

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670802

研究課題名(和文) Galectin-3を標的とした歯性感染誘導性早期低体重児出産の診断予防法の開発

研究課題名(英文) Galectin-3 inhibition prevents preterm birth induced by dental infection of *Porphyromonas gingivalis*.

研究代表者

高田 隆 (Takata, Takashi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：10154783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯性感染と早産(PB)の関係が注目されているが、その機序は未だ明らかでない。我々はPg歯性感染マウスの胎盤でGalectin-3発現が上昇することを明らかとした。本研究ではGalectin-3の抑制剤であるN-アセチルラクトサミン(NLac)がPg歯性感染の誘導するPBに及ぼす影響について調べた。NLacはPg-LPS刺激で産生されるGalectin-3の作用を阻害し、TNF- $\alpha$ 、COX-2やGalectin-3などの出産促進因子発現を減じ、Pg歯性感染の誘導するPBを抑制した。よって、NLacは炎症によるPBの新しい予防/治療方法の戦略となる可能性が示唆された。

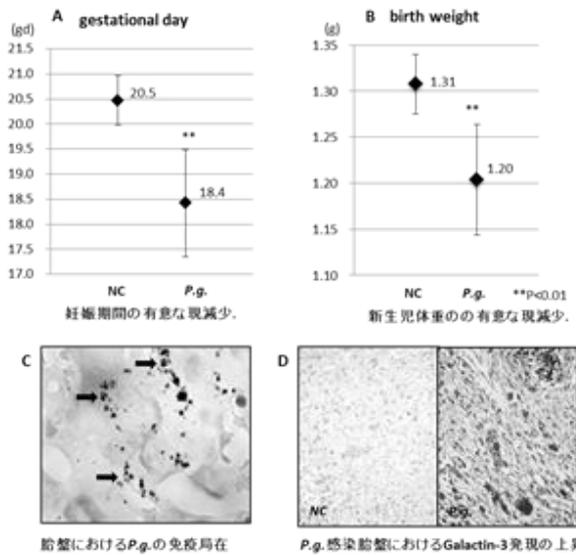
研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies have revealed a link between dental infection and preterm birth (PB), however, the underlying mechanisms remain unclear. Previously we showed galectin-3 upregulated in Pg infected placenta. In the present study, we examined the effects of N-acetyllactosamine (NLac; an inhibitor of Gal-3) on Pg-dental infection induced PB. The injection of NLac (20gd) significantly prevented PB induced by Pg infection (17.7gd). Pg-dental infection induced TNF- $\alpha$  and COX-2 upregulation was reduced in NLac-Pg. NLac suppressed the expression of TNF- $\alpha$ , COX-2 and Galectin-3 by Pg-LPS from trophoblasts in dose dependent manner. NLac suppresses inflammatory mediators, which promote delivery, by inhibiting the effect of Galectin-3 and prevents PB induced by Pg-dental infection. Therefore, NLac may be a novel preventive/therapeutic strategy for PB.

研究分野：口腔病理学

キーワード：早産 歯性感染 *Porphyromonas gingivalis* Galectin-3 N-アセチルラクトサミン TNF- $\alpha$  COX-2

1. 研究開始当初の背景

早期低体重児出産は最も一般的な新生児の罹患や死亡の原因である。2010年の疫学調査では全世界の新生児の11.1%が早期低体重児出産で、周産期死亡の75%、脳死麻痺や気管支肺異形成症などの新生児の長期疾患罹患児の約半数に関わるため、WHOは早期低体重児出産の減少を目的としたキャンペーン活動を行っているが、未だに目的を達成できていない。一方、歯周病は歯周病原細菌感染による慢性持続性の軽微な炎症で、その罹患率は80%と高く、成人が歯を喪失する最大の原因である。近年、歯周病原細菌やその由来因子が血流を介し、糖尿病、心・血管疾患、骨粗鬆症などの全身疾患に影響するとされる。近年、申請者らは、*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)をマウス臼歯の歯髄から感染させることにより、*P.g.*の持続的供給源となる歯根肉芽腫を伴う歯性感染モデルの作製に成功した。このモデルでは非感染群に比べ、有意差をもって早期に(図A)、低体重児が生まれてくる(図B)。感染群の胎盤では歯髄から感染させた*P.g.*が検出される(図C)。興味深いことに、感染胎盤ではGalectin-3発現が著明に上昇していた(図D)。Galectin-3は様々な炎症や癌において免疫調節因子として重要な役割を持つことが知られている。そこで我々は、歯周炎による早期低体重児発症メカニズムにおいてもGalectin-3が重要な役割を果たし、Galectin-3の産生を抑制することで、その診断・予防薬として用いることができるのではないかとこの着想に到った。



(Ao Met al. PLoS One. 10(8) より)

2. 研究の目的

*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)歯性感染マウス妊娠モデルを用い、*P.g.*歯性感染が妊娠期間と新生児体重の有意な減少を誘導すること、*P.g.*感染胎盤で免疫調節物質Galectin-3の著明な発現上昇がみられること

を明らかにした。そこで、本研究では(1) *P.g.*歯性感染による早期低体重児出産発症メカニズムにおけるGalectin-3の役割を解明し、(2) 血清Galectin-3量による診断システム構築、(3) 早期低体重児出産発症に及ぼすN-acetyl-lactosamine (Galectin-3抑制物質)の予防効果を検討し、妊産婦への副作用の少ない安全な診断・予防薬の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *P.g.*-LPSによる早産発症メカニズムにおけるGalectin-3の役割に関する検討

胎盤構成細胞(胎盤栄養細胞:HTR-8細胞、血管内皮細胞:huHT-1,マクロファージ細胞:THP-1)を用い*P.g.*-LPS, Galectin-3および*P.g.*-LPS/Galectin-3が早産に関わるメディエータ遺伝子発現に及ぼす影響についてRT-PCR, ELISAで調べるとともに、シグナル伝達系についてもウェスタンブロット法で検討した。また、母体-胎児界面での接着に関わる重要な因子であるCD66a発現に及ぼすGalectin-3の影響についても検討した。

(2) *P.g.*歯性感染マウス妊娠モデルを用いた早産メカニズムの解析

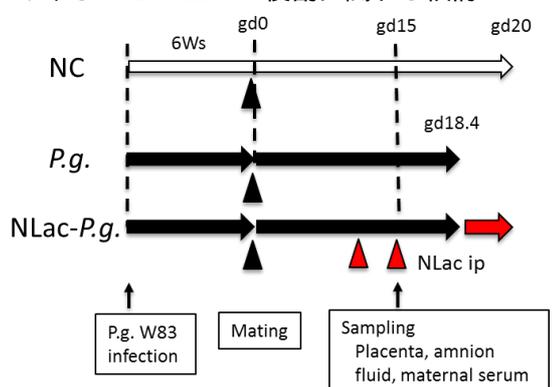
妊娠期間、出生時体重、胎盤の状態(炎症細胞浸潤や変性、壊死や炎症やアポトーシスに関わる因子の免疫組織化学的検討)、胎盤、羊水、血清におけるGalectin-3や出産に関与するメディエータであるTNF- $\alpha$ やPGE2の発現状況を比較検討することで、血清や羊水Galectin-3量による診断システム構築の可能性について検討した。

(3) N-acetyl-lactosamine (NLac)の*P.g.*歯性感染誘導早産に及ぼす影響

NLacはGalectin-3抑制物質である。NLac投与が出産、胎盤に及ぼす影響を組織学的・免疫組織化学的に検討し、早期低体重児出産発症に及ぼすNLacの予防効果を調べた。

4. 研究成果

(1) *P.g.*-LPSによる早産発症メカニズムにおけるGalectin-3の役割に関する検討



*P.g.*-LPS刺激によりHTR-8, THP1やhuHT1細胞などの胎盤構成細胞からのGalectin-3産生量が増加した。また、*P.g.*-LPSはこれらの細胞から炎症性サイト

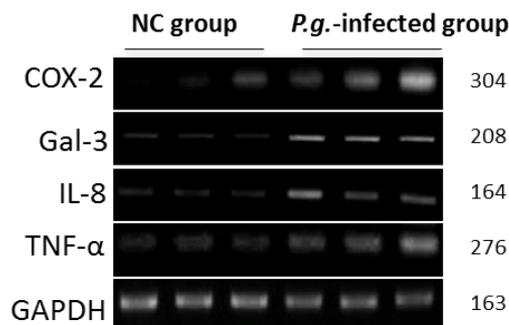
カインである TNF- $\alpha$ 産生を誘導するため、rTNF- $\alpha$ が Galectin-3 産生に及ぼす影響について検討したところ、rTNF- $\alpha$ がHPT-8細胞からの Galectin-3 産生を有意に増加させた。次に Galectin-3 がサイトカイン産生に及ぼす影響について検討したところ、Galectin-3 は NF- $\kappa$ B 経路の活性化を介して、HTR-8 細胞からの COX2, TNF- $\alpha$ , IL-8 や Galectin-3 自体の産生を抑制することが明らかとなった。Galectin-3 中和抗体は *P.g.*-LPS の誘導する TNF- $\alpha$ 産生を 43.5%減少させた。

さらに、Galectin-3 が CD66a 発現に及ぼす影響について検討したところ、Galectin-3 siRNA で処理した細胞では CD66a 発現が増加し、Galectin-3 抗体は *P.g.*-LPS が誘導する CD66a の発現抑制を回復させた。

以上のことから、*P.g.* 菌性感染胎盤では *P.g.*-LPS 刺激で胎盤構成細胞から産生される出産関連サイトカインの産生を促進するとともに、母体胎児界面での接着分子 CD66a 発現を抑制し、出産を早めることが明らかとなった。

## (2) *P.g.* 菌性感染マウス妊娠モデルを用いた早産メカニズムの解析

胎生 15 日目の感染胎盤 (*P.g.*) と非感染胎盤で (NC) で Galectin-3 を含む出産関連因子の発現を比較した。免疫組織化学的に *P.g.* 群の胎盤では TNF- $\alpha$ , COX2, Galectin-3 陽性細胞が増加し、好中球やマクロファージの浸潤が増加していた。



胎盤から抽出した mRNA を用いた PCR でも COX2, MCP-1, Galectin-3 遺伝子発現が増加していた。

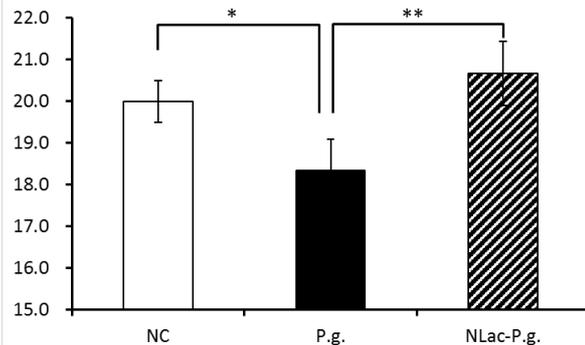
COX-2, IL-8, TNF- $\alpha$ , Galectin-3 のいずれも *P.g.* 感染胎盤で強く発現し、これらが *P.g.* 菌性感染早産発症において重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、*P.g.* 群の羊水中の Galectin-3 濃度は NC 群と比べ 5 倍という有意に高い値を示した。*P.g.* 群の母体血清 Galectin-3 値も有意に上昇していた。

*In vivo* の実験でも *P.g.* 菌性感染が誘導する早産における Galectin-3 の重要性が明らかとなった。

## (3) N-acetyl-lactosamine (NLac) の *P.g.* 菌性感染誘導早産に及ぼす影響

上図は各群の在胎日数の平均値を示す。NC

群、*P.g.* 群、NLac-*P.g.* 群の在胎日数平均値は 20 日、18.4 日、20.7 日で、NLac の腹腔内投与は *P.g.* 菌性感染が誘導する早産を有意に改善した。



免疫組織化学的に *P.g.* 群の胎盤でみられた TNF- $\alpha$ , COX2, Galectin-3 陽性細胞の増加や好中球やマクロファージ浸潤増加は NLac-*P.g.* 群では減弱していた。

胎盤から抽出した mRNA を用いた PCR でも COX2, MCP-1, Galectin-3 遺伝子発現増加を NLac 投与は抑制していた。

以上のことから、NLac は *P.g.*-LPS によって誘導される Galectin-3 の作用を抑制することで、出産に関わる TNF- $\alpha$  や COX2 などの炎症のメディエータの産生をし、*P.g.* 菌性感染による早産を抑制する可能性が示唆された。

国内外の文献を渉猟しても、本研究のように早産と Galectin-3 の関係性に着目した研究は存在せず、本研究の社会に与えるインパクトは高い。

本研究結果は Galectin-3 を用いた早産の予測診断キットの開発や Galectin-3 抑制剤である NLac の早産予防・治療への応用の可能性を内包している。今後、ヒト妊婦での解析研究を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* induces preterm birth in mice. Ao M, Miyauchi M, Furusho H, Inubushi T, Kitagawa M, Nagasaki A, Sakamoto S, Kozai K, Takata T. PLoS One (査読有). 10(8):e0137249. 2015.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 血清 Galectin-3 を標的とした早産の予測・診断法の開発. 宮内睦美, 工藤美樹, 高田 隆. イノベーションジャパン 2015 (東京), 8月27-28日, 2015.

2. 血清 Galectin-3 を標的とした早産の予測・診断法の開発. 宮内睦美, 高田 隆. 新技術説明会 2015 (東京), 10月9日, 2015.

3. *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染マウスの早産及びFGRモデルとしての可能性. 小西晴久, 三好 博, 宮内睦美, 占部 智, 高田 隆, 工藤美樹. 第 67 回日本産婦人科学会学術講演会 (横浜), 4 月 9-12 日, 2015.
4. *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染は早期低体重児出産を誘導する. 宮内睦美, 古庄寿子, 長崎敦洋, 高田 隆. 第 103 回日本病理学会総会(広島), 4 月 24-26 日. 2014
5. *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染は早産を誘導する. 宮内睦美, 古庄寿子, 長崎敦洋, 占部 智, 小西晴久, 三好博史, 工藤美樹, 高田 隆. 第 22 回日本胎盤学会学術集会(京都), 10 月 4 日. 2014

北川 雅恵 (Kitagawa Masae)  
広島大学・病院・助教  
研究者番号：10403627

古庄 寿子 (Furusho Hisako)  
広島大学・医歯薬保健学研究院 (歯)  
・助教  
研究者番号：00634461

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称：「早産および/または低体重児出産のリスク判定方法およびそのためのキット」  
発明者：高田隆、宮内睦美、工藤美樹  
権利者：国立大学法人広島大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2015/072928  
出願年月日：平成 27 年 8 月 13 日  
国内外の別： 国外

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高田 隆 (Takata Takashi)  
広島大学・医歯薬保健学研究院 (歯)・教授  
研究者番号：10154783

### (2) 研究分担者

宮内 睦美 (Miyachi Mutsumi)  
広島大学・医歯薬保健学研究院 (歯)・准教授  
研究者番号：50169265