

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23792483

研究課題名(和文) 子宮内感染源としての歯周病原細菌の可能性とメカニズムの解明

研究課題名(英文) The possible mechanism of periodontal pathogens associated with intra-uterin infection

研究代表者

長谷川 梢 (HASEGAWA, KOZUE)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00404492

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)：ハイリスク妊婦は正常出産妊婦と比べて歯周組織の状態が悪化しており、約29%のハイリスク妊婦の卵膜組織でFnが検出された。Fn LPSはIL-6及びCRHの産生を誘導し、その経路はTLR-2及びTLR-4を介していることが示された。これらのことから、子宮内組織に定着したFnの構成成分であるLPSが、TLR-2及びTLR-4を介して分娩の開始に関わるサイトカインやホルモンの発現上昇を促すことにより、妊娠維持機構に影響を及ぼし、出産に影響を及ぼしている可能性が示唆された。動物実験により、Pgの尾静脈の投与により、Pgが胎盤に定着し、TLR-2,4の遺伝子発現を上昇させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：F. nucleatum was detected in all oral samples and seven chorionic tissues of the high-risk pregnant women, but was not detected in chorionic tissues of the normal pregnant women. F. nucleatum LPS significantly increased IL-6 and CRH secretion by chorion-derived cells. The F. nucleatum LPS-induced IL-6 and CRH levels were significantly reduced in TLR-2 or TLR-4 gene-silenced chorion-derived cells. We suggest that F. nucleatum is detected in chorionic tissues of high-risk pregnant women, but not in chorionic tissues of normal pregnant women, and that F. nucleatum induces IL-6 and CRH production via both TLR-2 and TLR-4 in chorion-derived cells. In vivo study, P. gingivalis was detected in fetal membrane and placenta from mice of which P. gingivalis was injected into the tail vein. The TLR-2 and TLR-4 mRNA expression were significantly increased in fetal membrane and placenta from P. gingivalis injected mice compared with those from non-infected mice.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 早産・低体重児出産 歯周病原細菌

1. 研究開始当初の背景

近年の歯周医学の進歩により、歯周病と早産・低体重児出産の関連性が明らかにされつつある。歯周病が早産・低体重児出産に及ぼすメカニズムは、(i)歯周組織で産生された炎症性メディエーターが血流を介して子宮組織に影響を与えること、(ii)歯周病原細菌が口腔内から子宮に移動して、直接子宮内組織に感染することによる影響、の2つが考えられている。子宮内組織に歯周病原細菌が存在することは、現在までに報告されているが(Katzら、2009 *J Dent Res* 575-578)、その存在が子宮内組織や妊娠状態に与える影響については明らかになっていない。

我々は、歯周病と早産・低体重児出産との関連性とそのメカニズムを解明することを目的に研究を行っている。疫学的な報告では、2003年にアジアにおいて初めて、日本でも歯周病が早産と関連することを明らかにした(Hasegawaら、*J Periodontol*, 2003; 1764-70)。また、メカニズムの解明研究にも着手し、2003年の我々の報告では、切迫早産妊婦の血清中のIL-8とIL-1βは、正常妊娠妊婦よりも有意に高いこと示した(Hasegawaら、*J Periodontol*, 2003; 1764-70)。2010年には、ハイリスク妊婦の卵膜組織から歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)を検出し、歯周病原細菌が子宮内組織に局在していることを報告し、さらには*in vitro*での*Pg*と絨毛膜細胞との相互作用の結果から、*Pg*は早産に関連する炎症性物質を誘導し、そこにはTLR-2が関わっていることを示した(Hasegawa-Nakamuraら、*Journal of Periodontal Research* 2011;497-504.)。しかし我々の*in vitro*の結果は生体内の反応を示唆することはできても、実際の生体での役割を解明できていない。また、臨床データの被験者数が少なかったことから、子宮内組織の歯周病原細菌と異常妊娠との関係について明確な結論を得るまでには至っていない。

2. 研究の目的

①正常出産妊婦及びハイリスク妊婦の口腔内環境の比較と、子宮内組織における歯周病原細菌の検出、②培養ヒト絨毛膜由来細胞における *Fn* 刺激による IL-6 及び、Corticotrophin-releasing hormone(CRH)の産生への影響の検討、③妊娠動物モデルにおける歯周病原細菌が出産に与える影響の解析、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床研究

被験者はハイリスク妊娠のため鹿児島市立病院にて入院管理が必要と診断された24名の妊婦と、正常妊娠で鹿児島愛育病院に通院していた妊婦15名を被験者とした。妊娠中期に、唾液と歯肉縁下プラークの採取と歯周組織検査 (probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), Bleeding on probing (BoP), plaque index (PII), gingival index (GI)) を行った。同部位に4mm以上のPPDと、3mm以上のCALがある歯が2歯以上ある人を歯周炎、歯周炎でない妊婦でBoPが見られた人を歯肉炎とした。出産時に子宮内組織の卵膜を採取した。全てのサンプルにおける歯周病原細菌(*Fusobacterium nucleatum*(*Fn*), *Prevotella intermedia*(*Pi*), *Tannerella forsythia*(*Tf*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(*Aa*), *Treponema denticola* (*Td*))の検出は、polymerase chain reaction (PCR)法を用いて行った。

(2) *in vitro* 研究

正常妊娠妊婦の絨毛膜から分離した絨毛膜細胞、heat-killed *Fn* or *Fn* LPSで刺激した。さらに、Polymixin Bを、heat-killed *Fn*刺激30分前に加えた。さらに、TLR-2 siRNAまたは、TLR-4 siRNAを導入しTLR-2またはTLR-4の遺伝子発現を抑制した絨毛膜由来細胞を*Fn* LPSで刺激した。その後RNAを抽出し、TLR-2とTLR-4

の遺伝子発現を解析した。さらに、各細胞培養上清中のIL-6とIL-8レベルをELISA法にて分析した。

(3) *in vivo* 研究

BALB/c マウスを妊娠させ、妊娠前期である妊娠 8-10 日目、あるいは妊娠後期である妊娠 13-15 日目に 3 回、*Pg* を 107CFU0.1mL 尾静脈から投与した。その後、胎盤組織と卵膜組織を採取し、*Pg* の検出と、TLR-2 と TLR-4 の遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 臨床研究の結果

24名のハイリスク妊婦のうち、8名は多胎妊娠、5名は前置胎盤、11名は切迫早産（3名は PROM, 1名は羊水過多、7名は産科的な炎症症状のない状態）であった。ハイリスク妊婦は正常出産妊婦と比べて有意にPIIが高く、PPD, CAL, BOPも有意に悪化していた。24名のハイリスク妊婦のうち、全ての妊婦の口腔内サンプルと7名の妊婦の卵膜サンプルより *Fn* が検出された。正常出産妊婦15名のうち12名の口腔内サンプルから *Fn* が検出されたが卵膜サンプルからは検出されなかった(表1)。

表1. ハイリスク妊婦と正常出産妊婦の歯周状態と *Fn* の検出頻度

	ハイリスク妊婦 (n=24)	正常出産妊婦 (n=15)
年齢	31.7(5.1)	33.7(5.8)
歯周組織の状態		
PPD (mm)	2.0(0.3) [§]	1.7(0.2)
PPD≥4mm (%)	5.0(6.9) [‡]	1.0(3.4)
CAL (mm)	1.8(0.8) [§]	0.2(0.2)
CAL≥3mm (%)	34.1(23.5) [§]	1.0(1.4)
BOP (%)	33.5(26.4) ^{‡§}	10.7(20.1)
PII	0.7(0.4) ^{‡§}	0.3(0.4)
GI	0.5(0.3) [§]	0.1(0.2)
診断		
歯周炎 (% (n))	37.5(9) [§]	0(0)
歯肉炎 (% (n))	62.5(15)	93.3(14) [§]
健康歯肉 (% (n))	0(0)	6.7(1)
<i>Fn</i> の検出頻度		
歯肉線下プラーク (% (n))	100(24) [§]	80.0(12)
唾液 (% (n))	100(24) [§]	46.7(7)
卵膜組織 (% (n))	29.2(7) [§]	0(0)

平均 (S.D.) or 割合(n)
[‡]P<0.05, [§]P<0.01, ^{‡‡‡}P<0.001(ANOVA) [§]P<0.05, ^{§§}P<0.01(χ^2 検定)

(2) *in vitro* 研究の結果

絨毛膜由来細胞を heat-killed *Fn* で刺激すると濃度依存的に培養上清中の IL-6 濃度が上昇し、TLR-2 の発現が約 5.6 倍上昇したが、TLR-4 には影響を及ぼさなかった(図 1A-C)。

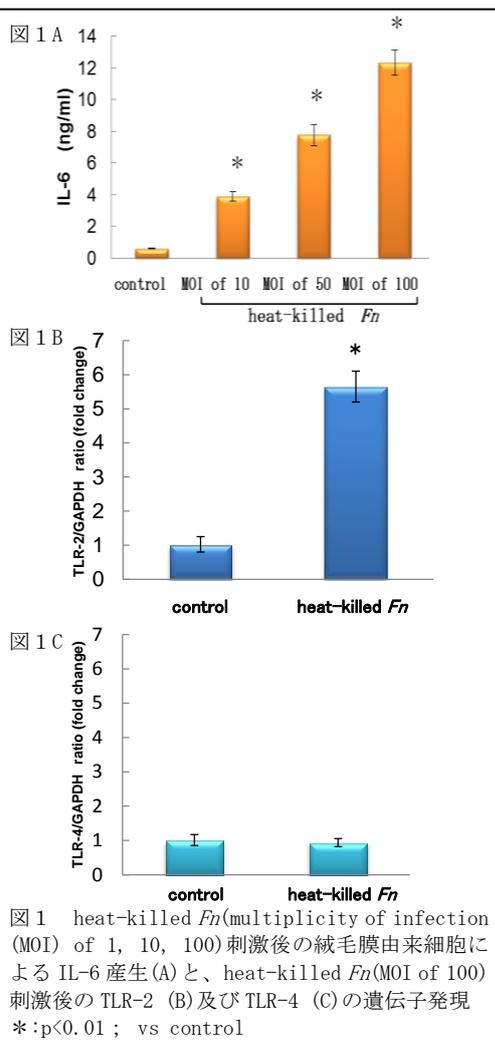
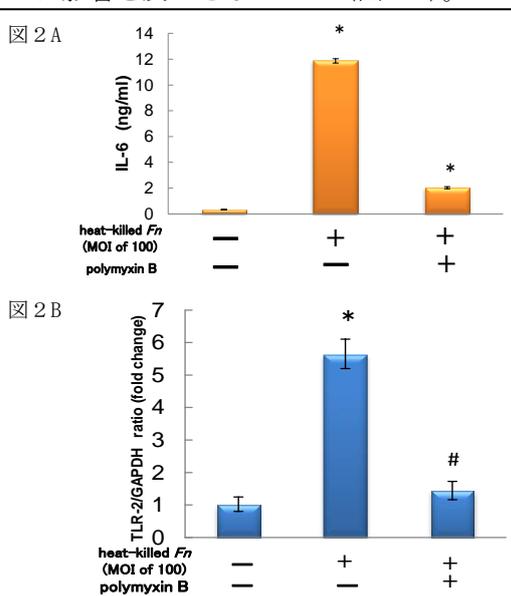
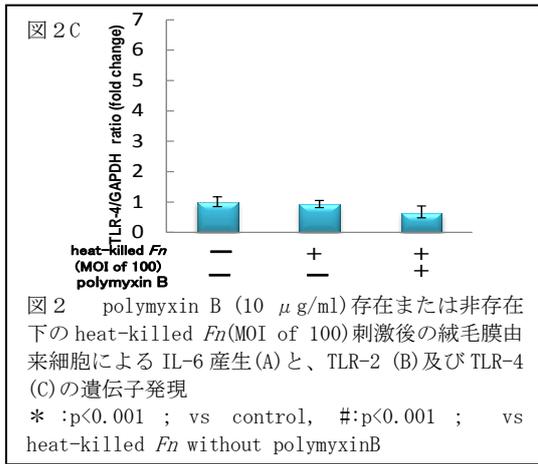


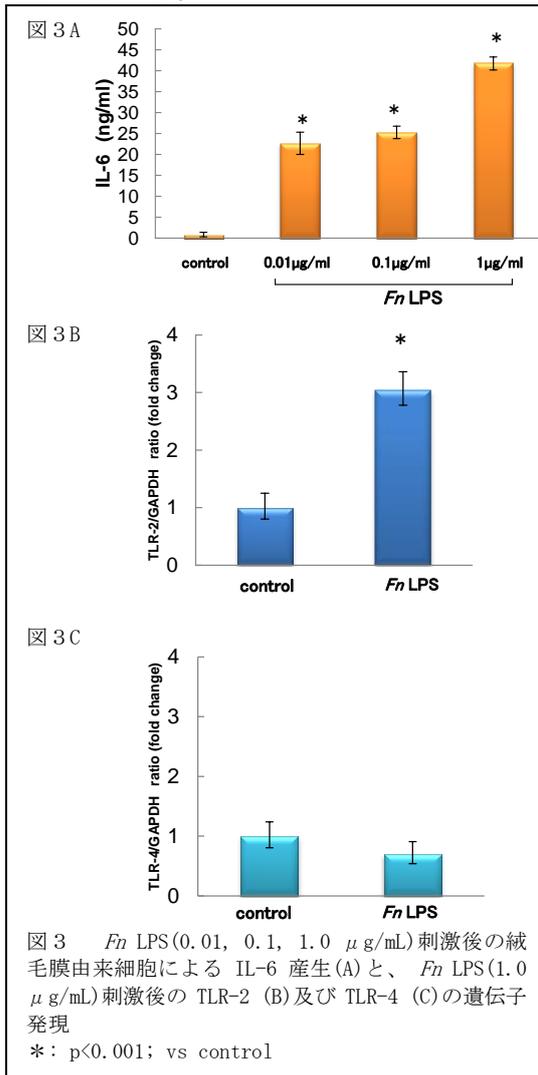
図1 heat-killed *Fn*(multiplicity of infection (MOI) of 1, 10, 100) 刺激後の絨毛膜由来細胞による IL-6 産生 (A) と、heat-killed *Fn* (MOI of 100) 刺激後の TLR-2 (B) 及び TLR-4 (C) の遺伝子発現 * : p < 0.01 ; vs control

LPSのインヒビターである polymyxin B 添加すると、絨毛膜由来細胞を heat-killed *Fn* で刺激したことによる、上清中の IL-6 濃度の上昇と、TLR-2 の遺伝子発現の上昇は有意に抑制された (図 2 A, 2 B)。一方、TLR-4 の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった (図 2 C)。

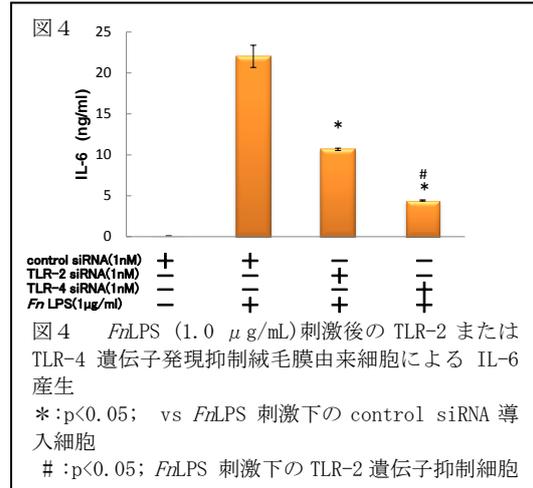




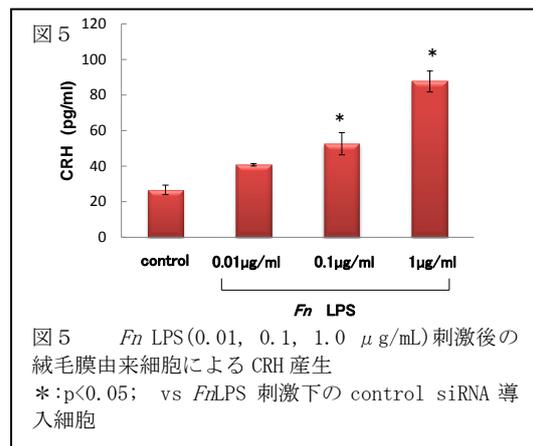
そこで我々は、*Fn* LPSが絨毛膜由来細胞に及ぼす影響を分析した。絨毛膜由来細胞を*Fn* LPSで刺激すると濃度依存的に培養上清中のIL-6濃度が上昇した(図3A)。絨毛膜由来細胞を*Fn* LPSで刺激するとコントロールと比較してTLR-2の遺伝子発現が上昇したが(図3B)、TLR-4の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった(図3C)。



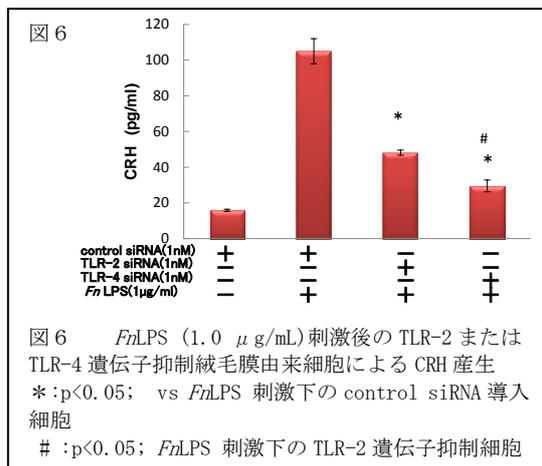
次に我々は、TLR-2または、TLR-4の遺伝子発現を抑制することによる、*Fn* LPS刺激により上昇するIL-6レベルに及ぼす影響を検討した。TLR-2の遺伝子抑制を行うと、*Fn* LPSにより上昇するIL-6のレベルは有意に抑制された。TLR-4の遺伝子抑制を行うと*Fn* LPSにより上昇するIL-6は、抑制していない時やTLR-2の遺伝子抑制を行った時と比べて、有意に抑制された(図4)。



最後に我々我々は、分娩の開始に大きく関わる物質であるCRHについて、検討した。絨毛膜由来細胞を*Fn* LPSで刺激すると培養上清中のCRHレベルが有意に上昇した(図5)。

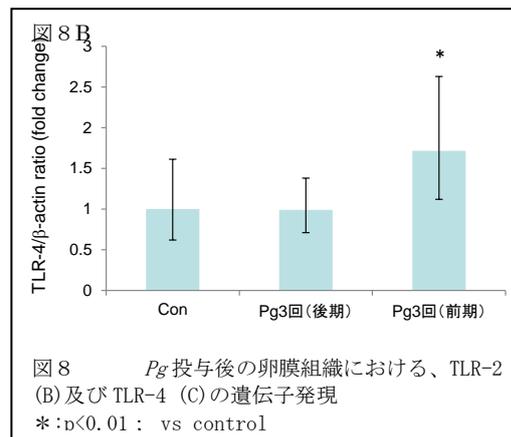
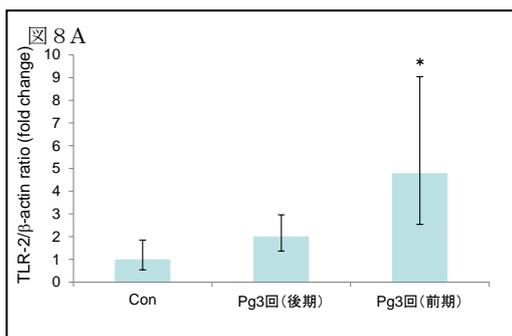
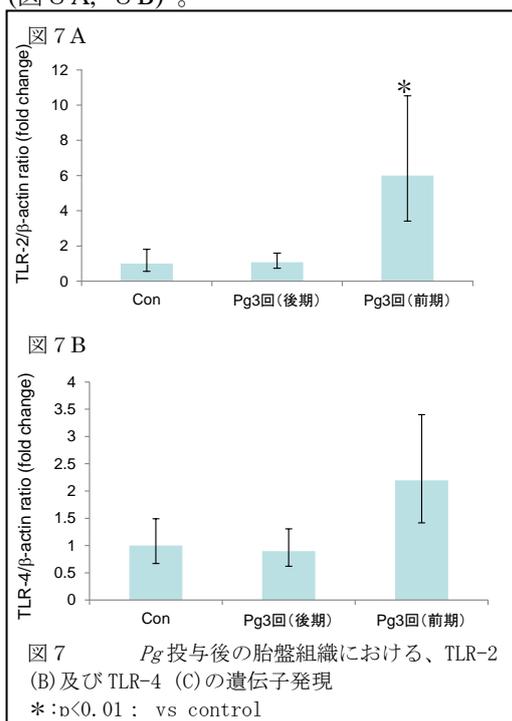


Fn LPS刺激により上昇したCRHレベルは、TLR-2及びTLR-4遺伝子発現を抑制することで有意に減少したが、TLR-2遺伝子抑制下と比較してTLR-4遺伝子抑制下で有意に産生が抑制された(図6)。



(3) in vivo 研究の結果

妊娠前期、妊娠後期いずれも *Pg* の尾静脈からの3日間連続投与によって、胎盤、卵膜から *Pg* が検出された。また、*Pg* を妊娠後期に感染させたマウスは、コントロールと比較して、胎盤では TLR-2 が(図7A, 7B)、卵膜では TLR-2、4 の遺伝子発現が有意に高かった(図8A, 8B)。



(4) まとめ

ハイリスク妊婦は正常出産妊婦と比べて歯周組織の状態が悪化しており、約29%のハイリスク妊婦の卵膜組織で *Fn* が検出されることが明らかになった。

絨毛膜由来細胞において *Fn LPS* は IL-6 及び CRH の産生を誘導し、その経路は TLR-2 及び TLR-4 を介していることが示された。

我々は以前に23名のハイリスク妊娠妊婦のうち6名の妊婦の絨毛膜組織から *P. gingivalis* が検出され、絨毛膜由来細胞において、*Pg LPS* は TLR-2 を介して IL-6 と IL-8 の産生を誘導した事を明らかにした (Hasegawa-Nakamura ら, *Journal of Periodontal Research* 2011;497-504.)。

以前の研究と、本研究から、子宮内組織に定着した *Pg* と *Fn* が主にその成分である LPS により、TLR-2 及び TLR-4 を介して分娩の開始に関わるサイトカインやホルモンの発現上昇を促すことが示唆される。また本研究結果により、ハイリスク妊婦は正常出産妊婦と比べて歯周組織の状態が悪化しており、ハイリスク妊婦の卵膜組織で *Pg, Fn* が検出されたことより、歯周環境が妊娠維持機構に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

今回我々は、動物実験により、妊娠後期の *Pg* の尾静脈投与により、*Pg* が胎盤や卵膜に定着し、TLR-2,4 の遺伝子発現を上昇させることを明らかにした。今後は、*Pg, Fn* の混合感染による影響を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

①中村梢、立石ふみ、中村利明、野口和行、歯周病と産婦人科疾患の関連性—最近の研究動向について—、査読なし、日本歯周病学会会誌, Vol.54, No.1, pp.5-10 (2012).

② Fumi Tateishi, Kozue Hasegawa-Nakamura, Toshiaki Nakamura, Yuichi Oogai, Hitoshi Komatsuzawa, Kazuya Kawamata, Tsutomu Douchi, Masayuki Hatae and Kazuyuki Noguchi, Detection of *Fusobacterium nucleatum* in chorionic tissues of high-risk pregnant women., *Journal of Clinical Periodontology*, 査読有り、Vol.39, No.5, pp.417-424 (2012).

〔学会発表〕（計2件）

①中村梢、立石ふみ、中村利明、湊上佐和子、野口和行、子宮内膜症病変組織における *Porphyromonas gingivalis* の検出、平成26年度第57回春季日本歯周病学会学術大会総会、2014年5月（岐阜）

② Fumi Tateishi, Kozue Hasegawa, Toshiaki Nakamura, Yuichi Oogai, Hitoshi Komatsuzawa, Kazuya Kawamata, Tsutomu Douchi, Masayuki Hatae, and Kazuyuki Noguchi, Detection of *Fusobacterium nucleatum* in chorionic tissues of high-risk pregnant women, 第98回アメリカ歯周病学会（AAP）共催日本歯周病学会（JSP）2012年大会、2012年9月（ロサンゼルス）。

〔図書〕（計3件）

①和泉雄一、長谷川—中村 梢、野口和行、古市保志、歯周病と早産・低体重児出産., イラストで語る歯科医療最前線.吉江弘正監修、クインテッセンス出版, pp.27-30 (2013).

② Yuichi Izumi, Kozue Hasegawa-Nakamura, Kazuyuki Noguchi, Yasushi Furuichi, Part one-7 Maternal Periodontal Disease and Preterm Low Birth Weight, AT THE FOREFRONT Illustrated Topics in Dental Research and Clinical Practice.

Edited by Hiromasa Yoshie. Quintessence Publishing Co, pp.27-30 (2012).

③ 長谷川梢、立石ふみ、中村利明、野口和行, 歯周病と産婦人科疾患との関連性. *Dental Diamond*, pp.110-111 (2012).

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 梢 (HASEGAWA KOZUE)

鹿児島大学・歯医学総合研究科・助教

研究者番号：00404492

(2)分担者なし

(3)連携研究者

野口 和行 (NOGUCHI KAZUYUKI)

鹿児島大学・歯医学総合研究科・教授

研究者番号：90218298

堂地 勉 (DOUCHI TSUTOMU)

鹿児島大学・歯医学総合研究科・教授

研究者番号：60150413

中村 利明 (NAKAMURA TOSHIAKI)

鹿児島大学・歯医学総合研究科・助教

研究者番号：60381183

(4)研究協力者

波多江 正紀 (HATAE MASAYUKI)

医療法人聖成会 柿木病院・副院長

川俣 和弥 (KAWAMATA KAZUYA)

愛育病院・副院長

立石 ふみ (TATEISHI FUMI)

医療法人社団忠重会 忠重歯科医院・歯科

医師