

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	河合 真悟
主 論 文 題 名：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				
(内容の要旨) 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4 mm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る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。 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 シーケ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 シーケ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 週間後に一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メモリー T (T_{em}) 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_{em} 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 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 T_{em} 細胞、CD4⁺および CD8⁺T 細胞の両方で T_{em} 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。