

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16968

研究課題名（和文）Pg感染が腸管dysbiosisを通じて糖尿病の病態に与える影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effects of Pg infection on the pathogenesis of diabetes through intestinal dysbiosis

研究代表者

芥川 桂一（Akutagawa, Keiichi）

広島大学・医系科学研究科（歯）・専門研究員

研究者番号：40826369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、歯周病原細菌*P. gingivalis*の感染、う蝕原因菌*S. mutans*歯髄感染に着目し、腸内細菌叢の破綻から糖尿病増悪への影響と血行性感染から脳出血への影響について動物実験モデルを用いたメカニズム解明を行った。*P. gingivalis*感染糖尿病マウスでは、糖尿病マウスと比較して、パイエル板の肥厚と、腸内細菌叢の変化が認められた。また、*S. mutans*感染ラットモデルでは、細胞外基質typeI、typeIVコラーゲンを介した血管内皮細胞へ細菌が強固に付着することで脳出血部位の拡大が認められた。これらのメカニズム解明が、口腔内治療の重要性や新規治療法開発につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果から、歯周病やう蝕と行った口腔感染症が足がかりとなり、歯周組織から血行性に、または消化管を通して腸内細菌叢へ影響を与えることが明らかとなった。これら局所の変化が全身へ波及（全身疾患の発症、増悪）することも示唆されたことから、今後歯科受診、歯科治療の重要性を国民に周知するための根拠となる結果である。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we focus on periodontal pathogen *P. gingivalis* infection and caries-causing bacteria *S. mutans* dental pulp infection. We elucidated the mechanism using an animal model. *P. gingivalis*-infected diabetic mice had thickened Peyer's patches and altered gut microbiota compared with diabetic mice. In addition, in a rat model infected with *S. mutans*, expansion of cerebral hemorrhage was observed due to strong adhesion of bacteria to vascular endothelial cells via extracellular matrix type I and type IV collagen. Elucidation of these mechanisms is expected to lead to the importance of oral treatment and the development of new treatment methods.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯周炎 糖尿病 う蝕 脳出血

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は *P. gingivalis* (Pg) をはじめとした口腔内細菌による感染症である。また、歯周組織では細菌感染によって微小構造が破壊され炎症が引き起こされる事で、局所の血管が拡張し細菌が血中に侵入する菌血症の病態を呈する (Support Care Cancer. 2013)。さらに、これまでの研究から腸内細菌の変化が全身疾患に影響することが報告されている (Nakajima M, et al. PLoS One, 2015)。Pg の感染は、糖尿病 (DM) ・動脈硬化 ・アルツハイマー病 ・関節リウマチ ・慢性腎疾患 ・早産 ・低体重児出産と関連があることが報告されている (Exp Mol Pathol. 2016, J Int Oral Health. 2015, Curr Oral Health Rep. 2015)。したがって歯周炎と全身疾患は直接的、間接的経路の原因が考えられている。直接的な経路は細菌による血管侵入であることに対して、間接的経路は細菌成分や、歯周組織で産生された炎症性サイトカインが血行性に循環器系に乗り、血行性に各臓器に移行する経路がある。歯周炎と並んで、歯科の2大疾患である、う蝕に関しても口腔内の細菌がエナメル質の脱灰、象牙質への侵入、歯髄への感染を介して血行性に全身に移行することがわかっている。菌体成分や、歯周組織で産生された炎症性サイトカインも同様に移行する。本研究では、近年着目されている Pg の歯周組織感染、う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* の歯髄感染が糖尿病 (DM) の病態憎悪や脳出血に与える影響するメカニズムを、局所免疫応答、炎症反応に着目して解析する。Pg 感染に関しては、腸管の dysbiosis に影響を与えるのではないと考え、Pg 感染糖尿病マウスを使用して評価する事で、Pg 口腔感染が糖尿病の病態に与える影響を明らかにすることを目的とした。特に、Pg 感染マウスモデルの腸内細菌叢の解析に重点を置いて検討し、病態解明につながる知見を得た。

2. 研究の目的

本研究では、Pg 感染 DM マウスを使用して Pg のセグメント細菌と Th17 細胞および腸管の dysbiosis を介すると考えられる常在自然リンパ球系への影響を評価する事で、Pg 口腔感染が糖尿病の病態に与える影響を明らかにすることを目的とする。具体的には、本研究で独自に用いている Pg 感染 DM マウスを使用し、歯周局所の感染と腸内細菌叢および腸管組織の dysbiosis の関連性を明らかにする。また、それを介した常在自然リンパ球系の抑制と糖尿病の病態との関連性を明らかにする。本口腔内の細菌をターゲットとした糖尿病の新たな治療法の開発を目指す。本研究で明らかにすることは、Pg 感染による腸内細菌叢の破綻がセグメント細菌にどのような影響を与えるか、セグメント細菌に由来する Th17 細胞が腸内細菌叢の破綻によってどのような影響を受けるか、Pg 感染が自然リンパ球と腸管上皮細胞およびフコース産生へどのような影響を与えるか、抗菌薬、FMT (fecal microbiota transplantation) で Pg 感染 DM マウスの腸管 microbiota がどのように変化するのか、および DM 病態改善効果が認められるか検討することを目的とした。う蝕原因菌 *S. mutans* の脳出血への影響に関しては、毛間内皮細胞を用いてコラーゲン付着因子である Cnm に着目し、Cnm 欠失株を用いて、細胞外基質、細胞への付着能を検討した。また、脳出血モデルラットを用いて、脳組織への *S. mutans* の意向について検討し、*S. mutans* の病態への影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

計画1 Pg 感染 DM マウスの腸内細菌叢の解析を行った。Pg 感染 DM マウスは高脂肪食の給餌と上顎臼歯への絹糸結紮により作成した。具体的には、DM モデルマウスと Pg 感染 DM マウス糞便を採取し、細菌由来 DNA の精製を行った。次に、細菌 16S rRNA の共通領域から菌種特異的領域を解析した。解析は次世代シーケンサーである HiSeq/MiSeq (イルミナ社) でメタゲノム解析 (CLC Genomic Workbench ver.9 使用) を行った。計画2 腸管粘膜の組織学的検討を行った。具体的には、Pg 感染 DM マウスおよび DM マウスの腸管組織ランダム5部位のパイエル板周囲粘膜面についてフコース産生量、フコース転移酵素の局在を組織学的に比較検討した。計画3 Cnm 陽性 *S. mutans* の細胞外基質 (ECM) 血管内皮細胞への付着の検討 ECM は、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、ラミニニンおよびフィブロネクチンの4種類を対象とした。細胞は、血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた。*S. mutans* WT 株と CnmKO 株を 96well ECM coating plate へ加え、 10^5 CFU/ml へ調整した菌液 100 μ l を 96well plate にて培養し ECM と細胞に対する Sm の付着率を測定した。また浸潤実験として、同様に菌と細胞を培養後、抗菌薬溶液 (Penicillin: 50 μ g/ml +Gentamicin: 300 μ g/ml) を 100 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間 30 分培養し、寒天培地に生育したコロニー数で評価した。計画4 *S. mutans* 歯髄感染脳出血ラットモデルの作成と脳組織の解析 SHRSP ラット (10 週齢) の下顎第一臼歯咬合面を切削し、歯髄腔へ WT 株を感染させる群 (WT 群)、CnmKO 株を感染させる群 (CnmKO 群) そして無処置群 (Control 群) の3群を用いた。術後 0、3、7、10 日目に神経症状スコアを計測。10 日目に屠殺し、ラットの脳、下顎、血清を回収した。大脳を冠状断で 2mm ごとにス

ライスした切片を用いた出血面積の比較、病理学的比較、そして血清を用いたサイトカイン量の比較を行った。また免疫染色法によって脳組織における Sm の存在を検討した。

4. 研究成果

Pg 感染 DM マウスの腸内細菌叢のメタゲノム解析の結果から、Pg 感染 DM マウスは Pg 感染マウスと比較して *Bacteroides* 属の割合が増加していた。また、腸管粘膜の組織学的観察から Pg 感染 DM マウスは Pg 感染マウスと比較して、パイエル板の肥厚が認められた。さらに、大腸の炎症部位数が有意に多い傾向を示した。S. mutans の実験に関して、ECM に対する付着に関して、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、ラミニンで WT 株と比べて CnmKO 株は付着率が有意に低かったが、フィブロネクチンでは有意差を認めなかった。血管内皮細胞に対する付着実験においては、WT 株と比べて CnmKO 株は付着率が有意に低かった。加えて、浸潤実験においては、WT 株と比べて CnmKO 株は浸潤率が有意に低かった。S. mutans 菌髄感染脳出血ラットモデルの実験に関して、ラット血清を用いた ELISA 法にて Sm に対する血清抗体価の値を比較したところ、Sm 感染群において優位な血清抗体価の上昇を確認した。ラット血清を PCR 法にて解析し Sm 感染群の血清中に Sm の存在を確認した。神経症状スコアを比較したところ、7 日目と 10 日目で WT 群における有意な神経症状スコアの上昇を認めた。ELISA 法にて、脳出血を起こすと上昇する炎症性サイトカイン IL-1 値を比較したところ、WT 群にて有意な血清抗体価の上昇を認めた。ラットの大脳において出血斑数と拡張血管数を比較したところ、WT 群において優位な出血斑と拡張血管の増加を認めた。WT 群では HE 染色画像にて出血像が見られるとともに、Sm に対する蛍光免疫染色において血管内皮の裏打ちが崩壊した箇所に沿って Sm の局在を認めた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taniguchi Yuri, Ouhara Kazuhisa, Kitagawa Masae, Akutagawa Keiichi, Kawada-Matsuo Miki, Tamura Tetsuya, Zhai Ruoqi, Hamamoto Yuta, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Maruyama Hirofumi, Komatsuzawa Hitoshi, Shiba Hideki, Mizuno Noriyoshi	4. 巻 210
2. 論文標題 Periapical lesion following Cnm-positive Streptococcus mutans pulp infection worsens cerebral hemorrhage onset in an SHRSP rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cei/uxac094	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
研究協力者	應原 一久 (OUHARA KAZUHISA) (80550425)	広島大学・医系科学研究科・助教 (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		
米国	Nova Southeastern University		