様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６年　６月　６日現在

機関番号：１４４０１

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：２１Ｋ０９９１６

研究課題名（和文）歯周病菌が腸内細菌と胆汁酸の代謝経路に及ぼす影響

研究課題名（英文）The effects of periodontopathic bacteria on intestinal microbiota and metabolic pathways of bile acids

研究代表者

柏木　陽一郎（Kashiwagi, Yoichiro）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：２０５９８３９６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：腸内のディスバイオシスが糖尿病の病態に影響を与えているとの報告が近年なされるようになっているが、その作用機序の詳細は十分に説明されていない。そこで歯周病から糖尿病への影響について、口腔から腸管内にディスバイオシスが誘導された影響は、門脈経由でまず肝臓に伝播すると考え、これまで糖尿病モデルマウスに対して、代表的な歯周病菌であるPorphyromonas gingivalis（Pg）を経口投与するモデルに応用した。その結果、体重に変化はなかったが、腸内細菌叢の変動と血糖の有意な上昇を見出し、肝臓および胃においてタンパクおよび代謝物の有意な変動を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
これまでの歯周病菌による全身への影響としては、野生型マウスにおいての非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）病変、つまり肝臓における炎症について比較的多く報告されており、菌血症を想定したものや、腸内細菌叢の変調に対する現象としても報告されている。しかしながら、糖尿病の病態である糖代謝異常に対する歯周病の影響に焦点をあてて、その直接的なメカニズムを明らかする研究はいまだ十分にはなされておらず、菌叢変化に伴う代謝性因子を詳細に解析する試みについては本研究が初めてとなる。

研究成果の概要（英文）：Recent papers have reported that intestinal dysbiosis affects the pathogenesis of diabetes mellitus, however, the details of its mechanism of action have not been fully cleared. We hypothesized that the effect of periodontal disease on diabetes mellitus would be transmitted from the oral cavity to the intestinal tract via the portal vein to the liver first. The results showed no change in body weight. As a result, we found no change in body weight but found fluctuations in the intestinal microbiota, a significant increase in blood glucose, and significant changes in protein and metabolites in the liver and stomach.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病菌　糖尿病　腸内細菌　ディスバイオシス

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

歯周病と糖尿病は、双方向性に影響していることが様々な研究から明らかにされている。糖尿病の病態である高血糖状態では、歯周組織においても免疫担当細胞の機能低下による歯周病菌の増殖により炎症が悪化すると考えられている。これまでに、宿主要因である糖尿病が歯周病に及ぼす影響として、高血糖による局所での炎症、特に歯肉上皮細胞の炎症反応の増強作用機構を明らかにしてきた。一方で、歯周病が糖尿病に影響を及ぼすメカニズムについて、特にその糖代謝異常に対する具体的な修飾メカニズムに関していくつかの仮説が存在するも、まだその詳細は十分明らかにされていないことに着目した。

ヒトの口腔内には、700 種類以上の細菌がバイオフィルムを形成して棲息している。特に歯周ポケットに付着するバイオフィルムは、口腔衛生状態不良が続くと嫌気性菌の比率が増し、ディスバイオシスの状態となる。歯周病は、このディスバイオシスが原因となって生じる慢性炎症性疾患と捉えることが出来る。興味深いことに、この歯周病が心血管疾患、脳梗塞、糖尿病、早期低体重児出産、関節リウマチ、アルツハイマー認知症などの全身疾患に悪影響を及ぼす可能性が報告されてきた。さらに歯周病と全身をつなぐ経路としては、①局所の感染による菌血症、②慢性的に過剰産生された炎症性サイトカインの血流への流入、加えて、近年になって、③飲食時等に相当量の口腔内細菌が食道から消化管へと移行し、腸内細菌叢に変調をきたすことで、全身状態に影響すると報告されてきた。

一方で、糖尿病はインシュリンの供給低下と感受性低下に基づく慢性高血糖を主徴とする代謝性疾患群と定義され、骨格筋や脂肪組織でのグルコース取り込みの低下とともに、肝臓における糖新生の亢進とグリコーゲン合成の抑制が高血糖増悪の重要なメカニズムであることが知られている。また、腸内のディスバイオシスが糖尿病の病態に影響を与えているとの報告が近年なされるようになっているが、その作用機序の詳細は十分に説明されていない。そこで、歯周病から糖尿病への影響について、口腔から腸管内にディスバイオシスが誘導された影響は、門脈経由でまず肝臓に伝播すると考え、これまでに Baker らが報告したマウス口腔から歯周病菌を嚥下感染させるモデル（*Arch Oral Biol.*1994）を参考に、糖尿病マウスに対して、代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis*（*Pg*）を投与するモデルに応用した。その結果、体重に変化はなかったが、腸内細菌叢の変動と血糖の有意な上昇を見出した。近年、口腔および腸内細菌叢のメタゲノムによる菌叢解析は進んでいる一方で、同細菌叢の個人差および菌種のバリエーションが多様なため、特定の菌のプロフィールの差異による全身への影響を十分説明出来るかについては疑問が残り、歯周病の全身状態に対する作用を詳細に説明できる分子機序の解明は発展途上である。

２．研究の目的

歯周病の糖尿病への影響の検討において、糖尿病マウス(db/db)を用いた実験系において、歯周病菌嚥下による腸内細菌叢の変化と肝臓での糖新生亢進について確認している。そこで、本研究計画は、腸内細菌の変動による消化管内の変化が全身の代謝に影響するとの報告に着目した。すなわち、肝臓における糖新生亢進と相関して変化する消化管内代謝物を網羅的に解析し、歯周病の糖尿病増悪メカニズムに関与する候補分子の抽出を目的としている。
歯周病菌が他の食物栄養素と共に消化管へ到達する事により腸管部で細菌叢の平衡状態に変調をきたし、腸管内で特異的な代謝産物が産生されることで、門脈を経て肝臓に流入する物質が異常をきたし、歯周病が腸管を介して肝臓での糖代謝異常に関与するメカニズムであるとの仮説をたて、それを検証することを具体的な目的とする。

３．研究の方法

Baker らが報告したマウス口腔から歯周病菌を嚥下感染させるモデルを参考に、7～11 週齢の db/db マウスに *Porphyromonas gingivalis* （Pg）菌懸濁液（1×10^9 CFU）を 2.5 %カルボキシメチルセルロース(carboxymethyl cellulose, CMC)に希釈し、100 µl ずつ口腔内より注入することを 3 日毎に 30 日間行い歯周病感染モデル、とした。経時的に摂餌量と体重、血糖値を測定した。最終投与から 3 日後に安楽死処置を施して顎骨を採取し、マイクロ CT 解析を行い歯周 骨吸収度合いの比較検討を行った。肝臓組織から mRNA を抽出し realtime-PCR 法にて遺伝子発 現変化を検討し、タンパク発現変化についてはウェスタンブロット法と免疫染色法にて検討し た。さらに、肝臓および糞便に対して液体クロマトグラフィー質量分析法にてプロテオーム解析 を行い、胃及び小腸に対してはガスクロマトグラフィー質量分析法にてメタボローム解析も行い、代謝物に関して網羅的な解析を行った。

４．研究成果

同マウスの小腸内容物に対するメタボローム解析により、対照群と比較して、*Pg* 投与マウスにおいて、腸内代謝物に顕著な違いを認め、12 種類の親水性代謝物が有意に上昇し、35 種類の親水性代謝物が有意に減少し、ポリアミン関連分子群の有意な低下が明らかになった。

さらに、肝臓における代謝への影響について検討するために、同上モデルマウスから採取した肝臓を用いてプロテオーム・メタボローム両解析を行った。その結果、*Pg* 投与群の肝臓におけるグリコーゲン量の減少と糖代謝の中間代謝物（ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸、3-ホスホグリセリン酸）の増加およびクエン酸回路に関する酵素（イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、α-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ）の減少が認められた。これらはグリコーゲン分解の亢進とミトコンドリア内のエネルギー代謝の低下を示しており、*Pg* の口腔からの嚥下により経腸管的に肝臓内における糖新生の亢進が惹起されていることが裏付けられた（図１）。これらのことは歯周病による糖尿病の悪化のメカニズムの一つとして、糖新生の亢進が強く関係していることを示している。

また、超網羅的メタボローム解析プラットフォームを用いて、Pg を投与した野生型マウスおよび糖尿病モデルマウス（db/db）の胃に対して、大規模定量的メタボローム解析を実施した。得られた胃のメタボロームデータをもとに主成分分析あるいは Pg 投与前後の代謝変動を評価した。その結果、野生型マウスと db/db マウスの代謝プロファイルは大きく異なるものの（図２）胃においては、Pg 投与による明らかな変動は認められなかった。

以上より、肝臓での代謝変動が歯周病による腸内細菌の変動を介した糖尿病への影響に関与する臓器であることが明らかとなった。今後は腸内変動と肝臓の変化をつなぐメカニズムを明らかにする研究を進める予定である。

図１

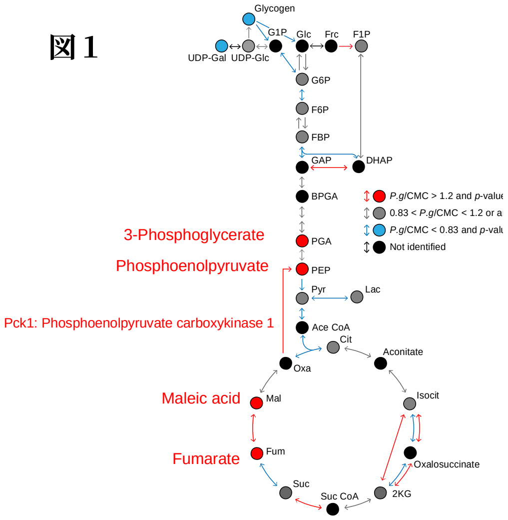
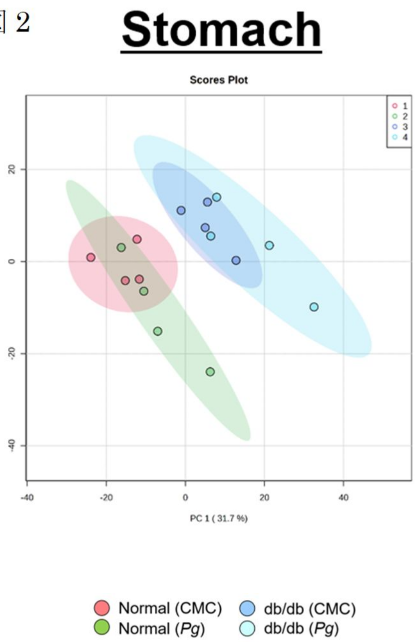


図 2



Baker, P. J., Evans, R. T. & Roopenian, D. C. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. Arch Oral Biol 39, 1035-1040, doi:10.1016/0003- 9969(94)90055-8 (1994).

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　2件）

1．著者名 Kashiwagi Yoichiro、Aburaya Shunsuke、Sugiyama Naoyuki、Narukawa Yuki、Sakamoto Yuta、Takahashi Masatomo、Uemura Hayato、Yamashita Rentaro、Tominaga Shotaro、Hayashi Satoko、Nozaki Takenori、Yamada Satoru、Izumi Yoshihiro、Kashiwagi Atsunori、Bamba Takeshi、Ishihama Yasushi、Murakami Shinya	4．巻 11
2．論文標題 Porphyromonas gingivalis induces entero-hepatic metabolic derangements with alteration of gut microbiota in a type 2 diabetes mouse model	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 18398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97868-2	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 Kataoka Shinsuke、Kimura Mitsuo、Yamaguchi Tsuguno、Egashira Kenji、Yamamoto Yu、Koike Yasushi、Ogawa Yuki、Fujiharu Chika、・・・、Kashiwagi Yoichiro、Kitamura Masahiro、Hayashi Takeshi、Nakagawa Tohru、Murakami Shinya	4．巻 21
2．論文標題 A cross-sectional study of relationships between periodontal disease and general health: The Hitachi Oral Healthcare Survey	5．発行年 2021年
3．雑誌名 BMC Oral Health	6．最初と最後の頁 644
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-021-01990-6	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 Narukawa Yuki、Sugiyama Naoyuki、Miura Jiro、Yamashita Rentaro、Tominaga Shotaro、Izumi Yoshihiro、Bamba Takeshi、Ishihama Yasushi、Kashiwagi Yoichiro、Murakami Shinya	4．巻 58
2．論文標題 Chronic hyperglycemia reduces the expression of intercellular adhesion molecules and increases intercellular hyperpermeability in the periodontal epithelium	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Journal of Periodontal Research	6．最初と最後の頁 813～826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.13140	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 －

〔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
研究分担者	和泉　自泰 (Izumi Yoshihiro) (70622166)	九州大学・生体防御医学研究所・准教授 (17102)	
研究分担者	三木　康史 (Miki Koji) (10598395)	大阪大学・歯学部附属病院・助教 (14401)	
研究分担者	沢田　啓吾 (Sawada Keigo) (70733054)	大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員 (14401)	

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