

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 岩瀬 智彦
論文題目 歯周病原細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> を用いたマウス誤嚥性肺炎モデルによる病原性の検討：線毛遺伝子型の異なる菌株での比較	

I. 緒言

慢性歯周炎は複数の口腔細菌の混合感染によって引き起こされ、米国においては成人の 40%が罹患しており、歯槽骨を含む歯周組織の破壊を引き起こす。さらに本疾患は、早産やアテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、糖尿病、誤嚥性肺炎、アルツハイマー病の発症などの全身性疾患の一因となる可能性もあり、重要視されている。歯周組織の炎症は、常在細菌叢のバランス失調(ディスバイオーシス)により口腔常在菌と歯周組織との共生関係が崩れ、防御システムが正常に働かなくなることで引き起こされていると考えられている。口腔常在菌のなかでもレッドコンプレックスと呼ばれている *Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia* および *Treponema denticola* は、炎症の強い部位から分離される頻度が高いことから最も重要な歯周病原細菌と目されている。さらに、レッドコンプレックスの中でも、*P. gingivalis* は宿主の自然免疫を錯乱することにより、ディスバイオーシスを引き起こし、常在細菌叢を病的なものへと変化させるキーストーン病原体であるとみなされている。*P. gingivalis* はグラム陰性偏性嫌気性桿菌であり、タンパク質分解酵素であるジンジパイン、内毒素のリポ多糖 (LPS) および線毛などの様々な病原因子を保有する。これまでの研究では、*P. gingivalis* が誤嚥による肺炎の原因菌としても関与していることが報告されている。また高齢者において歯周ポケットを有する歯の増加と、肺炎による死亡率は関連していることが報告されている。しかし *P. gingivalis* が誤嚥性肺炎を引き起こすメカニズムについては、まだ十分に解明されていない。多くの症例報告や動物モデルは、*P. gingivalis* が誤嚥性肺炎の発症、増悪化に重要な役割を果たすことを示唆するが、肺炎増悪化に関与する病原因子は依然として不明である。*P. gingivalis* には FimA タンパク質を主要成分とする FimA 線毛と Mfa1 タンパク質を主要成分とする Mfa1 線毛の 2 種類の線毛を持つ。FimA および Mfa1 タンパク質はそれぞれ異なる遺伝子座に位置する *fim* および *mfa* クラスターから発現し、それらのタンパク質が菌体表面にて重合し線毛線維を形成する。さらに FimA および Mfa1 線毛には、*fimA* および *mfa1* の下流から発現する FimB-E および Mfa2-5 の 4 つの微量タンパク質が含まれることが明らかになっている。また、FimB および Mfa2 は線毛の基部に局在し線毛の長さを制御する因子であり、FimC-E および Mfa3-5 は線毛先端にて複合体を形成する。FimA 線毛についての研究は古くから解析が進められ、FimA をコードする *fimA* には遺伝子多型が認められること、そして *fimA* 遺伝子配列の違いにより 5 つの型 (I ~ V) に分けられることがポリメラーゼ連鎖反応および DNA シーケンシングを用いた手法によって明らかにされている。さらに、それぞれの遺伝子型から発現するタンパク質はそれぞれ抗原性も異なることが明らかとなっている。これまで *fimA* 型と病原性との関連が検討され、II 及び IV 型を持つ *P. gingivalis* が重度の歯周病患者から高頻度に分離されること、I 型は健常者や軽度の歯周病患者から多く認められることが報告されている。一方で、*fimA* 型と歯周炎の症状との間には関連性が認められないことを示す報告も存在する。このような矛盾の存在は、*P. gingivalis* の病原性を評価するためには *fimA* 型分類のみの解析では不十分であることを示している。

一方、Mfa1 線毛の多様性については、2005 年に Asai らによって報告されて以来、検討はされていなかった。近年、我々は当講座が保有する全ての *P. gingivalis* 株 84 種の *mfa1* 遺伝子型を分析した。その結果、Mfa1 線毛を構成する主要なタンパク質である Mfa1 の遺伝子配列の違いから *mfa1*⁵³、*mfa1*^{70A}、および *mfa1*^{70B} に分類できることを報告した。さらに近年、*mfa1*⁵³、*mfa1*^{70A}、および *mfa1*^{70B} から発現するタンパク質の抗原性に違いがあることを報告した。この遺伝子型の

多様性が *P. gingivalis* の病原性と関連している可能性がある。そこで本研究では遺伝子解析によって異なる遺伝子型の線毛配列を保有することが明らかとなっている *P. gingivalis* ATCC 33277 株 (*fimA*I 型、*mfal*^{70A} 型) および 1439 株 (*fimA*II 型、*mfal*^{70B} 型) を使用し、新たなマウス誤嚥性肺炎モデルを確立するとともに、そのモデルを用いることにより両菌株の病原性を比較した。

II. 対象及び方法

1. 菌種および培養条件

P. gingivalis は ATCC 33277 株および 1439 株を使用した。5% ヒツジ血液、ヘミン (2.5 µg/mL)、メナジオン (5.0 µg/mL) を添加したブルセラ HK 寒天培地を用いて、37°C にて嫌気培養した。GAM 液体培地を用いて 37°C で 48 時間嫌気培養後、遠心分離し上清を除去後、10 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え懸濁した。同様の操作を 2 回繰り返して、十分に菌体を洗浄した。10 mL PBS を加え再懸濁し、得られた菌体懸濁液の OD₆₀₀ を測定し、3.0 (50 µL) となるように調製した。得られた菌液を血液寒天培地に播種し、実際の生菌数 (colony forming unit [CFU]/mL) を確認した。

2. 実験動物

実験動物は雌性 C57BL/6J マウスを用いた。すべてのマウスは、特定病原体を含まない条件で飼育され、8 週齢から 12 週齢の間に使用した。実験は、愛知学院大学動物実験委員会の承認を得て、機関のガイドラインに沿って行った (動物実験計画承認番号: AGU471-1 号)

3. 動物実験のデザイン

誤嚥性肺炎を誘発するために、三種混合麻酔 (塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノール) を腹腔内投与後、頭部を後屈した状態で固定し下顎を NAPOX A-12-1 ピンセットにより挙上させ、サーフロー注射針の外筒 (20G) を用いて経気道挿管を行い、細菌懸濁液 50 µL を気管内投与した。コントロール群には PBS 50 µl を気管内投与した。その後、マウスの生存率を評価するために 1 週間飼育した。また、感染 24 時間後にマウスを屠殺し、血液と肺を採取した。

4. 感染後生存率

生存率の確認のため、コントロール群 (n=6)、ATCC 33277 株群 (n=30) および 1439 株群 (n=32) にて 1 週間飼育し、マウスの生存時間の分布を Kaplan-Meier 法により評価した。

5. 肺の細菌数

感染 24 時間後にマウスを屠殺し、右中下葉を回収した。回収した肺をホモジナイズし、得られた組織液を PBS により段階的に希釈し、血液寒天培地に播種をして肺組織 1 g あたりの CFU を測定した。

6. 肺と血清の炎症性サイトカインの測定

感染 24 時間後にマウスを屠殺し、左肺と血液を回収した。左肺の肺胞内に 50 µL の PBS を注入し、溢出した液を Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) として回収した。血液を遠心分離により血球と血清とに分離し、上清を血清として保存した。BALF と血清に含まれる炎症性サイトカイン量を Quantikine mouse TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit を用いて解析した。

7. 組織学的解析

感染 24 時間後にマウスを屠殺し、右上葉肺を回収した。肺は 10% ホルマリン溶液で 24 時間固

定した。その後、試料を水道水にて 30 分間洗浄し、脱水後、パラフィン包埋を行った。4 μm の厚さに切断し連続組織切片を作製した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、位相差正立顕微鏡により観察した (ATCC 33277 群: 11 枚、1439 群: 13 枚)。また得られた HE 染色像を用いて実質と間質の比率による含気率を ImageJ を使用し計測した。

8. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

P. gingivais ATCC 33277 株、JI-1 株 (ATCC 33277 株由来 *fimA* 欠損株) および 1439 株の全菌体抽出液 (whole cell lysate WCL) を通法に従い調製し、5 $\mu\text{g}/\text{lane}$ となるようにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および 2-メルカプトエタノールと WCL を混合し、100° C で 5 分間加熱して変性させた。その後、タンパク質を SDS-PAGE により展開後、クマシーブリリアントブルー (CBB) にて染色した。

9. 統計学的分析

データは平均値±標準偏差 (SD) として表した。一元配置分散分析 (ANOVA) により P 値が <0.05 の場合に統計学的に有意であるとした。

III. 結果

1. 生存率

最初に、*P. gingivalis* 感染マウス肺炎モデルにおける生存率を評価した。その結果、コントロール群においては規定日数ではすべての個体が生存していた。一方、ATCC 33277 株群および 1439 株群では感染 1 日後から死亡する個体が認められた。1439 株群の生存率は ATCC 33277 群と比較して低かった。

2. 肺組織における *P. gingivalis* の菌数

感染から 24 時間後の肺胞内の *P. gingivalis* の菌数を調べた。1439 株の感染マウス (n=13) の肺組織 1 g あたりの CFU は、33277 株の感染マウス (n=11) の CFU に比べて有意に高かった ($p<0.05$)。

3. 肺組織におけるサイトカイン産生解析

炎症性サイトカインの産生量を ELISA 法で調べた。*P. gingivalis* 感染によって BALF における TNF- α 、IL-1 β 、及び IL-6 は感染群で上昇が認められた。BALF においてはコントロール群ではこれらのサイトカインはほとんど検出されなかったが、TNF- α の産生量は、1439 群 (n=13) では、ATCC 33277 群 (n=11) に比べて有意に増加した ($p<0.05$)。1439 群では、ATCC 33277 群に比べ TNF- α 産生量が 2.78 倍、IL-1 β 産生量が 1.69 倍、IL-6 産生量が 1.68 倍増加していた。一方、血清ではどの群においても炎症性サイトカインの産生量は検出限界以下であった。

4. 肺組織における病理組織学的所見

P. gingivalis 感染を行ったマウスの肺を回収後、肺切片を作製した。その後肺組織の HE 染色による病理組織学的評価を行った。コントロール群では間質の肥厚、出血、炎症性細胞の浸潤などの炎症所見は認められなかったが、1439 株群 (n=13) および ATCC 33277 株群 (n=11) では、間質の肥厚、出血、炎症性細胞の浸潤などの炎症所見が認められた。

5. 肺組織における含気率の計測

P. gingivalis 感染を行ったマウスの肺を回収後、肺切片を作製した。その後切片より実質と間質の比率を ImageJ を用いて肺組織の含気率の評価を行った。その結果、コントロール群と比較して 1439 株 (n=13) および ATCC 33277 株群 (n=11) では有意に低下した。

6. SDS-PAGE による FimA タンパク質発現の解析

1439 株は病原性が高いとされる *fimAII* 型を保有する。FimA が本動物モデルにおいて炎症性サイトカイン産生に影響していることが考えられた。そこで、1439 株における FimA タンパク質発現を SDS-PAGE により検討した。その結果、ATCC 33277 株において明瞭に検出され JI-1 株において欠損している 43-kDa FimA バンドは、1439 株では検出されなかった。

IV. 考 察

本研究では異なる *mfal* 型の線毛を持つ株である ATCC 33277 株と 1439 株を使用し、新たなマウス誤嚥性肺炎モデルでの増悪を観察し、肺炎に与える影響を検討した。これまでの研究ではマウスの肺への感染として、経鼻腔感染や咽頭切開による経気道感染などが行われてきた。しかし、規定する量が肺に流入しているか確認することが難しいことやマウスへの侵襲性に鑑みて、本研究では口腔より経気道的に肺に感染を行うモデルを考案し実験を行った。*P. gingivalis* は LPS、線毛、ジンジパインなどの病原因子を発現しており、これらの因子が直接的または間接的に宿主細胞を活性化し、歯周炎や誤嚥性肺炎の病巣の形成に大きな役割を果たしている。肺炎と *P. gingivalis* との関連において、*P. gingivalis* の培養液の上清 (PgSup) を用いた研究では、PgSup 存在下でヒト歯周細胞および免疫細胞は、炎症関連受容体の発現や炎症性サイトカイン分泌の誘導が認められることが報告されている。また、PgSup 中のジンジパインがヒト肺胞上皮細胞での PgSup 誘導 PAFR 発現し、その結果、上皮細胞への肺炎連鎖球菌の接着が強化されることが報告されている。Okabe らは、ATCC 33277 株由来の PgSup が肺炎連鎖球菌性肺炎を相乗的に増強することを報告した。この報告では ATCC 33277 株の菌体を使用した実験においても肺内に強い炎症が起きなかったことも示している。その理由として *P. gingivalis* は偏性嫌気性菌であり、肺のような酸素が豊富な環境において感染は難しいと考察している。しかし、本研究において感染 24 時間後の時点では *P. gingivalis* の生菌が検出され、特に 1439 株において ATCC 33277 株より約 10 倍多く検出された。これらの結果から、この動物モデルでは、肺胞内の好気的な環境においても *P. gingivalis* は一定程度生存しており、とりわけ 1439 株は ATCC 33277 株と比較して好気性環境への適応能力が高く、感染に有利な素養を持つことが示唆された。また 1439 株では菌体において炎症の誘発が認められたことから、菌体に保有する線毛や LPS 等の成分が強力な炎症応答を引き起こし、感染マウスの生存率が低下していること、すなわち病原性が高いことが示唆された。一方、炎症性サイトカインにおいては株間では TNF- α の産生にのみ有意差が認められた。このことは、すべての炎症性サイトカインが一様に増加するのではなく、特に TNF- α 産生が 1439 株感染により引き起こされることが示唆された。複数の報告において、肺炎患者の BALF または喀痰から *P. gingivalis* が検出されることが報告されている。本研究においても *P. gingivalis* 両株の生存が確認され、さらに BALF から炎症性サイトカインの上昇を認め、炎症反応が起こっていることが示された。一方、血清中のサイトカインの産生がほとんど認められなかったことから、感染早期の段階では免疫応答は局所的であり、本実験条件では全身的な炎症反応は起こっていない可能性が示唆された。*P. gingivalis* は宿主細胞によって発現される様々なパターン認識レセプターによって認識されるが、このプロセスにおいて TLR2 が主要な役割を果たしている。例えば、*P. gingivalis* の生菌に反応した TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生は、ほとんどが TLR2 に依存している。また別の研究では、TLR2 欠損マウスは、*P. gingivalis* の経口感染後の歯槽骨吸収に抵抗することが判明している。さらに歯周炎患者の歯肉組織検体では、健常人のものより TLR2 の発現が高いことが示されている。最も重要なことは、

TLR2 が *P. gingivalis* FimA 線毛の認識に関与していることであり、FimA 線毛は宿主細胞への細菌の接着において重要な役割を果たすだけでなく、炎症性シグナル伝達経路の誘導にも関与している。一方、Mfa1 線毛と TLR との関連については不明な点が多いが、近年、Mfa1 線毛による刺激が TLR を介してマウス歯肉線維芽細胞の細胞移動や接着に関連する遺伝子の発現を著しく増加させて自然免疫を活性化させることが報告されている。1439 株は DNA シークエンスを用いた *fimA* 遺伝子型解析により *fimA*II 型を持つことが報告されている。本研究において明らかになった *P. gingivalis* 1439 株における自然免疫の刺激が FimA 線毛によって起こっている可能性が考えられた。そこで 1439 株の FimA タンパク質発現を全菌体抽出液を用いて調べたが、FimA バンドは確認されなかった。この結果から 1439 株は FimA タンパク質を発現していないことが示唆され、本研究において、FimA 線毛による自然免疫活性化作用は考慮する必要はないと考えられる。本株における FimA タンパク質の欠損については、その原因を解明するため、*fimA* 遺伝子発現に関わる領域や調節因子の解析を今後行っていく予定である。本研究にはいくつかの限界がある。*P. gingivalis* は菌株により自然免疫の反応性に及ぼす影響は異なることが知られている。また、*P. gingivalis* は外界を取り巻く環境の変化に適応するために二成分制御系により環境シグナルを感知することによって代謝経路や病原因子の発現を変化させることが知られており、その二成分制御系に関わる遺伝子変異株は病原性に関わる遺伝子の発現に影響を及ぼす。上記の *P. gingivalis* の菌株間での性質の違いや病原因子の制御機構の存在から、今後はマウス誤嚥性肺炎モデルに適応させる *P. gingivalis* 株を変えて検討することを予定している。また *P. gingivalis* の菌体成分の病原性と *mfa1* 遺伝子型との関連について、さらなる解析を行う必要がある。今回、モデルの確立に時間を要したこと、また感染による炎症の程度を確認するために、肺感染開始後 24 時間（感染初期）の検証を行ったが、長期的な効果は明らかとなっていないため、より長期の感染モデルを用いてさらに解析する必要がある。

V. 結 論

本研究では、肺炎モデルにおいて *P. gingivalis* の病原性が株間で異なることが示された。また ATCC 33277 株と 1439 株では 1439 株で炎症が亢進しており、*mfa1*^{70B} 型を持つ 1439 株の方がより病原性が高いことが示唆された。しかし ATCC 33277 株と 1439 株の違いについては *mfa1* の配列が異なること、抗原性が異なること以外は不明である。今後は、*P. gingivalis* 株のジンジパイン活性等を調べ遺伝子型と病原因子との関連を調査していく必要がある。