

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17586

研究課題名（和文）腸管ディスバイオシスによる移植免疫メカニズム

研究課題名（英文）Effects of periodontal pathogen-induced intestinal dysbiosis on transplant immunity in an allogenic skin graft model

研究代表者

野口 浩司（NOGUCHI, HIROSHI）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70844364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、歯周病菌による腸管ディスバイオシスを誘発したマウスに皮膚移植を行い、腸管ディスバイオシスが移植免疫に与える影響を調査した。Pg投与群とコントロール群に分け、Pg群には6週間のPg投与を行い、コントロール群には6週間のPBSを投与した。その後、両群に皮膚移植を行い、腸内細菌叢の変化や短鎖脂肪酸の測定、Tregs/CD4陽性T細胞比の測定を行った。結果として、Pg群では腸内細菌叢の変化や短鎖脂肪酸の増加、Tregs/CD4陽性T細胞比の上昇が認められ、さらに皮膚移植の生着日数が有意に延長された。これにより、歯周病菌による腸管ディスバイオシスが移植免疫に影響を及ぼす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

臓器や組織移植における拒絶反応に対しては免疫抑制療法が行われるが、抑制が過剰になると致命的な感染症を惹起する可能性がある。また拒絶反応には個人差があり、その要因として腸内細菌叢の関与が指摘されている。この研究では、歯周病菌による腸内細菌叢の変化を引き起こしたマウスに皮膚移植を行い、正常マウスと比較することで移植免疫に与える影響を調査した。結果、腸内細菌叢を変化させたマウスでは腸内の短鎖脂肪酸や血液脾臓中の免疫細胞に変化が起きており、皮膚移植の生着日数が有意に延長した。これにより、腸内細菌叢が移植免疫における個人差の原因となる可能性が示唆され、今後の免疫抑制療法の個別化につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Immunosuppressive therapy is used to treat rejection in organ and tissue transplantation, but excessive suppression can lead to fatal infections. There are individual differences in rejection, and the involvement of gut microbiota has been identified as a factor. In this study, skin grafts were performed on mice with altered gut microbiota caused by periodontal bacteria and compared to normal mice to investigate the effect on transplantation immunity. The results showed that mice with altered gut microbiota had altered short-chain fatty acids in the gut and immune cells in the blood spleen, which significantly prolonged the number of days of skin graft survival. This suggests that gut microbiota may be the cause of individual differences in transplant immunity, which may lead to the individualization of future immunosuppressive therapies.

研究分野：脾臓・腎臓移植外科

キーワード：移植免疫 臓器移植 腸内細菌叢 歯周病

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植は末期臓器不全患者の一般的な治療法である。しかし、ほとんどの移植レシピエントはドナー臓器の急性拒絶反応を防ぐために生涯にわたる免疫抑制薬の内服を必要とし、感染・悪性腫瘍・薬物毒性の影響を受けやすくなる。また移植後患者は急性拒絶反応の発生率や発症するタイミングには個体差がある。この個体差に寄与する要因を解明することが、移植後臓器の生着を向上するカギとなる。

移植免疫と歯周病との関連を示すいくつかの臨床研究報告があり、これらの結果は歯周病が移植免疫に影響を与えることの可能性を示唆している。歯周病が移植免疫に影響を与えるメカニズムはまだ不明な点が多いが、歯周病は移植免疫の個体差の要因の1つである可能性がある。

歯周病は、口腔内の細菌叢のバイオフィームの変化によって引き起こされる一般的な感染性の慢性炎症性疾患であり、歯槽骨の炎症性骨吸収により歯周組織の破壊と歯の喪失につながる。さらに歯周病は、肥満・糖尿病・非アルコール性肝疾患・癌などさまざまな全身疾患の発症または悪化と関連している。歯周病が全身性に炎症を誘発するメカニズムの1つは、歯周病病原細菌を飲み込むことによる腸内細菌叢の構成変化である。“腸管ディスバイオシス”は、「一連の環境要因および宿主関連要因によって引き起こされる腸内細菌叢の構成および機能的変化」と定義され、歯周病はディスバイオシスを誘発しうる。

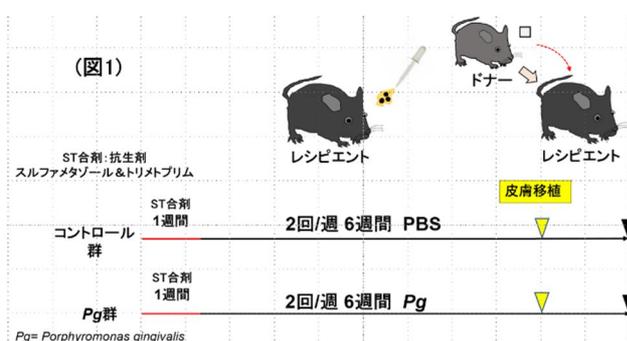
腸内細菌叢は複雑な微生物の生態系であり、腸内細菌叢と宿主の間の相利共生関係を維持することは、ヒトの健康にとって重要である。腸内細菌叢は、移植された移植臓器の運命を決定する免疫応答において重要な役割を果たし、移植臓器の免疫寛容や逆に移植臓器への拒絶につながる可能性がある。

### 2. 研究の目的

我々の研究ではマウスに *Pg* を経口投与した同種異系皮膚移植モデルを使用し、歯周病病原細菌経口投与による腸管ディスバイオシスの移植免疫への影響を調べた。今回の我々の研究の目的は、*Pg* を経口投与した同種皮膚移植モデルマウスを用いて歯周病菌による腸管ディスバイオシスの移植免疫への影響を検討し、腸管代謝物である短鎖脂肪酸(SCFAs)と Treg が歯周病と移植免疫の関係を媒介する分子メカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

移植免疫に対する歯周病関連腸内細菌叢の影響を調べるために、マウスを *Pg* 群とコントロール群の2群に分けた。*Pg* 群のマウスは *Pg* を週2回6週間経口投与し、コントロール群のマウスはリン酸緩衝食塩水(PBS)を週2回6週間経口投与した。その後、両群共に同種異系皮膚移植を行った。図1は、研究デザインを示している。



両群間の腸内細菌叢の変化を調べるために、移植前に盲腸から糞便サンプルを収集し、16s rRNA シークエンス分析を実施して、両群の腸内細菌叢およびまた腸管代謝物である SCFAs を解析した。末梢血サンプルまたは脾臓細胞中の Treg をフローサイトメトリーで分析

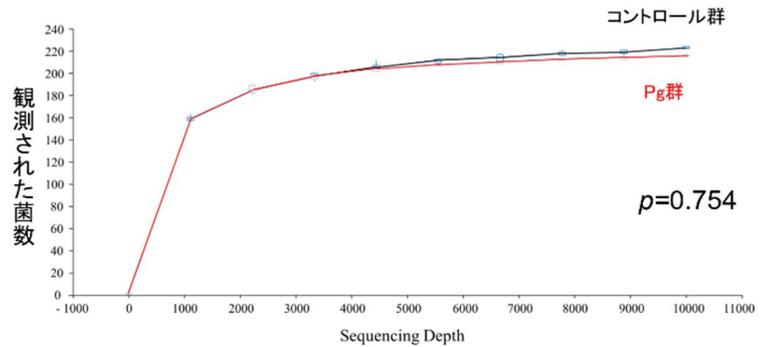
した。レシピエントマウスには *Pg* または PBS を 6 週間経口投与した後、皮膚移植を行い生着期間を調べた。さらに移植後 8 日目の移植皮膚グラフトへの炎症浸潤を病理学的に評価した。

#### 4. 研究成果

##### ・*Pg* 菌の経口投与は、短鎖脂肪酸産生菌を増加させた

多様性の指標の 1 つであ

る Observed Features は、コントロール群と比較して *Pg* 群で減少する傾向を示したが、有意な変化は認めなかった(補足図 1)。図 2a に示すように、多様性の指標である unweighted Uni-Frac 値が、主座標分析としてプロッ



補足図1 Observed Features

トされた。多様性の結果と同様に、*Pg* 群の unweighted UniFrac の主座標分析はコントロール群とは異なる傾向を示したが、両群間に有意差はなかった( $p = 0.181$ )。

##### Unweighted Uni-Frac

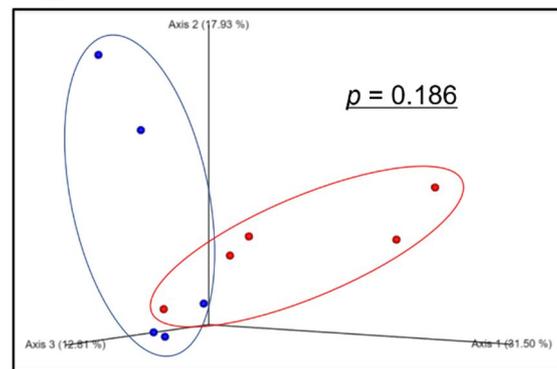


図2a ● コントロール群 ● *Pg*群

図 2b は目(order)レベルでの腸内細菌叢の構成を示した。一方、属レベルでの解析の結果では両群で 87 の属が検出され、両群間で 6 つの属の相対存在量に有意差を認めた。有意差を認めた 6 つの属の相対存在量の結果を図 2(c)-(e)で示した。*Alloprevotella* ( $p = 0.007$ )、

*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group* ( $p = 0.042$ )、*Oscillibacter* ( $p = 0.033$ )、および

*Parasutterella* ( $p = 0.043$ ) の相対存在量は、コントロール群よりも *Pg* 群で有意に高いという結果であった。一方で *Lachnospiraceae\_FCS020\_group* ( $p = 0.046$ ) と *Enterorhabdus* ( $p = 0.042$ ) の存在量は、コントロール群よりも *Pg* 群で有意に低いという結果であった。*Alloprevotella*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、および *Oscillibacter* は SCFAs

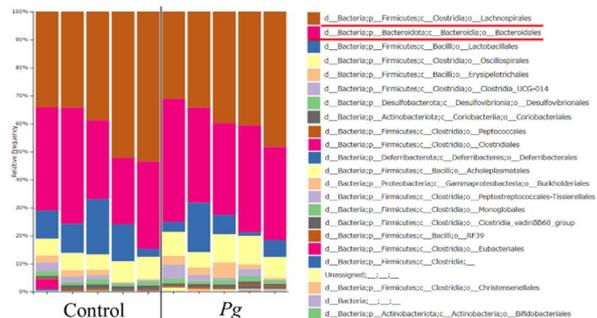


図2b

産生菌であり(27,28)、これらの結果は、コントロール群と比較して *Pg* 群で SCFAs 産生菌が有意に増加したことを示した。

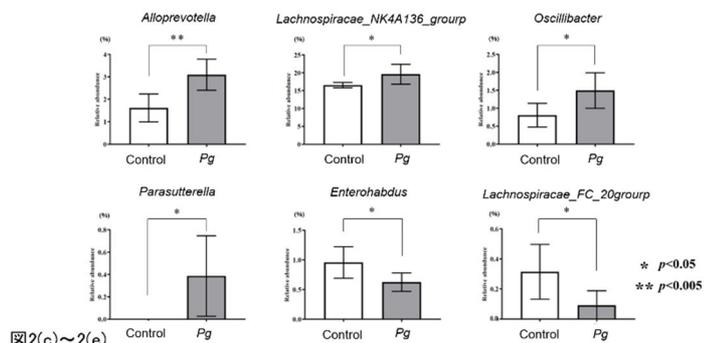


図2(c)~2(e)

・ *Pg* 菌の経口投与は、糞便中の SCFAs のレベルを有意に増加させた

SCFAs 産生菌の存在量が *Pg* 群で有意に増加したため、*Pg* 群とコントロール群の糞便の腸管代謝産物である SCFAs 濃度の測定のためにガスクロマトグラフィーを用いて測定した (図 3)。

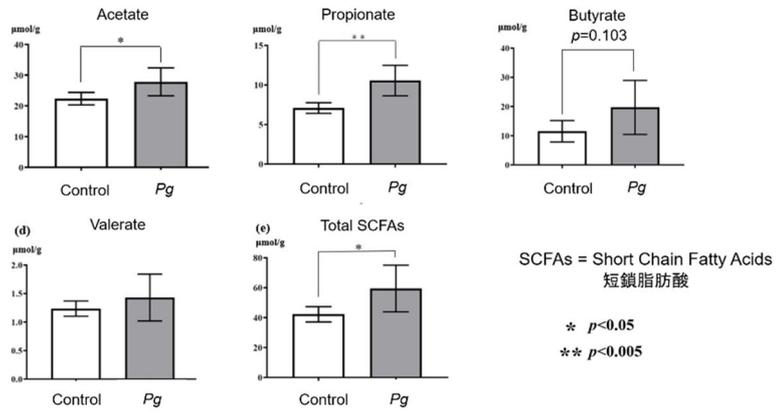


図3

酢酸の濃度は、コントロール群よりも *Pg* 群で有意に上昇していた (2.4 ± 2.0 μmol/g vs 27.8 ± 4.5 μmol/g, p = 0.04)。

プロピオン酸の濃度も同様に、コントロール群よりも *Pg* 群で有意に上昇していた (7.1 ± 0.7 μmol/g vs 10.6 ± 1.9 μmol/g, p = 0.005)。一方酪酸の濃度は、コントロール群よりも *Pg* 群で約 1.7 倍高かったがこの差は有意ではなかった (11.5 ± 3.7 μmol/g vs 19.7 ± 9.3 μmol/g, p = 0.103)。吉草酸の濃度は、コントロール群よりも *Pg* 群でわずかに上昇していた (1.2 ± 0.1 μmol/g vs 1.4 ± 0.4 μmol/g, p = 0.344)。カプロン酸は両群で検出されなかった。全ての SCFAs の濃度の合計である総 SCFAs 濃度は、コントロール群よりも *Pg* 群で有意に上昇していた (42.2 ± 5.1 μmol/g vs 59.5 ± 15.6 μmol/g, p = 0.047)。

・ *Pg* 菌の経口投与は末梢血および脾臓中の Treg/CD4 陽性 T 細胞比を増加させた

*Pg* 群における SCFAs レベルの増加が Treg 比に影響を与えたかどうかを判断するために、*Pg* 群の末梢血および脾臓中の CD4 陽性 T 細胞中の Treg (CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> 細胞) 比をフローサイトメトリーにより測定した (図 4)。末梢血での Treg 比は、コントロール群よりも *Pg* 群で有意に高いと

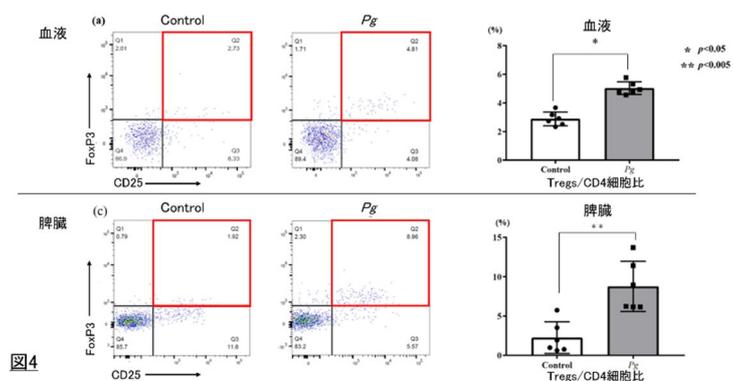


図4

いう結果であった (2.88 ± 0.48% vs 5.03 ± 0.44%, p = 0.002)。同様に脾臓の Treg 比は、コントロール群よりも *Pg* 群で有意に上昇していた (2.26 ± 2.01% vs 8.77 ± 3.20%, p < 0.001)。

・ *Pg* 菌の経口投与は皮膚移植グ

ラフトの生着を延長させた

*Pg* 群の Treg/CD4 比の割合の増加が皮膚移植グラフトの生存に影響するかどうかを調べるために、同種マウス皮膚移植を両群で実施した (図 5a)。コントロール群では、皮膚移植グラフトの生存期間の中央値は 7 日 (範囲: 6 ~ 9 日) であったに対し、*Pg* 群では皮膚移植グラフトの生存期

間の中央値は、11 日 (範囲: 8 ~ 22 日) であった。*Pg* の経口投与は皮膚移植グラフトの生着率を有意に延長させた ( $p < 0.001$ )。

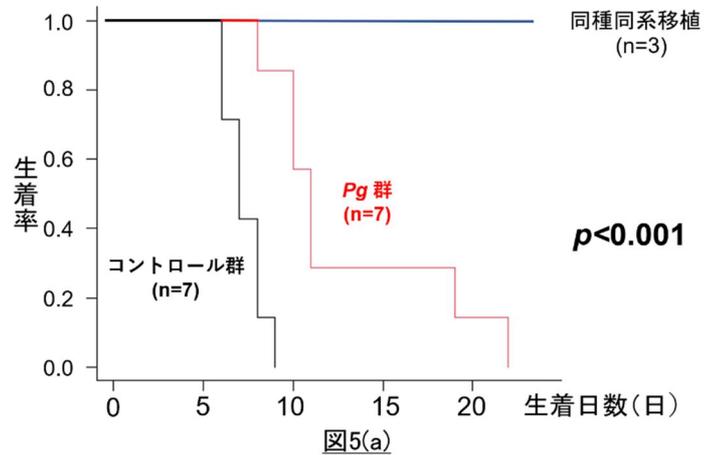


図5(a)

・ *Pg* 菌の経口投与は移植皮膚の炎症を軽減した

皮膚移植後 8 日目に、皮膚移植グラフトの炎症の程度を病理組織学的に評価した (ヘマトキシリン / エオシン染色: H & E)。 *Pg* 群の皮膚移植グラフトは、コントロール群の皮膚移植グラフトよりも炎症細胞浸潤が少なかった (図 5b)。また図 5c に示すように、*Pg* 群はコントロール群と比較して炎症細胞浸潤の程度が有意に低かった ( $p < 0.001$ )。

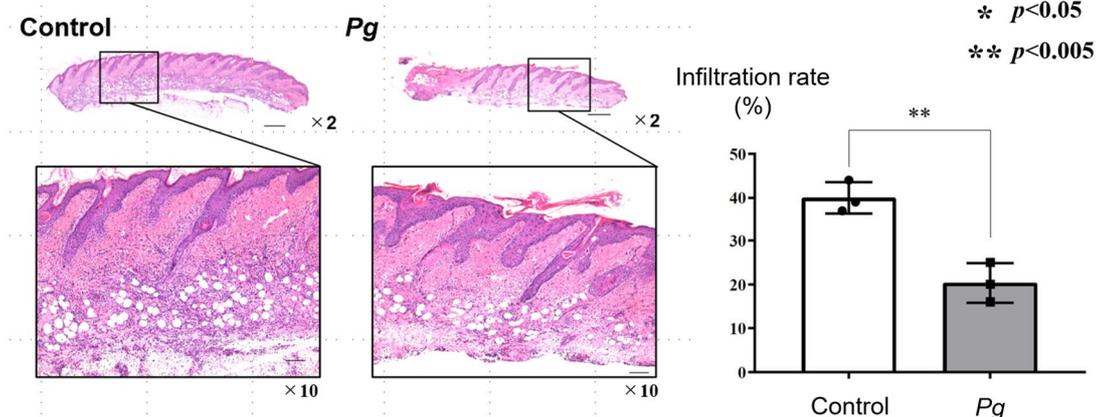


図5(b)

図5(c) 方法: Sadri, G et al. Matrix Biology (2022)

結論として、我々の研究では SCFAs 産生菌の増加を伴う歯周病病原菌誘導の腸管ディスバイオシスが、SCFAs 濃度と Treg 比の増加により移植免疫に影響を与える可能性があることを示唆している。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Mei Takanori, Noguchi Hiroshi, Kuraji Ryutaro, Kubo Shinsuke, Sato Yu, Kaku Keizo, Okabe Yasuhiro, Onishi Hideya, Nakamura Masafumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of periodontal pathogen-induced intestinal dysbiosis on transplant immunity in an allogenic skin graft model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-27861-4	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 目井 孝典、野口 浩司、倉治 竜太郎、佐藤 優、加来 啓三、岡部 安博、大西 秀哉、中村 雅史
2. 発表標題 歯周病病原菌を用いた腸管ディスバイオシスによる移植免疫への影響の解明
3. 学会等名 第122回 日本外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目井 孝典、大西 秀哉、佐藤 優、坂梨 深太、岩本 直也、長尾 晋次郎、益田 昌吾、中村 雅史
2. 発表標題 歯周病病原菌誘導の腸管ディスバイオシスによる移植免疫への影響の解明
3. 学会等名 第35回 日本バイオセラピー学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takanori Mei, Hiroshi Noguchi, Ryutaro Kuraji, Shinsuke Kubo, Yu Sato, Keizo Kaku, Hideya Ohnishi, Yasuhiro Okabe, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Effects of periodontal pathogen-induced intestinal dysbiosis on transplant immunity in an allogenic skin graft model
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目井 孝典、大西 秀哉、佐藤 優、岩本 直也、長尾 晋次郎、益田 昌吾、古賀 智子、中村 雅史
2. 発表標題 歯周病病原菌を用いた腸管ディスバイオシスによる移植免疫メカニズムの解明
3. 学会等名 第34回日本バイオセラピー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 目井 孝典、野口 浩司、倉治 竜太郎、佐藤 優、加来 啓三、岡部 安博、大西 秀哉、中村 雅史
2. 発表標題 歯周病病原菌を用いた腸管ディスバイオシスによる移植免疫への影響の解明
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目井孝典、大西秀哉、長尾 晋次郎、益田昌吾、古賀智子、一宮脩、藤岡寛、中山和典、中村雅史
2. 発表標題 歯周病病原菌を用いた腸管ディスバイオシスによる移植免疫メカニズムの解明
3. 学会等名 第33回日本バイオセラピー学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 目井孝典、大西秀哉、野口 浩司、倉治 竜太郎、佐藤 優、久留 裕、加来 啓三、岡部 安博、中村 雅史
2. 発表標題 歯周病原細菌誘導腸管ディスバイオシスによる移植免疫への影響
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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