

氏名	かわい しんご 河合 真悟
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博士甲 第 号
学位授与の日付	2025年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	歯周病が頭頸部局所および全身免疫系に与える影響の解明
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 耕二 (博士 (薬学)) (副査) 教授 柴田 淳史 (博士 (医学)) 教授 松下 麻衣子 (博士 (医学))
慶應義塾大学学位規程第 11 条に基づく審査委員会実施日： 2025 年 2 月 4 日	

論文内容の要旨

1. 背景

歯周病は口腔内細菌叢の破綻を原因とする慢性炎症性疾患であり、歯槽骨の吸収を引き起こし、重度になると歯の脱落を引き起こす。厚生労働省が公表した「令和4年歯科疾患実態調査」によれば、15歳以上の日本人のうち、歯周ポケットの深さが4mm以上の、やや進行した歯周病の歯を持つ人の割合は47.9%と報告され、歯の喪失の主要な原因の一つとされている。歯周病の影響は口腔内に留まらず、全身の健康に深く関与する。歯周病は、アテローム性動脈硬化、肝炎、糖尿病、誤嚥性肺炎の発症リスクを高めることが報告されている。歯周病による全身への影響は、歯周病細菌や細菌構成物、代謝物が血流に侵入することによる全身性の炎症、口腔内細菌が直接呼吸器や腸管へと移行することによる、感染や腸内細菌叢の異常（ディスバイオーシス）が原因と考えられているが、未だ十分に解明されていない。

歯周病の開始と進行を研究するために、ラットやマウスを用いて、臼歯に絹糸を結紮する絹糸誘導性歯周病モデルが使用される。本モデルでは、絹糸結紮歯の表面に口腔内細菌を密着させ擬似的なプラークを形成させることで歯周病を誘導する。これにより、1週間以内という短期間で歯槽骨の吸収、口腔内細菌叢の破綻を引き起こす。一方で、齧歯類とヒトでは歯式、口腔内細菌叢、食性、生態環境が大きく異なり、マウスでの絹糸誘導性歯周病モデルがどの程度ヒトの歯周病を反映しているかには不明な点が多い。特に、長期間の持続的な炎症や全身免疫系への影響の解析はこれまで不十分である。そのため、本研究では、最大5週間の長期間誘導した絹糸誘導性歯周病マウスモデルを作製し、全身免疫応答の解析を行った。

2. 手法

絹糸誘導性歯周病モデル、インフルエンザウイルス感染、ブレオマイシン誘導性肺線維化モデル

麻酔したのち、マウスの上顎両側の第 2 臼歯に麻酔下で絹糸を結索、覚醒させた。コントロール群には麻酔後、結索せず歯周病群と同程度の時間静置し、その後覚醒させた。インフルエンザウイルス感染は麻酔したマウスに 50 PFU の A 型インフルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/1934) を気管内投与することで行った。肺線維化の誘導は、麻酔したマウスに 0.0018 mg/g のブレオマイシンを気管内投与することで行った。

歯槽骨吸収 (ABC-CEJ 距離) の測定

対照群、歯周病群から回収した頭蓋骨から筋肉などを取り除き、漂白、殺菌をおこなった。染色したのち実体顕微鏡で撮影した。ABC-CJ 距離は画像解析ソフトウェアの Fiji を用いて解析した。

フローサイトメトリー

対照群、歯周病群から回収したリンパ節をすり潰し免疫細胞を単離した。歯肉・歯根膜、NALT、BALF、肺は酵素液と反応させ、免疫細胞を単離した。単離した細胞は蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

血清中サイトカインの測定

マウス血清中サイトカインは Mouse T Helper Cytokine Panel Version 3 (BioLegend) を用いて測定した。

口腔内細菌の DNA 抽出と 16S rRNA シーケンス

対照群、歯周病群から採取した口腔スワブから細菌ゲノム DNA を抽出した。16S rRNA V3-V4 領域に特異的なプライマーを用いて Amplicon PCR を行い、さらにインデックス配列を付加することで 16S rRNA ゲノムライブラリーを合成した。その後 Miseq (Illumina) によりシーケンスを行った。得られたデータから Bowtie2 を用いて宿主ゲノム配列を除去したのち、QIIME2 を用いて口腔内細菌叢構成を解析した。

定量 PCR

対照群、歯周病群から回収した肺組織から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。その後リアルタイム定量 PCR により各遺伝子の発現量を検証した。

口腔内細菌数の定量

対照群、歯周病群から採取した口腔スワブから細菌ゲノム DNA を抽出した。16S rRNA V3-V4 領域に特異的なユニバーサルプライマーを用いてリアルタイム定量 PCR を行った。検量線の作成には、*E.coli* DH5α 株を LB 培地で培養、DNA 抽出を行うと共に CFU assay を行った。測定された細菌数を基に DNA 抽出液を希釈し、 10^1 ~ 10^8 CFU までの検量線を作成した。

組織学的解析

対照群、歯周病群から肺を摘出し、マイルドホルム固定した。その後組織切片を作製し、ヘマトシキリン・エオジン (HE) 染色、トリクローム染色により肺の組織学的解析を行った。

2. 結果と考察

C57BL/6J マウスの上顎両側の第 2 臼歯に麻酔下で絹糸を結索した。まず、結紮 1 週間後に頭蓋骨を回収し、上顎の第 1 から第 3 臼歯のセメントエナメル境 (CEJ) から歯槽骨骨頂 (ABC) 間の距離 (CEJ-ABC 距離) を測定し上顎歯槽骨吸収を測定した。その結果、CEJ-ABC 距離はコントロール群と比較して歯周病誘導群で有意に増加した。歯周病誘導による長期的な影響を探索するため、誘導から 5 週間まで 1 週間ずつ CEJ-ABC 距離を測定した。骨吸収は誘導 2 週間後がピークとなり、その後は 5 週間後まで維持された。実験期間中に歯の脱落が起きる個体は認められなかった。次に、歯周病モデルマウスにおける口腔内細菌叢を検証した。誘導から 1 週間後に口腔内細菌を回収し、細菌叢を 16S rRNA シークエンスを用いて解析した。歯周病誘導 1 週間で口腔内細菌数は増加し、この傾向は 5 週間後まで維持された。細菌叢解析の結果、歯周病誘導マウスではコントロール群と比較して大きく細菌叢が変化していた。コントロール群では *Lactococcus* 属が主な構成細菌であったが、誘導後には *Enterococcus* 属、*Proteus* 属、*Escherichia-Shigella* 属の比率が高くなっていた。16S rRNA シークエンスの結果を基にさらなる解析を行ったところ、個々のサンプル中の細菌叢の多様性を示す α 多様性は歯周病誘導後も大きな変化はなかった。サンプル間の細菌叢の相違度を示す β 多様性はコントロール群と歯周病誘導群で有意に異なっており、歯周病モデルでは構成細菌の多様性は維持されるが、その細菌種は変化していると考えられる。さらにこの β 多様性の変化は誘導 5 週間後も持続しており、口腔内細菌叢の破綻は 5 週間維持されることが分かった。

続いて、自然免疫応答、適応免疫応答に関与する免疫細胞を解析した。歯周病誘導から 5 週間まで 1 週間ごとに解析を行った。頭頸部局所の免疫系として、歯肉、鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT)、頸部リンパ節を解析対象とし、全身免疫系の解析として、気管に接する縦隔リンパ節、腸管膜リンパ節、脾臓を解析対象とした。まず、自然免疫応答に関与する細胞群の解析を行った結果、歯肉では好中球が歯周病誘導 1 週間後に増加していた。この増加は一過的であり、誘導 4 週間後には定常状態の細胞数と同等まで戻った。同様に好酸球と樹状細胞の一過的な増加が見られた。また、NALT では好酸球、好中球、樹状細胞の誘導はやや遅れて 2 週間後に一過的に増加し、5 週間後には定常状態

まで減少した。口腔内の所属リンパ節である頸部リンパ節では、好中球、樹状細胞、マクロファージ、単球が誘導 1 週間後に著しく増加した。その後これらの細胞群は経時的に減少したものの、誘導 5 週間の時点でも定常状態に比較して増加傾向が認められた。一方、縦隔リンパ節の自然免疫関連の細胞に大きな変化はなく、好酸球のみが誘導 1 週間後に 1 部のマウスで増加し、3 週間後には定常状態まで減少した。脾臓では誘導 2~3 週後に上記全ての自然免疫系細胞が増加し、5 週間後まで維持されていた。腸管膜リンパ節においても自然免疫系の細胞の増加が歯周病誘導 5 週後まで維持されていた。

次に適応免疫応答に関与する T、B 細胞とそのサブセットを解析したところ、歯肉、NALT、縦隔リンパ節ではこれらの細胞数に変化は見られなかった。頸部リンパ節では誘導 1 週間後に B 細胞が増加し、2 週間後から胚中心 B 細胞が著しく増加した。これは誘導 5 週間まで維持された。また、T 細胞集団をさらに詳細に解析したところ、 $CD4^+$ および $CD8^+$ T 細胞の両方でエフェクター T (T_{eff}) 細胞、セントラルメモリー T (T_{cm}) 細胞、ナイーブ T 細胞の細胞数が誘導 1 週間で増加した。 T_{eff} 細胞と T_{cm} 細胞の増加は一過的であり、誘導 3~4 週間後には定常状態まで回復したが、ナイーブ T 細胞は増加したまま誘導 5 週間まで推移した。脾臓では、誘導 5 週間後において、B 細胞および $CD4^+$ と $CD8^+$ T 細胞の両方でエフェクターメモリー T (T_{em}) 細胞の増加が見られたが、胚中心 B 細胞数は変化しなかった。腸管膜リンパ節では B 細胞は誘導 5 週間に向けて増加傾向にあり、胚中心 B 細胞は誘導 3 週間で一過的に増加した。 $CD4^+$ および $CD8^+$ T 細胞も同様に誘導 5 週間に向けて増加していた。歯周病誘導時に T 細胞の活性化が認められたことから、血清中の Th1/2/17 関連サイトカインを測定した。その結果、誘導 4 週目に IL-17A と IL-22 が増加していた。

以上の解析結果から、絹糸誘導性歯周病では、歯肉および NALT の免疫系が速やかに活性化されるものの、3 週間後には終息することが判明した。これに対し、頸部リンパ節では 5 週間後まで活性化状態が持続していた。そして、脾臓、腸管膜リンパ節、血中で炎症応答が確認されていたことから、誘導 3~4 週間後から全身で免疫応答が誘導されていることが分かった。

絹糸誘導性モデルにおける免疫系の活性化が口腔内細菌によるものであるかを検証するために、抗生物質投与後に歯周病を誘導し、頸部リンパ節における免疫応答の活性化を測定した。その結果、免疫応答は抗生物質投与によって抑制されたことから、細菌叢依存的に免疫応答が誘導されていることを確認した。

歯周病はインフルエンザウイルス感染や SARS-CoV-2 感染の発症率や重症率に影響することが報告されている。そこで、肺における免疫応答を歯周病 5 週間後に解析した。

肺胞洗浄液と肺組織、肺毛細血管中の免疫系細胞を解析したところ、肺胞洗浄液では変化は見られなかった。一方、肺組織中では好中球、好酸球が増加し、間質マクロファージ、CD103⁺樹状細胞が減少傾向にあった。毛細血管中では好酸球が増加、CD103⁺樹状細胞が減少していた。B 細胞、CD4⁺および CD8⁺T 細胞は肺組織中では変化はなく、毛細血管中で増加していた。CD4⁺および CD8⁺T 細胞の両方でナイーブ T 細胞が顕著に増加し、CD4⁺T 細胞でエフェクターメモリー、CD4⁺および CD8⁺T 細胞の両方でセントラルメモリーT 細胞が増加傾向にあった。このことから、歯周病誘導によって肺組織、肺血管中で免疫応答が誘導されていることがわかった。このことから呼吸器感染症への影響があると考え、誘導 3 週間後にインフルエンザ感染を行った。その結果、体重変化、死亡率ともに対照群と比較して変化は見られなかった。

歯周病誘導マウスで血中に IL-17A、IL-22 が上昇していたことから、この 2 つのサイトカインが疾患進行にかかわることが知られているブレオマイシン誘導性肺線維化モデルを、歯周病誘導 5 週間後に誘導した。その結果、IL-17 が有意に増加、IL-22、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 といった炎症性メディエーターが増加傾向にあった。加えて、肺において B 細胞、CD4⁺および CD8⁺T 細胞が増加傾向にあり、炎症が亢進していることが示唆された。

本研究ではマウスによる絹糸誘導性歯周病モデルを構築し、誘導 3~4 週間以降の持続的な口腔内細菌叢の異常および全身への炎症を引き起こすことを見出した。そして、歯周病が肺線維化モデルでは炎症が亢進する可能性を見出した。一方で、歯槽骨吸収は骨形成が上回り回復傾向にあり、歯の脱落は起きなかったこと、ヒト歯周病の原因菌の定着が認められなかった。これらの制限があるものの、本研究は歯周病の全身への影響の理解を進めると共に、呼吸器疾患への影響を実験的に証明する糸口になると考えている。

論文審査結果の要旨

1. 審査概要および判定結果

申請者は、歯周病モデルにおける全身への影響を明らかにすることを目指して研究を行い、博士論文を作成、研究発表を行なった。絹糸誘導性歯周病モデルにおける頭頸部と全身の免疫応答を包括的かつ経時的に解析し、組織ごとの免疫応答を明らかにした。加えて肺線維化モデルにおける炎症応答が増悪することを示し、歯周病における呼吸器疾患への影響を明らかにした。

本審査委員会では申請者が約 25 分間の研究発表を行ったのち、約 45 分間の質疑応答を行った。最後に申請者が退室し、審査委員による協議を行った。

発表全体に対し、審査委員よりこれまで報告されている絹糸誘導性歯周病モデルを用いた研究との違いは何かとの質問を受けた。申請者は、歯周病モデルを用いたこれまでの解析は 3 週間に留まっていたのに対し、本研究では長期間の影響を検証し、さらに全身の免疫組織へと検証を拡大し、そして、呼吸器疾患との関連を示した点であると回答した。

続く質問では、研究を通して野生型マウスのみを用いて解析を行っているが、観察された現象が歯周病誘導に依存しているかはまだ疑問が残る。直接の因果関係を示すにはどうしたらよいかとの質問を受けた。申請者は、この研究だけでは確かに口腔内細菌が他臓器に移動し炎症を起こしているのか、口腔内の炎症が影響を及ぼしているかは判別ができない。申請者は、腸管に抗生物質が到達しないよう口腔内にのみ投与する、または Myd88 ノックアウトなど口腔内で細菌による炎症が誘導されないマウスを用いて実験を行うことで示すことができると考えていると回答した。これに関連し、歯周病誘導群で増加していた細菌を特異的に除去することは可能かとの質問を受けた。申請者は、抗生物質のスペクトルを使えば、ある程度の範囲で細菌を選別できるが、特定の細菌を除去するのは難しい。歯周病で増えていた細菌を定着させることは可能であると回答した。

歯周病誘導により増加していた口腔内細菌は、食糞によって定着したという仮説を立てているが、因果関係を証明できていないのではないかと質問を受けた。申請者は、床敷を網に変更し食糞を防ぐことはできるが、基礎的なこととして研究が行われているため、本研究では行っていないと回答した。これに対し、ヒトへの応用を考えると食糞を防ぐ実験は大事ではないかと助言を頂いた。

続いて、ヒト歯周病菌の *Porphyromonas gingivalis* を定着させる実験の方が良いのではないかと質問を受けた。申請者は *P.gingivalis* を用いたモデルでも検証する必要があると考え確立を試みたが、定着が見られなかったため断念したと回答した。これに対し、歯周病モデルで増えていた腸内細菌がニッチの獲得に勝つということかと質問を受けた。申請者は、*P.gingivalis* は嫌気要求性が高く好気では死んでしまうが、好気環境でも

生存可能な腸内細菌に負けたのではないかと考えていると回答した。また、歯槽骨吸収が短期間で変動しているが、このような変動は一般的であるのかとの質問を受けた。申請者は骨の状態は骨吸収と骨形成のバランスで成り立っており、歯周病誘導 2 週間以降は骨形成が優位になったと考えていると回答した。これを受けて、炎症と骨吸収の関係は何か分かっているのかとの質問を受けた。申請者は IL-17 産生が骨吸収に寄与しており、IL-17 をノックアウトした場合、骨吸収が起きないことが報告されていると回答した。

次に免疫応答の発表に対し、頸部リンパ節と NALT での免疫応答が異なるのはなぜかとの質問を受けた。申請者は、まず、歯周病における主な免疫応答を担っているのは頸部リンパ節で、これは既報と一致していた。そして、NALT は通常のリンパ節とは異なりリンパ管や血管から抗原を受け取れず、粘膜から直接抗原を補足している。このことから、鼻腔で細菌負荷が増加したことで免疫応答が起きていると考えていると回答した。これを受けて、歯肉、NALT と頸部リンパ節の 3 つの組織間の免疫応答が異なる理由は何かとの質問を受けた。歯肉は歯周病に反応しているが、NALT は反応が小さいため歯周病への関与は少ないと考えていると回答した。加えて、離れた組織では遅れて免疫応答が起きているが、こういった仕組みを考えているのかとの質問を受けた。申請者は、細菌自体が組織に移動して免疫応答が起きている、または、歯周病による炎症が他臓器に影響、リンパ球がリンパ節へ止まるシグナルが出て集積しているのではないかと考えていると回答した。続いて、多くの組織で T 細胞を測定しているが、抗原特異性については考えているのかとの質問を受けた。申請者は、その点については自分も興味を持っており、抗原特異性を見る必要があると考えている。既報でも抗原特異性について検証しているため、そちらを参考に行いたいと述べた。

インフルエンザウイルス感染では歯周病誘導群で死亡が遅れているとあったが、考えられる機序は何かとの質問を受けた。申請者は歯周病誘導によるサイトカインが造血細胞に作用して炎症応答を強めるとの報告があり、感染に対する防御応答が強くなったためではないかと回答した。

加えて、ブレオマイシン誘導性肺線維化モデルにおいて、線維化は対照群と歯周病誘導群で差は見られない一方、T 細胞の浸潤や炎症応答が増加していたが何故かとの質問を受けた。申請者は、線維化モデルは炎症期を経てから組織修復が起き線維化が起きる。今回の解析タイミングは炎症期における解析のため、線維化は変化が見られなかったと考えられる。線維化の評価にはより長期の観察が必要であると回答した。また、ヒト歯周病では常に炎症が起きているのではないかと指摘を受けた。ヒトの症状を模倣するならば、発表では誘導 5 週間後に線維化を誘導していたが、血中サイトカイン増加のピークである誘導 4 週間後に行うべきであると助言いただいた。最後に、ヒトへの応用を考えた場合、今後どのような実験を行うべきかとの質問を受けた。申請者は、ヒト歯周病菌である *Pgingivalis* 定着を検討し、実験を行いたいと考えていると回答した。

公聴会においては、まずヒト歯周病を考慮するとより長期の誘導条件で行う必要があるのではとの質問を受けた。これに対し、申請者は確かにその通りではあるものの、結紮糸の長期維持が技術的に困難であることから、まずは5週間までの免疫応答を解析したことを説明した。これを受けて、より長期の誘導を行うためにどういった対策を考えているかと質問を受けた。申請者は、結紮した絹糸を一定期間で交換する、または、歯周病原菌を定着させることで対応可能と回答した。ただし、絹糸を外すとプラークがリセットされる点は考慮すべきである。続いて、血中サイトカイン値が同一群内で不均一であるとの指摘に対し、申請者は口腔内細菌の全身移行やサイトカインの漏出に固体差があったのではないかと推測を示した。また、マウスが糞食することを考慮し、今回用いたモデルがどの程度ヒト歯周病と一致しているのかとの質問に対し、ヒト歯周病原菌は見られないが、増えていた菌は種レベルで解析するとヒト歯周病で見られるものであり、ヒト歯周病原菌以外が誘発する免疫応答を解析できたことは有用であると回答した。

申請者の博士学位論文、学位審査委員会および公聴会での発表や試問への回答は概ね妥当であった。歯周病モデルを用いて、歯周病が全身免疫系に与える影響を詳細に観察するとともに、ブレオマイシン誘導性肺線維における炎症応答の悪化に関与することを明らかにした。本研究は学術的価値があるものと考えられ、博士（薬科学）を付与するのに必要な能力を有すると判断した。

論文目録

主論文に関する原著論文

Shingo Kawai, Hiroyuki Oguchi, Mayumi Endo, Koji Hase, Shunsuke Kimura. The mouse experimental periodontitis by silk-ligature placement triggers systemic inflammation potentially exacerbating pulmonary inflammation. *Biomed Res.* 2025. in press.