

令和 2 年 5 月 25 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：2018～2019

課題番号：18H06274・19K21365

研究課題名（和文）歯周炎の病態に対する腸内細菌叢の影響と関連メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the effect of gut microbiota on periodontitis

研究代表者

佐藤 圭祐 (Sato, Keisuke)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：80828905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：歯周炎と全身性疾患との関連が報告されているが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究は、歯周炎の発症・進行に対する腸内細菌叢の影響とその関連メカニズムを解明することを目的とする。糞便移植により確立した異なる腸内細菌叢をもつマウスに、実験的歯周炎を誘導したとる、歯周炎の重症度に違いが認められた。また、腸内細菌叢・血清中メタボロームに変動が認められたが、口腔内細菌叢に変動は認めなかった。腸管免疫応答、腸管バリア機能に群間で有意差は認められなかった。以上より、歯周炎の発症・進行に腸内細菌の代謝産物が影響している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでに既存の歯周・全身疾患関連メカニズムとは全く異なる、歯周病原細菌による腸内細菌叢の変動を介して全身疾患のリスクが高まる説を世界に先駆けて報告している。本研究により、腸内細菌叢の変動が歯周炎の発症と進行に影響することが明らかとなれば、既存の歯周炎の病因論に大きなインパクトを与えらる。腸内細菌叢の変動が歯周炎の病態に及ぼす影響とそのメカニズムが明らかとなれば、腸内環境を整えることが歯周炎の発症、進行の予防に対する新たな標的候補となる可能性が示唆される。これは既存の歯周病学進展の一助となり、その学術的・社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：However periodontitis has been implicated as a risk factor for various systemic diseases, underlying mechanisms linking periodontitis and systemic diseases remain elusive. Therefore, the aim of this study is to investigate the effect of gut microbiota on periodontitis using fecal microbiota transplantation in combination with ligature-induced periodontitis in mice. Gut microbiota was isolated from feces of normal chow (NC)- and high-fat diet (HFD)- fed mice. We found that changes of the gut but not oral microbiota composition were observed between HFD and NC group. The degree of bone destruction was significantly greater in HFD group. Serum endotoxin and IL-17 levels were not different among the groups. However, Serum metabolic profiles were different among the groups. These results suggest that dysbiosis of gut microbiota could be a risk factor for periodontitis through modulation of responses to oral bacteria possibly by metabolites.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 腸内細菌 糞便移植 メタボローム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎がメタボリックシンドロームやリウマチ性関節炎など様々な全身疾患のリスクを高めることが多くの疫学研究、症例対象研究、動物実験により明らかにされている。そのメカニズムとして、歯周炎による全身性の軽微で持続的な炎症の誘導が重要であると報告されている。これまで、この全身性の炎症の誘導は、歯周炎組織で産生された炎症性メディエーターや歯周病原細菌が、歯周炎組織局所から全身循環へ流入することで惹起されると考えられてきたが、未だ不明な点も多い。一方、腸内細菌叢の変動と全身疾患の関連性が近年相次いで報告されている。(Vijay-Kumar M. et al. Science. 2010.)

我々は、この腸内細菌叢の変動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 $10^7 \sim 10^8$ の口腔内細菌が含まれている (Saygun I. et al. J Periodontal Res. 2011.) 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 (Koren O. et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2011.) 少なくとも一部は胃液による分解や変性を免れ腸管へ到達していることが明らかとされている。

そこで、嚥下された歯周病原細菌による腸内細菌叢の変動とそれに伴う内毒素血症が全身性の炎症を誘導すると仮説を立て、これまで用いてきた *Porphyromonas gingivalis* 口腔投与による歯周炎モデルマウスをベースに解析を行った。その結果、嚥下された歯周病原細菌により腸内細菌叢が変動し、それに伴い腸管透過性が亢進することで内毒素血症が誘導され、全身性の軽微な炎症が誘導されることが明らかとなった。我々は、この結果を歯周炎が全身疾患のリスクを高める新たなメカニズムとして、世界に先駆けて報告した (Arimatsu K. et al. Sci Rep. 2014.)

一方、糖尿病を有する患者では歯周炎症状が重症化することが報告されているように、歯周炎の病態は免疫能などの全身状態に影響を受ける。炎症性腸疾患モデルである DSS 誘導性腸炎マウスでは腸内細菌叢の変動と歯槽骨吸収の亢進が報告されている (Ohkawara T. et al. Gastroenterology. 2002.) 以上のことより、腸内細菌叢の変化あるいはそれに関連した炎症が歯周炎の発症・進行に影響している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

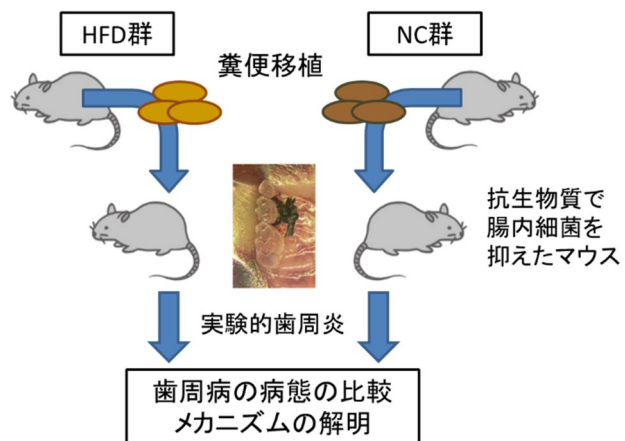
そこで本研究では、異なる腸内細菌叢を有するマウスを糞便移植により確立し、その後実験的歯周炎を惹起させることで、歯周炎の発症・進行に対する腸内細菌叢の影響とその関連メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌叢の違いが歯周炎の病態へ与える影響の解析

異なる腸内細菌叢をもつマウスを確立するために糞便移植を行う。糞便移植には、腸内細菌叢の変動と全身性の影響が報告されている高脂肪食給餌マウスの糞便 (High Fat Diet : HFD 群) と (Cani PD. et al. Diabetes. 2007.) コントロールとして普通食給餌マウスの糞便 (Normal Chow : NC 群) を使用する。その後、絹糸結紮法を用いて実験的歯周炎を惹起させることにより腸内細菌叢の違いが歯周炎の病態に与える影響について歯槽骨吸収に主眼をおいて解析する (図1)。加えて、口腔細菌叢の網羅的解析、歯周組織の炎症について生化学的・組織学的・遺伝学的解析等を用いて評価する。

(図1) 本研究の概要



(2) 腸内細菌叢の違いと歯周炎の病態との関連メカニズムの検討

腸内細菌叢の変動が全身疾患を進行させるメカニズムとして、腸管バリア機能の低下とそれに伴う腸内細菌由来内毒素の門脈を介した全身循環への流入による軽微な炎症の誘発、腸管免疫能のバランス崩壊による炎症誘発性 T 細胞 (Th17) の活性化、あるいは Th17 の活性を制御する機能を持つ T 細胞 (T-reg) の機能低下、腸内細菌による代謝産物の血流を介した免疫系・代謝系・内分泌系への影響が関連すると報告されている (Rooks MG. et al. Nat Rev Immunol. 2016.)。そこで、糞便移植後のマウス腸内細菌叢の網羅的解析に加えて、内毒素血症の評価および全身性の炎症の解析、腸管免疫応答に関する解析を行う。また、腸内細菌叢の変動に加えて代謝産物の影響の関与を明確にするため、マウス糞便中・血中のメタボローム解析を行う。

4. 研究成果

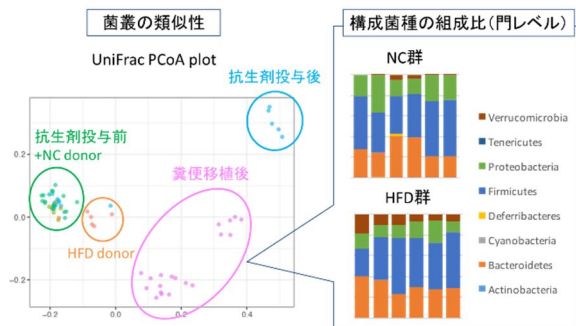
(1) 腸内細菌叢の違いが歯周炎の病態へ与える影響の解析

最初に、糞便移植により各群のマウスの腸内細菌叢の違いが生じているか検証するため、マウス糞便中菌叢解析を行った。UniFrac 解析により細菌の類似性を検証した結果、Donor として使用した普通食給餌マウスの糞便と高脂肪食給餌マウスの糞便では、菌叢の類似性が異なり、抗生

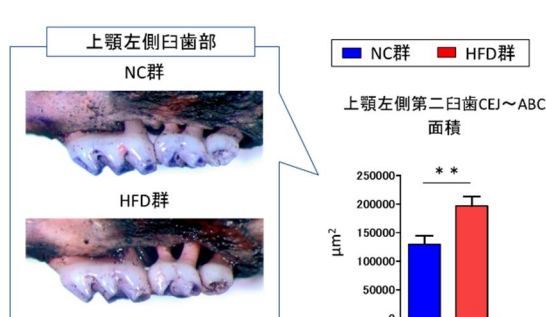
剤投与後と糞便移植後で菌叢の類似性が変化していることが確認された。また、糞便移植後の各群の構成菌種の組成比を比較すると、糞便移植により各群のマウス糞便中構成菌種の組成比に違いが生じていることが明らかとなった（図2）。

続いて、腸内細菌叢の違いが歯周炎の進行に与える影響を検証するために、各群の歯周病重症度の評価として上顎骨歯槽骨吸収の測定を行った。結果として、NC群と比較してHFD群で歯槽骨吸収の亢進が認められた。腸内細菌叢の違いが歯周炎の病態に影響している可能性が示唆された（図3）。

（図2）腸内細菌叢の評価



（図3）歯周病重症度の評価

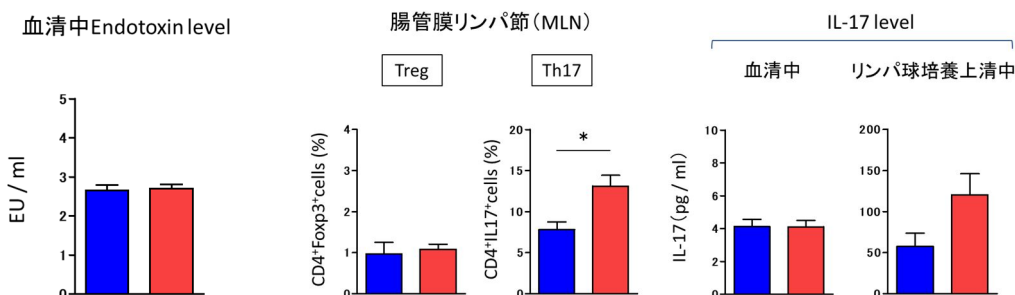


（2）腸内細菌叢の違いと歯周炎の病態との関連メカニズムの検討

最初に腸管バリア機能の評価として、各群の腸管組織のタイトジャンクションタンパク遺伝子発現解析を行った。結果として、腸管タイトジャンクションタンパクの遺伝子発現に群間で差は認めなかった。また、腸管バリア機能との関連が報告されている血清中エンドトキシンレベルについて解析を行ったところ、群間で差を認めなかった（図4）。次に、腸管免疫応答の評価として、腸間膜リンパ節のリンパ球 subset 解析を行った。リンパ球を単離後、PMA・Ionomycinで24時間刺激を行い、フローサイトメトリーを用いて解析を行ったところ、NC群と比較してHFD群で、腸管膜リンパ節におけるTh17細胞の割合の増加が認められたが、T-reg細胞の割合に変動は認めなかった。しかし、リンパ球培養上清中・血清中のIL-17レベルについて解析を行ったところ、各群でIL-17レベルに変動は認められなかった（図5）。したがって、本実験系において、腸内細菌叢の違いが歯周炎の病態に影響するメカニズムとして腸管バリア機能影響と腸管免疫応答の影響は少ないことが示唆された。

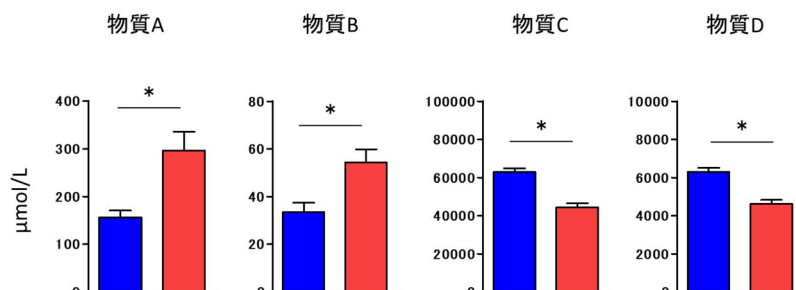
（図4）腸管バリア機能の評価

（図5）腸管免疫応答の評価



最後に、血清中メタボローム解析を行い腸内細菌代謝産物の評価を行った。結果より、いくつかの代謝産物で血清中の変動が認められた（図6）。歯周炎の進行に腸内細菌の代謝産物が影響している可能性が示唆された。

（図6）腸内細菌代謝産物の評価



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Keisuke, Yokoji Mai, Yamada Miki, Nakajima Takako, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 53
2. 論文標題 An orally administered oral pathobiont and commensal have comparable and innocuous systemic effects in germ-free mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 950 ~ 960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12593	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 -

1. 著者名 Okumura Go, Kondo Naoki, Sato Keisuke, Yamazaki Kazuhisa, Ohshima Hayato, Kawashima Hiroyuki, Ogose Akira, Endo Naoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Experimental arthritis and Porphyromonas gingivalis administration synergistically decrease bone regeneration in femoral cortical defects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56265-6	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 -

1. 著者名 Sato Keisuke, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 61
2. 論文標題 A novel mechanism linking periodontitis and rheumatoid arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (Journal of the Japanese Society of Periodontology)	6. 最初と最後の頁 142 ~ 147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.2329/periodo.61.142	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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Sato K, Matsuda Y, Yamada-Hara M, Yokoji M, Tsuzuno T, Matsugishi A, Yamazaki K, Tabeta T, Yamazaki K.
2. 発表標題 Dysbiosis of Gut microbiota aggravates experimental periodontitis.
3. 学会等名 97th General Session of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamazaki K, Sato K, Nakajima T, Muyazawa H, Takahashi N, Yamada-Hara M, Yokoji M, Yamazaki K
2. 発表標題 Dysbiosis of gut microbiome in Japanese patients with periodontitis
3. 学会等名 97th General Session of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤圭祐、松川由実、原 実生、竹内麻衣、都野隆博、松岸 葵、山崎恭子、多部田康一、山崎和久
2. 発表標題 腸内細菌の変動が歯周炎の発症・進行に与える影響の解析
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 山崎恭子、中島麻由佳、竹内麻衣、原 実生、都野隆博、松岸 葵、松川由実、佐藤圭祐、高橋直紀、多部田康一、山崎和久
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisがNASH病態に与える影響の解析
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 山崎恭子、中島貴子、宮沢春菜、伊藤晴江、佐藤圭祐、原 実生、竹内麻衣、高橋直紀、森田英利、須田 互、服部正平、山崎和久
2. 発表標題 歯周炎患者における腸内細菌叢の解析
3. 学会等名 第23回腸内細菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎恭子, 中島貴子, 宮沢春菜, 伊藤晴江, 佐藤圭祐, 原 実生, 竹内麻衣, 高橋直紀, 森田英利, 須田 互, 服部正平, 山崎和久
2. 発表標題 歯周炎患者唾液細菌叢が腸内細菌叢に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎恭子, 中島麻由佳, 竹内麻衣, 原 実生, 都野隆博, 松岸 葵, 松川由実, 佐藤圭祐, 高橋直紀, 多部田康一, 山崎和久
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisがNASH病態を進行させるメカニズムの解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年度秋季学術大会 (第151回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato K, Yokoji M, Yamada M, Nakajima T, Yamazaki K
2. 発表標題 The effect of Porphyromonas gingivalis oral administration in germ-free mice
3. 学会等名 66th Annual meeting of JADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato K, Takeuchi M, Hara M, Tabeta K, Yamazaki K
2. 発表標題 The effect of Porphyromonas gingivalis oral administration in germ-free mice
3. 学会等名 International Niigata-Taiwan Universities Collaborative Dental Research Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤圭祐、山田実生、横地麻衣、中島貴子、山崎和久
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis口腔投与が無菌マウスに与える影響の解析
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----