比較検討した。

### 2) 胎盤組織における出産促進因発現の変化の比較検討

両群の胎盤組織を使用し、mRNA を抽出し、TLR2、出産促進因子 (Gal-3、TNF- $\alpha$ 、COX-2) の発現について比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) *P.g.*菌性感染マウスモデルの胎盤における TLR2 発現上昇を介した出産関連因子の産生促進が早産発生に果たす役割の解明

#### 1) TLR2KO マウスを用いた *P.g.*菌性感染による早産における TLR2 の関与についての検討

##### TLR2KO による在胎日数および胎児体重の変化の検討

野生型マウス (WT マウス) では WT 感染群 (WT-*P.g.*(-)群): 20.5 日、WT 非感染群 (WT-*P.g.*(+)群): 18.25 日) で *P.g.* 菌性感染によって約 2 日の早産が起こる。一方、TLR2KO マウスでは、TLR2KO-*P.g.*(-)群の在胎日数が 20.16 日であったのに対し、TLR2KO-*P.g.*(+)群の在胎日数は 20.5 日で、TLR2KO-*P.g.*(+)群では早産は起こらなかった。

### TLR2KO における組織の変化の検討

#### ）TLR2 KO による根尖部歯周組織の変化の検討

根尖部歯周組織では WT-*P.g.*(+)群と同様、TLR2KO-*P.g.*(+)群でも、歯根肉芽腫を形成し、その大きさは WT-*P.g.*(+)群と大きな差はなかった。また、根管内および根尖病巣部において *P.g.* の免疫存在を確認した。

#### TLR2KO マウス胎盤における *P.g.* の検出

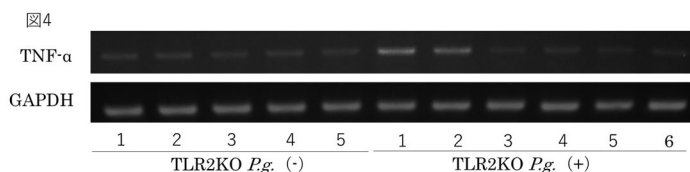
妊娠 15 日後の TLR2KO-*P.g.*(+)群胎盤組織より抽出した DNA から、今回使用した *P.g.* W83 株にも含まれている *P.g.* Fim-Type4 の遺伝子が検出されたが、TLR2KO-*P.g.*(-)群では検出されなかった。また、免疫組織化学的検討により、TLR2KO-*P.g.*(+)群胎盤の胎盤細胞に *P.g.* の存在を確認した。

#### TLR2KO マウス胎盤組織変化の比較検討

組織学的に、WT-*P.g.*(+)群胎盤と比較して TLR2KO-*P.g.*(+)群の胎盤組織内では壊死の程度が軽度であることを確認した。免疫組織化学染色において出産促進因子 (TNF- $\alpha$ 、COX-2、Gal-3) の発現を観察したが、TLR2KO-*P.g.*(-) / *P.g.*(+)群に差はなく、WT マウスで観察された *P.g.* 菌性感染による出産促進因子の明らかな発現上昇は認めなかった。

#### TLR2KO マウス胎盤における mRNA 発現の変化の比較検討

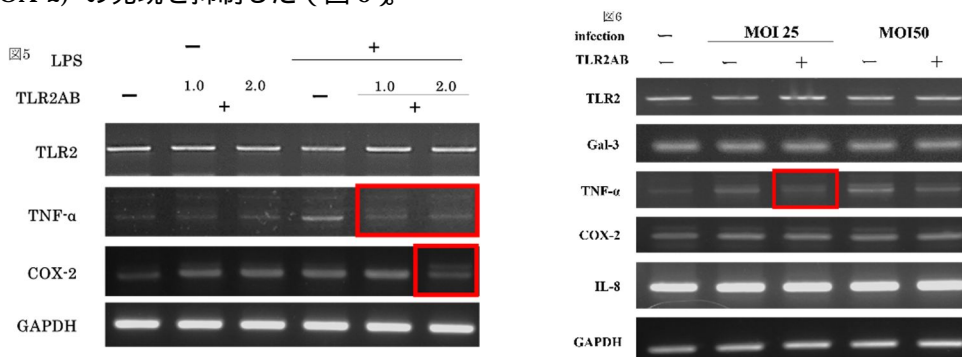
TLR2KO-*P.g.*(-) / *P.g.*(+)群の胎盤組織から抽出した mRNA では、TLR2KO-*P.g.*(+)群の複数のサンプルにおいて、TNF- $\alpha$  の発現上昇は抑えられていた (図 4)。Gal-3、COX-2、KC では抑制される傾向はみられなかった。



### (2) *P.g.*-LPS および *P.g.* 生菌感染により誘導された炎症性サイトカイン発現への TLR2 阻害の及ぼす影響についての検討

#### 1) *P.g.*-LPS 刺激における TLR2 経路の意義についての検討

TLR2 阻害を行った細胞では、*P.g.*-LPS により誘導される炎症性サイトカイン mRNA (TNF- $\alpha$ 、COX-2) の発現を抑制した (図 5)。



#### 2) *P.g.* 感染における TLR2 経路の意義についての検討

TLR2 阻害を行った細胞では、*P.g.* 感染により誘導される炎症性サイトカイン mRNA 発現 (TNF- $\alpha$ ) の発現を抑制した (図 6)。

### (3) 歯周炎罹患妊婦の胎盤における TLR2 発現上昇を介した出産関連因子の産生増加の検討

#### 1) 胎盤組織における組織学的変化の比較検討

Low/High 両群の胎盤組織において、免疫組織化学的に TLR2、及び Gal-3、COX-2 に変化はみられなかった。一方、TNF- $\alpha$  は *P.g.* 血清抗体価 High 群において、栄養膜細胞に強い TNF- $\alpha$  発現を示す検体も観察された。

#### 2) ヒト胎盤組織における出産促進因発現の変化の比較検討

Low/High 両群の胎盤組織で、TLR2mRNA 発現を認めたが、大きな差はなかった。また、出産促進因子 (Gal-3、COX-2、IL-8) の mRNA 発現にも変化はなかったが、複数の High 群検体で TNF- $\alpha$  発現上昇を認めた。

以上より、菌性感染病巣から胎盤に到達した *P.g.* 生菌特に *P.g.*-LPS によって誘導される早産に TLR2 経路は重要な意義を持つことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Konishi H, Urabe S, Miyoshi H, Teraoka Y, Maki T, Furusho H, Miyauchi M, Takata T, Kudo Y, Kajioka S	4. 巻 Jul;26(7)
2. 論文標題 Fetal membrane inflammation induces preterm birth via toll-like receptor 2 in mice with chronic gingivitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reprod Sci.	6. 最初と最後の頁 869-878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1933719118792097.	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 -
1. 著者名 Sasaki H, Furusho H, Rider DB, Dobeck JM, Kuo WP, Fujimura A, Yoganathan S, Hirai K, Xu S, Sasaki K, Stashenko P	4. 巻 Feb;45(2)
2. 論文標題 Endodontic infection-induced inflammation resembling osteomyelitis of the jaws in toll-like receptor 2/interleukin 10 double-knockout mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Endod.	6. 最初と最後の頁 181-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joen.2018.10.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyauchi S, Nakano Y, Ikeuchi Y, Okamura S, Okubo Y, Hironobe N, Tokuyama T, Shintani T, Hamamoto Y, Ouhara K, Furusho H, Kurihara H, Miyauchi M, Kihara Y	4. 巻 May;32(5)
2. 論文標題 Periodontitis and the outcome of atrial fibrillation ablation: Porphyromonas gingivalis is related to atrial fibrillation recurrence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cardiovasc Electrophysiol.	6. 最初と最後の頁 1240-1250.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jce.14952.	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 -
1. 著者名 Konishi H, Urabe S, Miyoshi H, Teraoka Y, Maki T, Furusho H, Miyauchi M, Takata T, Kudo Y, Kajioka S	4. 巻 Nov;28(11)
2. 論文標題 Correction to fetal membrane inflammation induces preterm birth via Toll-like receptor 2 in mice with chronic gingivitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reprod Sci.	6. 最初と最後の頁 3289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43032-021-00706-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高木ひかる, 古庄寿子, 宮内睦美, 應原一久, 藤田 剛, 占部 智, 新谷智章, 栗原英見, 工藤美樹, 高田 隆
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis(P.g.)FimA Type , Type の血清抗体価は歯周炎関連早産のマーカーになる
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maegawara S, Furusho H, Shintani T, K Ouhara, Naito M, Miyauchi M
2. 発表標題 Exploratory Study on Biomarkers for Preterm Birth Associated with Periodontitis
3. 学会等名 The 99th General Session of the IADR, the 50th Meeting of the AADR, and the 45th Meeting of the CADR (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究分担者	宮内 睦美  (Miyauchi Mutsumi)  (50169265)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授    (15401)	

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
---------	---------