

博士学位論文 2024 年度

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

慶應義塾大学薬学研究科

河合 真悟

目次

略語.....	3
第 1 章 序論	4
第 2 章 方法および実験材料.....	6
2-1 使用動物	6
2-2 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	6
2-3 ABC-CEJ 距離の測定	6
2-4 フローサイトメトリー	7
2-5 血清中サイトカインの測定	9
2-6 口腔内細菌の DNA 抽出と 16S rRNA シークエンス.....	9
2-7 qPCR による口腔内細菌数の定量.....	10
2-8 RNA 抽出、cDNA 合成、qPCR.....	10
2-9 HE 染色、トリクローム染色	11
2-10 統計処理.....	11
第 3 章 結果	13
3-1 絹糸誘導性歯周病モデルにおける骨吸収は長期間維持された	13
3-2 絹糸誘導性歯周病モデルにおける口腔内細菌叢の破綻は長期間維持された	13
3-3 歯周病モデルは全身で自然免疫応答を誘導した	14
3-4 歯周病モデルは全身で適応免疫応答を誘導した	15
3-5 口腔内細菌依存的に免疫応答が誘導されていた	16
3-6 歯周病モデルは肺における免疫応答を誘導した	16
3-7 歯周病モデルはブレオマイシン誘導性肺線維化を増悪させる傾向にあった	17
第 4 章 考察	19
参考文献.....	21

略語

本論文では以下の略語を使用する

- TLR2: Toll-like receptor2
- RANKL: receptor-activator of NF- κ B ligand
- Th17: T helper 17 cell
- Th1: T helper 1 cell
- Th2: T helper 2 cell
- IL-1: Interleukin-1
- IL-6: Interleukin-6
- TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha
- OPG: Osteoprotegerin
- IL-22: Interleukin-22
- IL-17: Interleukin-17
- CCL2: C-C motif chemokine ligand 2
- CEJ: Cement enamel junction
- ABC: Alveolar bone crest
- BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid
- NALT: Nasal-associated lymphoid tissue
- cLN: Cervical lymph node
- medLN: Mediastinal lymph node
- MLN: Mesenteric lymph node
- Tem: Effector memory T cell
- Tcm: Central memory T cell

第1章 序論

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る。2022年に公表された我が国の調査結果では15歳以上の47.9%が4 mm以上の歯周ポケットをもつ中程度の歯周病であることが報告されている¹。世界的にも罹患率は高く、2013年の報告では成人の45-50%が中程度の、11%が重度の歯周病に罹患している²⁻⁴。

口腔内の炎症が悪化することで、歯槽骨の吸収が進行する。代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* は骨芽細胞の TLR2 を介して RANKL 産生を促進することで破骨細胞を誘導し、これにより歯槽骨の吸収が進行する⁵。また、Tヘルパー17 (Th17) 細胞の歯肉への集積も骨芽細胞と歯根膜細胞の RANKL 産生により破骨細胞の誘導を促進する⁶。歯周病により歯を支える歯槽骨が失われることで、歯が脱落し口腔機能の低下を引き起こす。歯周病の予防や治療は生活の質、健康寿命の維持に重要である。

歯周病の影響は口腔内に留まらず全身におよび、重度の歯周炎患者では IL-1 や IL-6 などの炎症性メディエーターの血中濃度が高く、血中の好中球数も増加する⁷⁻¹⁰。また、口腔内細菌が血流に侵入すること、腸管や肺などへ移行することが報告されている¹¹。

歯周病の全身への影響としては、アテローム性動脈硬化や肝臓、糖尿病、関節リウマチ、アルツハイマーの増悪につながることを示唆されている^{12,13}。炎症性腸疾患では口腔内細菌の *Fusobacteriaceae* や *Veillonellaceae* が腸管で検出され、ディスバイオーシスが疾患発症に関与することが報告されている^{14,15}。 *Fusobacterium nucleatum* は大腸がんの腫瘍部位で検出される。この株は口腔内細菌と同一株であることから、口腔内細菌が何らかの原因で腫瘍部位で増幅することが、大腸がんの悪化に関与すると考えられている¹⁶。 *F.nucleatum* が持つ複数アドヘシンは Wnt- β -カテニンシグナル伝達を介してがん細胞の増殖を亢進すること、免疫細胞の抑制受容体と結合し「免疫逃避」を誘導することが報告されている^{17,18}。

疫学研究から歯周病と呼吸器疾患との関連も示唆されている。歯周病患者は歯周病ではない人と比較して市中肺炎にかかるリスクが約4倍高く¹⁹、喘息の発症リスクが2~4倍高い^{20,21}。また、高齢者へ口腔ケアを行うとインフルエンザウイルスの発症率が低下し²²、歯周病患者では COVID-19 の重症率が高いとの報告もある²³。

しかしながら、歯周病と全身性疾患の関係については未だ不明な点が多く残されている。歯周病進行メカニズムや全身疾患への影響を検証するために、これまで齧歯類、イヌ、霊長類を用いた実験的歯周病モデルが使用されてきた。近年では、免疫応答に関する幅広い情報があり、遺伝子組み換え動物、試薬の入手のしやすさなど研究資源が整っているマウスを用いた研究の需要が高い。例えば、ヒト歯周病菌で代表的な

P.gingivalis を口腔内へと投与するモデルや、臼歯に絹糸を巻きつける絹糸誘導性歯周病モデルが使用されている。一方で、マウス口腔内への *P.gingivalis* の安定した定着が困難な場合も多く、比較的簡便に特定のタイミングで誘導できる絹糸誘導性歯周病モデルのマウスへの利用が増えてきている。

絹糸誘導性歯周病モデルにおける免疫応答についての報告はいくつか存在する。口腔内においては好中球、Th17 細胞の増加による骨吸収を促進する⁶。また、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL、OPG といった炎症性サイトカインの増加も認められている²⁴。加えて、口腔の所属リンパ節である頸部リンパ節ではエフェクターメモリーT細胞、B細胞が増加する⁶。口腔外組織への影響も報告されており、口腔内の Th17 細胞が腸管へ遊走することで腸炎を悪化させること²⁵、歯周病による全身炎症が造血細胞に影響を与え関節リウマチを増悪させることが分かってきている²⁶。

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慎重な解釈が必要である。特に、長期間の持続的な炎症の影響、全身への影響の研究は未だ不十分である。そして、歯周病と他の臓器における疾患との関連にも実験的証拠に乏しい部分がある。そのため、本研究では歯周病における全身への影響を包括的に理解するため絹糸誘導性歯周病マウスモデルを用いて全身免疫応答の経時変化を解析し、さらに、呼吸器疾患との関連を解析した。そして、肺炎症を増悪させる可能性を見出した。この研究は、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明らかにする糸口になると考えられる。

第2章 方法および実験材料

2-1 使用動物

雄 C57BL/6J マウスを日本エスエルシー株式会社（静岡、日本）から購入し、慶應義塾大学薬学部動物飼育施設（東京、日本）で飼育した（21~22°C、12 時間交互明暗サイクル）。特に断りのない限り、全ての動物実験に雄マウスを用いた。すべての動物実験は、慶應義塾大学の倫理委員会の承認を得た(Y1-23045)。マウスには γ 線滅菌したCE-2（日本クレア）を与えた。一部の実験ではアンピシリン（1 mg/mL、ナカライテスク、京都、日本）、ネオマイシン（1 mg/mL、ナカライテスク）、バンコマイシン（0.5 mg/mL、富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本）を1週間自由飲水させた。

2-2 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

C57BL/6J マウスに対する絹糸誘導性歯周病モデルの誘導は既報のプロトコルに従った²⁷。簡単には三種混合麻酔薬を腹腔内投与し深麻酔に達したことを確認したのち、マウスの上顎両側の第2臼歯に麻酔下で絹糸を結索した。結索したのち、アンチセダン（日本全薬工業、福島、日本）を腹腔内投与し覚醒させた。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（日本化薬、東京、日本）を気管内投与することでおこなった。

2-3 ABC-CEJ 距離の測定

C57BL/6J マウスのセメントエナメル境（CEJ）から歯槽骨骨頂（Alveolar bone crest; ABC）間の距離（CEJ-ABC 距離）測定は既報のプロトコルに従い²⁷、若干の改変を加えて行った。簡単には回収した頭蓋骨をオートクレーブを用いて煮沸し、筋肉などを取り除く工程を2回行った。その後、頭蓋骨を3%過酸化水素水に1時間漬け、漂白、殺菌をおこなった。次にエオジン・フロキシジン液（富士フィルム和光純薬株式会社）、0.05%トルイジンブルー（富士フィルム和光純薬株式会社）で染色し、ルーラー（ケニス株式会社、大阪、日本）と共に実体顕微鏡（ライカ、Wetzlar、ドイツ）で撮影した。ABC-CJ 距離は Fiji を用いて解析した。

2-4 フローサイトメトリー

リンパ節（頸部リンパ節、縦隔リンパ節、腸管膜リンパ節、脾臓）は 100 μ m セルストレーナー（Greiner Bio-one, Kremsmunster, Austria）上ですり潰し、15 mL もしくは 50 mL コニカルチューブに入れた 2R (2% NBCS, 100 μ g/mL Penicillin-Streptomycin, 10 mM HEPES/RPMI1640)中に懸濁した。細胞懸濁液を遠心 (1,200 rpm、10 分、4°C) したのち、2P (2% NBCS, 100 μ g/mL Penicillin-Streptomycin, 10 mM HEPES/D-PBS(-))に再懸濁し V 底 96 ウェルプレートに移した。脾臓のみ RBC Lysis Buffer (Biolegend, San Diego, USA) に再懸濁し、赤血球を溶解したのち V 底 96 ウェルプレートに移した。歯肉、鼻咽頭関連リンパ組織は 250 μ L の酵素液 (10 mg/mL コラゲナーゼ、0.05 mg/mL DNaseI/2R) 中でミンスしたのち、歯肉サンプルに破碎した歯槽骨を加えた。次に 1.5 mL の酵素液を加え、サーモシェイカー (ThermoMixer C, eppendorf, Hamburg, ドイツ) で 20 分、37°C、1,000 rpm での振盪を行った。歯肉・歯槽骨サンプルに 0.5 M EDTA を 20 μ L 添加し、さらに 10 分、37°C、1,000 rpm の振盪を行った。その後 100 μ m セルストレーナーに通しながら、細胞懸濁液を遠心 (1,200 rpm、10 分、4°C) したのち、2P に再懸濁し V 底 96 ウェルプレートに移した。CD16/32 に対するモノクローナル抗体 (S17011E; BioLegend, San Diego, CA, USA)を用いて氷上で、Fc 受容体を 15 分間ブロッキングした後、表面抗原染色をおこなった。使用した抗体は以下の表に示した。死細胞は Fixable Viability Stain 780 (FVS780; BD Biosciences) で染色した。4°C で 30 分インキュベートした後、遠心による洗浄 (1500 rpm、3 分、4°C) を 2 度行った。

肺組織と気管支肺胞洗浄液のフローサイトメトリーを行う際には FITC 結合抗 CD45 (30-F11; BioLegend) を D-PBS(-)で 50 倍希釈したものを 300 μ L 尾静脈投与したのち、安楽死させた。その後気管支肺胞洗浄液を採取し、D-PBS(-)で肺を脱血してから肺を採取した。肺を 5 葉に分けたのち、Multi Tissue Dissociation Kit1 (Miltenyi Biotec, Rhineland, ドイツ)で調整した酵素液中に組織を入れ、gentleMACS Octo Dissociator with Heaters (Miltenyi Biotec)の組織処理プロトコル m_LDK1 を用いて細胞回収処理を行った。処理後の溶液を 100 μ m セルストレーナーに通しながら 50 mL コニカルチューブに入れた 2R 中に懸濁した。細胞懸濁液を遠心 (1,200 rpm、10 分、4°C) したのち、40% Percoll に再懸濁し 15 mL コニカルチューブに移したのち、70% Percoll を重層し遠心した (2,000 rpm、20 分、室温)。リンパ球画分をパスツールピペットを用いて回収し、15 mL コニカルチューブに入れた 2P 中に懸濁した。

気管支肺胞洗浄液は 15 mL コニカルチューブに入れた 2P 中に懸濁し、細胞懸濁液

を遠心（1,200 rpm、10 分、4°C）したのち、2P に再懸濁し V 底 96 ウェルプレートに移した。その後、CD16/32 に対するモノクローナル抗体（S17011E; BioLegend）を用いて氷上で 15 分間ブロッキングした後、表面抗原染色をおこなった。使用した抗体は以下の表に示した。死細胞は Fixable Viability Stain 780 で染色した。4°C で 30 分インキュベートした後、遠心による洗浄（1,500 rpm、3 分、4°C）を 2 度行い細胞固定液を加えた。10 分間 4°C で静置することにより細胞を固定した。フローサイトメトリーは FACS Symphony フローサイトメーターと DIVA v9.0（BD Biosciences）を用いて行い、データは FlowJo version 10.9（BD Biosciences）を用いて解析した。

抗体名	クローン	メーカー	希 釈 倍 率
TrueStain FcX (anti-CD16/32)	93	BioLegend	1:200
BUV395 anti-mouse CD45	30-F11	BD Biosciences	1:400
BUV395 anti-mouse CD4	RM4-5	BD Biosciences	1:400
BUV737 anti-mouse CD11b	M1/70	BD Biosciences	1:400
BUV737 anti-mouse TCR β - chain	H57-597	BD Biosciences	1:400
BV421 anti-mouse Siglec-F	E50-2440	BD Biosciences	1:200
Pacific Blue anti-mouse GL-7	GL-7	BioLegend	1:400
BV510 anti-mouse CD3e	145-2C11	BD Biosciences	1:400
BV510 anti-mouse B220	RA3-6B2	BD Biosciences	1:400
BV510 anti-mouse CD44	IM7	BD Biosciences	1:400
BV605 anti-mouse CD11c	N418	BioLegend	1:400
BV650 anti-mouse CD62L	MEL-14	BD Biosciences	1:400
BV711 anti-mouse Ly-6C	HK1.4	BioLegend	1:400
BV785 anti-mouse CD103	2E7	BioLegend	1:50
BV786 anti-mouse I-A/I-E	M5/114.15.2	BD Biosciences	1:400
BV786 anti-mouse CD19	1D3	BD Biosciences	1:400
FITC anti-mouse CD95	Jo2	BD Biosciences	1:400
PE anti-mouse F4/80	BM8	BioLegend	1:400
PE anti-mouse CD64	X54-5/7.1	BioLegend	1:100
PE anti-mouse B220	RA3-6B2	Thermo Fisher	1:400

		Scientific	
PerCP-Cy5.5 anti-mouse I-A/I-E	M5/114.15.2	BioLegend	1:400
PE-Cy7 anti-mouse Ly-6G	1A8	BioLegend	1:400
APC anti-mouse Ly-6C	AL-21	BD Biosciences	1:400
APC anti-mouse CD24	M1/69	BioLegend	1:400
AF647 anti-mouse CD8a	53-6.7	BioLegend	1:400

2-5 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。解析には BioLegend 社の提供するソフトウェア (Version 2024-06-15) を用いて解析した。

2-6 口腔内細菌の DNA 抽出と 16S rRNA シークエンス

口腔内細菌は先行研究を参照して採取した²⁸。C57BL/6J マウスに三種混合麻酔薬を腹腔内投与し麻酔、もしくはイソフルラン (Pfizer、New York、USA) で安楽死させた後、安全キャビネット内で滅菌済み綿棒 (オオサキメディカル、愛知、日本) を用いて 30 秒程度口腔内を擦り、150 μ L の TE buffer (ナカライテスク) が入った 1.5 mL チューブに入れ液体窒素によって迅速に凍結した。DNA 抽出まで -80°C で保存した。

口腔内細菌ゲノム DNA は先行研究を参考に抽出した²⁸。サンプルを融解した後、10 mg/mL 卵白リゾチームを終濃度 0.1 mg/mL となるように添加しサーモシェイカー (ThermoMixer C) で 37°C、600 rpm で 60 分振盪した。次に Proteinase K (ナカライテスク) を 20 μ L、Inbitex Buffer (Qiagen、Hilden、ドイツ) を 250 μ L 添加し、56°C、600 rpm で一晩振盪した。

綿棒に付着した溶液を回収するため、綿棒を DNA IQ spin baskets (Promega、Madison、USA) にセットし、14,000 rpm、1 分で遠心した。その後、フェノール・クロロホルム抽出法、イソプロパノール沈殿法によって DNA を回収、AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter、Brea、USA) を用いて精製した。16S rRNA ゲノムライブラリーは Illumina (San Diego, CA, USA) プロトコルに従い、若干の改変を加えて作成した。簡単には抽出した DNA サンプルを鋳型として、KAPA HiFi HotStart Ready Mix (KAPA Biosystems、Woburn、USA) と 16S rRNA V3-V4 領域に特異的なプライマー (Forward: 5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3', Reverse: 5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-3') を用いて PCR を行った。PCR 条件は、95°C で 3 分間の初期変性、95°C で 30 秒

間、55°Cで30秒間、72°Cで30秒間を35サイクル、72°Cで5分間の最終伸長で行った。増幅物を AMPure XP ビーズで精製し、Nextera XT Index Kit (Illumina) を用いたインデックス PCR でデュアルインデックスを付けた。ライブラリーは AMPure XP ビーズで精製し、Tris-HCl バッファーで 10 nM に希釈した。ライブラリーをプールし、Miseq (Illumina) で最終濃度 10 pM、300 bp エンドリードでシーケンスした。

FASTQ ファイルは QIIME2 (QIIME2-amplicon version 2024.5)を用いて解析した。配列データから bowtie2 を用いて宿主由来 DNA を除去したのち、配列データを qza 形式に変換、QIIME2 の paired-end-demux を用いてデマルチプレックスした。配列のトリミングとノイズ除去には QIIME2 の dada2 プラグインを用いた。QIIME2 の feature classifier plugin では、SILVA データベース (version 138) で学習させたナイーブベイズ分類器を用いて分類を行った。QIIME2 core-metrics-phylogenetic analysis で多様性解析を行った。各分類群の相対存在量は taxa collapse QIIME2 プラグインを用いて計算した。

2-7 qPCR による口腔内細菌数の定量

口腔内細菌ゲノム DNA は上述の通り抽出した。定量リアルタイム PCR (quantitative PCR; qPCR) を行い、細菌数を推定した。ゲノム DNA 2 µL を、5 µL の SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)、2.5 µL の滅菌水、0.5 µL のフォワード、リバースプライマーミクスチャー (Forward: 5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3', Reverse: 5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-3') の混合物に加えた。qPCR は、CFX Connect リアルタイム PCR 分析システム (Bio-Rad) を用いて、98°C 3 分間、98°C 15 秒及び 60°C 30 秒を 40 サイクル行った。検量線の作成には、*E.coli* DH5 α 株を LB 培地で培養、DNA 抽出を行うと共に CFU assay により細菌数を測定。測定された細菌数を基に DNA 抽出液を希釈し、 $10^1 \sim 10^8$ 個までの検量線を作成した。

2-8 RNA 抽出、cDNA 合成、qPCR

肺組織からの RNA 抽出は TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) の製品プロトコルに従い行った。cDNA 合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡)を用いて行った。その後、SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix により、CFX Connect リアルタイム PCR 分析システムを用いて qPCR を実施した。使用したプライマーは以下に示した。

遺伝子名	プライマー配列 5'-3'
Mouse Il-17	Forward: TGC TAC TGT TGA TGT TGG GAC

	Reverse: AAT GCC CTG GTT TTG GTT GAA
Mouse Il-22	Forward: CAG CTC AGC TCC TGT CAC ATC
	Reverse: AGT TCC CCA ATC GCC TTG AT
Mouse Il-6	Forward: GTT CTC TGG GAA ATG GTG GA
	Reverse: GCA TGG GAA ATT GGG GTA GG
Mouse Tnf-a	Forward: AGT TCT ATG GCC CAG ACC CT
	Reverse: CTC CTC CAC TTG GTG GTT TG
Mouse Il-1b	Forward: CGA CAA AAT ACC TGT GGC CT
	Reverse: TTC TTT GGG TAT TGC TTG GG
Mouse Tgf-b	Forward: GCC TGA GTG GCT GTC TTT TG
	Reverse: GTG AGC GCT GAA TCG AAA GC
Mouse Ccl-2	Forward: AGG TCC CTG TCA TGC TTC TG
	Reverse: GGA TCA TCT TGC TGG TGA AT

2-9 HE 染色、トリクローム染色

肺組織は D-PBS(-)で脱血したのち、10 mL シリンジを用いて陰圧をかけながらマイルドホルム 10N（富士フィルム和光純薬）を浸透させ、固定した。その後、最低 8 時間マイルドホルム中で固定したのち、70%エタノールで置換した。ティッシュプロセッサ（TP1020; ライカ）とパラフィン包埋装置（Arcadia; ライカ）を用いてパラフィンに包埋した。切片はキシレンで脱パラフィン後、100%から 70%エタノールに段階的に移して親水化させた。ヘマトキシリン・エオジン染色は、切片を Mayer's Hematoxylin Solution（富士フィルム和光純薬）に浸漬後、水で洗浄した。続いて、Eosin Y（富士フィルム和光純薬）-Phloxine B（富士フィルム和光純薬）溶液に浸漬した。トリクローム染色は Trichrome Stain Kit（abcam、Cambridge、イギリス）を用い、製品プロトコルに従い染色した。作成した標本は System Microscope BX53（Olympus、東京、日本）を用いて観察、撮影した。

2-10 統計処理

サンプルサイズの決定に統計的手法は用いなかった。2 群間の統計的優位性は GraphPad Prism ソフトウェアバージョン 10（GraphPad 社）を用いて Student の t 検定または Welch の t 検定により算出した。多群間の統計的有意差は、分散検定（ANOVA）を用いて算出し、その後 Dunnet または Tukey の多重比較検定を行った。 β 多様性の統

計的有意差は QIIME を用いて PERMANOVA 検定を用いて算出した。

第3章 結果

3-1 絹糸誘導性歯周病モデルにおける骨吸収は長期間維持された

歯周病モデルは両側の上顎第二臼歯に絹糸を結紮することで誘導した（図 1A）。誘導後 1 週間後にマウスを安楽死させ上顎骨を採取した（図 1B）。歯肉を除去した後、セメントエナメル境（Cement enamel junction; CEJ）から歯槽骨骨頂（Alveolar bone crest; ABC）間の距離（CEJ-ABC 距離）を測定し上顎歯槽骨吸収を評価した（図 1C-E）。測定部位には 1~9 の番号を振った（図 1C）。絹糸を結紮していない麻酔のみのコントロールと比較して、歯周病誘導マウスでは CEJ-ABC 距離が有意に増加しており、骨吸収が起きていた（図 1D, E）。特に絹糸を結紮した第二臼歯の周辺の歯槽骨（No. 1~5）の吸収が顕著であった。頬側（Buccal surface）と舌側（Palatal surface）を比較すると、頬側で第二臼歯および両隣の臼歯の歯槽骨に及ぶ広い範囲（1~5）の骨吸収が認められ、舌側では第二臼歯での歯槽骨吸収（2-4）が顕著に進行していた。

誘導期間を 5 週間まで延長し 1 週間ごとに CEJ-ABC 距離を測定した（図 1B）。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（図 1D, E）。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。

3-2 絹糸誘導性歯周病モデルにおける口腔内細菌叢の破綻は長期間維持された

歯周病は口腔内細菌叢の破綻を原因とする疾患である。絹糸誘導性歯周病モデルにおいても口腔内細菌叢の破綻が観察されるかを検証した。歯周病誘導から 5 週間後まで 1 週間ごとに口腔内を綿棒で拭い口腔内細菌を回収した。コントロール群は麻酔のみ行い絹糸結紮を行わず、1 週間後に口腔内細菌を回収した（図 2A）。DNA 抽出後、細菌量の測定と 16S rRNA シークエンスによる細菌叢解析を行った。

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（図 2B）。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（図 2C）。

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（図 2D, E）。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。

コントロール群と比較して、有意に変化する細菌を同定するために群間比較 (LEfSe) 解析を行った結果、1 週目で *Enterococcus* 属、*Proteus* 属、*Escherichia_Shigella* 属が歯周病誘導群で増加し、*Lactococcus* 属、*Lactobacillus* 属がコントロール群で高い結果となった (図 2F)。この *Enterococcus* 属、*Proteus* 属、*Escherichia_Shigella* 属の傾向と *Lactobacillus* 属の傾向は 5 週目まで維持されていた (図 2F)。*Atopostipes* 属と *Sporosarina* 属の変動が検出されたが、これらの細菌が生体で検出された例は少なく、割合も少ないためコンタミネーションの可能性はある。

3-3 歯周病モデルは全身で自然免疫応答を誘導した

次に歯周病モデルマウスにおける全身免疫応答への影響を探索した。歯周病誘導から 5 週間後まで 1 週間ごとに解剖しフローサイトメーターによって解析した。コントロール群は麻酔のみ行い、1 週間後に解剖を行った (図 3A)。歯肉・歯根膜とその近傍に位置する鼻咽頭関連リンパ組織 (Nasal associated lymphoid tissue; NALT)、頸部リンパ組織を採取し解析した。さらに、全身免疫応答の変化を検証するため気管に接する縦隔リンパ節、腸管膜リンパ節、脾臓を採取し、計 6 組織を解析対象とした (図 3B)。各組織の全リンパ球数 (CD45⁺細胞) を解析したところ、歯肉・歯根膜は絹糸結紮後 1 週間後に増加した後に 4 週間後に定常状態まで戻った。頸部リンパ節では 1 週後で大きく増加した後、減少したもののコントロール群より細胞数が増加したまま推移した。脾臓の変動は 5 週間後に有意に増加していたが、増加は少なかった。腸管膜リンパ節では誘導 2 週間後に細胞数増加を示し、その後減少したが定常状態より増加傾向であった。NALT と縦隔リンパ節では大きな変化は見られなかった (図 3C)。

次に自然免疫応答に関わる細胞群を解析した (図 3D)。歯肉・歯根膜では歯周病誘導 1 週間後にコントロール群と比較して好酸球、好中球、樹状細胞の細胞数が増加した。誘導 3 週間後までこの細胞数の増加は維持され、4 週間後には定常状態と同程度になった (図 3E)。NALT ではこれらの細胞は 2 週間後に有意に増加したがすぐに減少した (図 3F)。頸部リンパ節では好中球、樹状細胞に加えマクロファージと単球が誘導 1 週間後に著しく増加した。その後わずかに減少するものの細胞数の増加は 5 週間後まで維持され、免疫応答が持続していることが示唆された (図 3G)。

縦隔リンパ節では好酸球が 1 週間後に増加し 3 週間後には定常状態まで減少した (図 3H)。脾臓では好酸球、好中球、樹状細胞、マクロファージ、単球が誘導 2~3 週間後に有意に増加した。その後も増加したまま、もしくは増加傾向で 5 週間後まで推移した (図 3I)。腸管膜リンパ節では誘導 2 週間で全リンパ球数 (図 3C) が多く検出された。これを加味しても、好酸球と好中球は誘導 1 週間で有意に増加、樹状細胞、マクロファ

ージ、単球は誘導 3 週間で増加していた。その後変動はあるものの誘導 5 週間後でも有意に増加、増加傾向にあった (図 3J)。

これらの結果から、歯肉・歯根膜、NALT では自然免疫細胞の変動は 4 週間には終息していることが示唆された。これに対し、頸部リンパ節では 1 週間後に惹起された免疫応答は 5 週間後まで持続していた。加えて、脾臓、腸管膜リンパ節で自然免疫細胞の増加が観察され、2~3 週間後から全身に自然免疫応答が推移していることが示唆された。

3-4 歯周病モデルは全身で適応免疫応答を誘導した

次に適応免疫について検証した (図 4A,B)。歯肉・歯根膜、NALT、縦隔リンパ節では T 細胞、B 細胞の変化は見られなかった (図 4C-F,I-J)。頸部リンパ節では CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞が歯周病誘導 1 週間で有意に増加し、5 週間後まで維持された (図 4G)。T 細胞サブセットについて解析すると Tem 細胞、Tcm 細胞、ナイーブ T 細胞全てが 1 週間後に増加していた。Tem 細胞、Tcm 細胞の増加は 3~4 週間後に終息したのに対し、ナイーブ T 細胞は 5 週間後まで増加したままであった (図 4G)。

頸部リンパ節の B 細胞は 1 週間後に有意に増加し 5 週間後まで増加傾向で維持されていた。加えて、胚中心 B (Germinal center B; GC-B) 細胞が 2 週間後に増加し、胚中心反応が起きていることが示された。GC-B 細胞は 4 週間後に一時的に減少したが 5 週間後には再び増加していた (図 4H)。この結果から、頸部リンパ節において適応免疫も誘導されており、5 週間後までその反応は持続していることが分かった。

脾臓では CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞全体の細胞数は変化しなかったものの、Tem 細胞が 3 週間後と 5 週間後に有意に増加していた (図 4K)。B 細胞も 5 週間後に有意に増加していたが、GC B 細胞は増加せず、胚中心反応は誘導されていないと考えられた (図 4L)。

腸管膜リンパ節は 5 週間後では CD4⁺T 細胞全体は増加傾向、CD8⁺T 細胞全体は有意に増加していた。サブセット解析では Tem 細胞、Tcm 細胞、ナイーブ T 細胞は有意に増加または増加傾向にあった (図 4M)。B 細胞も 5 週間後に増加傾向にあり、GC-B 細胞は 3 週間後に一時的に増加していたが 4 週間後には GC-B 細胞は減少した (図 4N)。

さらに、血清中の Th1/2/17 関連サイトカインをマルチプレックスアッセイによって網羅的に測定した。その結果、IL-17A、IL-22、IL-6 が歯周病誘導後に増加していた (図 5A)。全身のリンパ組織で CD4⁺Tem 細胞が増加しており、血清中で Th17 関連サイトカインが検出されたことから歯周病誘導モデルマウスでは全身で Th17 応答が誘導されていることが示唆された。

3-5 口腔内細菌依存的に免疫応答が誘導されていた

次にこれまで観察された免疫応答が口腔内細菌に依存しているか検証を行った。麻酔のみ行ったコントロールマウス、歯周病誘導を行ったマウスに水もしくは抗生物質カクテルを自由飲水させ、1週間後に口腔内細菌の採取、解剖を行った（図 6A）。口腔内細菌数を qPCR によって測定したところ、抗生物質投与群で細菌数が減少していた（図 6B）。加えて抗生物質投与によって歯周病誘導による骨吸収が抑制されていた。これらの結果から、歯周病誘導による口腔内細菌叢の破綻が抗生物質処理によって抑制されていることが確認できた。

そして、歯周病誘導によって強く免疫応答が誘導された頸部リンパ節の免疫細胞をフローサイトメーターによって解析した。その結果、歯周病誘導によるリンパ球数の増加が抗生物質処理によって抑制されていた（図 6D）。詳細に解析を行うと、好中球、樹状細胞、マクロファージの増加が抗生物質処理により抑制されていた（図 6E）。加えて、好中球、樹状細胞、B 細胞、GC-B 細胞、CD4/8⁺T 細胞の全てのサブセットの増加も抗生物質処理により抑制された（図 6E）。したがって、免疫細胞の変動は口腔内細菌叢に依存していることが示された。

3-6 歯周病モデルは肺における免疫応答を誘導した

歯周病と呼吸器疾患との関連はこれまでにいくつか報告されている。高齢者へ口腔ケアを行うとインフルエンザウイルスの発症率が低下する²²、歯周病患者では COVID-19 の重症率が高いとの報告がある²³。よって絹糸誘導性歯周病モデルにおける呼吸器への影響を検証することとした。歯周病誘導から 5 週間後に気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar Lavage Fluid; BALF) と肺組織を回収し、フローサイトメーターによって解析した。コントロール群には麻酔のみ行った（図 7A, B）。肺間質中と毛細血管中の細胞を識別するため、CD45 抗体を尾静脈投与し、直ちに安楽死させ解剖を行った。これにより CD45 抗体陽性の細胞は毛細血管中の細胞であり、肺組織中の細胞は CD45 陰性となる（図 7C）。

解析の結果、歯周病誘導 5 週後での BALF のリンパ球数は変化していなかった（図 7D）。自然免疫、適応免疫細胞についても変化していなかった（図 7E, F）。一方、歯周病誘導群の肺の毛細血管中でリンパ球数が増加していた（図 7D）。自然免疫細胞について解析したところ肺間質中でも細胞構成が変化しており、好中球が増加傾向、好酸球が有意に増加していた（図 7G）。また、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有意に増加、CD11b⁺樹状細胞が減少傾向、CD103⁺樹状細胞が有意に減少していた（図 7G）。適応免疫細胞は肺間質中では顕著な

変化は見られなかった (図 7H)。

肺の毛細血管中では B 細胞が増加傾向にあった (図 7I)。また、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞が有意に増加していた (図 7J)。サブセットの解析を行ったところ、CD4⁺T 細胞中では Tem 細胞、Tcm 細胞が増加傾向にあり、ナイーブ T 細胞が有意に増加していた。CD8⁺T 細胞中ではナイーブ T 細胞が増加していた (図 7J)。これらの結果から歯周病誘導によって肺組織に免疫応答が誘導されていることが分かった。

3-7 歯周病モデルはブレオマイシン誘導性肺線維化を増悪させる傾向にあった

歯周病モデルマウス肺で免疫応答が誘導されており、疫学研究から歯周病と呼吸器疾患との関連が示唆されていることから、呼吸器疾患との関連を実験的に検証することとした。まず、歯周病との関連が示唆されているインフルエンザウイルス感染について検証した。全身で免疫応答が起きる直前の歯周病誘導 3 週間目のマウスに亜致死性感染量である 50 PFU (Plaque forming unit) の A 型インフルエンザウイルスを経気管感染させた。その後、2 週間体重変化と生存率を測定した (図 8A)。実体重と体重変化率共に 2 群間で変化はみられなかった (図 8B)。生存率は歯周病群がコントロール群に比べて死亡するタイミングが遅れるように見えたが、最終的な生存率は変化がなかった (図 8C)。したがって、本研究において歯周病はインフルエンザウイルス感染後の重症度に影響がないことが示唆された。

歯周病誘導モデルにおいて全身で Th17 関連サイトカインが上昇していたことから IL-17、IL-22 が重症度に関わるブレオマイシン誘導性肺線維化モデル²⁹と歯周病の関連を検証することとした。歯周病誘導 5 週間後にブレオマイシンを気管投与し、体重が顕著に低下する 9 日後に解剖を行なった (図 9A, B)。2 群間で体重変化について目立った変化は見られなかった (図 9B)。まず肺の右葉もしくは左葉を回収し定量的 qPCR 法によってサイトカイン、ケモカインの mRNA 量を測定した。その結果、IL-17 が有意に増加していた。また、IL-22、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 は有意ではないものの増加傾向にあった (図 9C)。

肺組織のヘマトキシリン・エオジン染色ではブレオマイシン処理によって、顕著なリンパ球浸潤が確認できた (図 9D)。また、トリクローム染色による膠原線維の染色では、ブレオマイシン処理をしていないコントロール群と比較して、血管周辺、終末細気管支の基底膜で青色を呈する膠原線維の増加は顕著ではなかった (図 9E)。一方で、リンパ球浸潤の内部には薄い青色の繊維が認められた (図 9E 矢頭)。ブレオマイシン処理、未処理ともにコントロール群と絹糸結紮 5 週で明確な変化は認められなかった。

フローサイトメーターを用いて免疫細胞を解析したところ、肺組織中における

CD4/8⁺T 細胞は増加傾向にあり、T 細胞サブセット中では Tem 細胞、Tcm 細胞、ナイーブ T 細胞が増加傾向にあった (図 9F)。Ly6C^{+/+}マクロファージ/単球は有意に減少していた (図 9G)。一方で、BALF 中の肺胞マクロファージは減少傾向であり、T 細胞もすべて減少していた (図 9H-I)。

第4章 考察

本研究では絹糸誘導性歯周病モデルマウスの全身免疫の包括的かつ経時的な免疫応答の変化の解析を行った。臼歯への絹糸結紮は1週間で口腔内細菌叢の変化を誘導し、これは5週間維持されていた。抗生剤処理により、免疫細胞の増加が抑制されることから、この細菌叢変化は局所と全身の免疫応答に影響を与えていると考えられる。

絹糸結紮後には *Enterococcus* 属、*Proteus* 属、*Escherichia*、*Shigella* 属が増加し、5週を通じて持続していた。これらの細菌は腸内に常在する菌である。食糞により口腔に入り、結紮した絹糸に定着することで、炎症性サイトカイン産生を誘導し、破骨細胞の誘導を介した骨吸収を誘導すると考えられる。いずれも歯周病ポケットで検出されることが報告されており、バイオフィルムを形成し歯周病と関連するとされているが、直接の原因となるという報告はない。一方で *Lactococcus* 属は絹糸結紮後に減少していた。*Lactococcus* 属は抗菌ペプチドの産生と乳酸産生による周辺環境の酸性化によってバイオフィルム形成を抑制する。絹糸結紮による歯槽骨の吸収はこのような口腔内細菌叢のバランス異常によるものと考えられる。

歯肉組織における自然免疫細胞の増加は歯槽骨吸収と同様に絹糸結紮後3週間でピークとなった。T細胞、B細胞の変化は認められなかった。口蓋を挟んで鼻腔側に位置するNALTでは歯肉組織に1週間遅れて自然免疫細胞の増殖を示した。これは歯肉からの細胞遊走、もしくは、鼻腔の細菌負荷の増加による免疫応答誘導の可能性がある。両組織とも、その後は自然免疫細胞の数は定常状態と同程度まで戻った。歯肉組織、NALTにおけるT細胞、B細胞の変化は見られなかった。口腔内細菌叢の変化は5週まで維持されていたことから、本研究で口腔内に定着した細菌による口腔内の炎症は3週間以後には終息されると考えられる。

頸部リンパ節では誘導1週間後に自然免疫、T細胞が著しく増加していた。その後細胞数はわずかに減少するものの、誘導5週間後まで細胞増加は維持されており、この部位での免疫応答は持続していると考えられた。T細胞は誘導1~3週間まではTem細胞、Tcm細胞が増加していたが、その後は減少していた。自然免疫系の細胞の増加が3週以後も維持されていることから、TemとTcm細胞の頸部リンパ節における3週以後の低下は、全身へとT細胞が遊走したためではないかと考えられる。実際に脾臓ではT細胞が3週以降に増える傾向にあった。

胚中心B細胞は頸部リンパ節で顕著な増加が認められた。脾臓、縦隔リンパ節、NALTではこのような胚中心応答の活性化は起きないことから、頸部リンパ節が口腔内抗原に対する抗体産生の中心的な場であると考えられる。腸間膜リンパ節では2週でT細胞

が増加しており、2,3 週に胚中心 B 細胞の増加が認められた。頸部から腸管へのリンパ球遊走が原因の一つと考えられる。また、絹糸結紮で誘導が確認された *Proteus* 属は腸管へと移行し定着することが報告されている²⁵。このような口腔から腸管への細菌の移行も腸管膜リンパ節における胚中心応答をおこしている可能性がある。

IL-17A, IL-22 の増加が絹糸結紮 4~5 週の血中で認められた。そこで、この 2 つのサイトカインの上昇が肺にどのような影響を及ぼすかを検証した。まず、絹糸結紮後 5 週の肺では肺間質と血中での好酸球の増加が認められた。好酸球の増加はアレルギー肺炎と関係するが、肺の組織染色では明らかな病変は認められなかった。他に、樹状細胞、マクロファージ、単球の抗原提示細胞が肺間質と血中で減少し、毛細血管中での B 細胞、T 細胞の増加が認められた。これらの結果から、軽微ではあるが肺へと影響していると考えられた。

そして、絹糸結紮後 5 週のマウスへとブレオマイシン投与することで炎症と肺線維化を誘導したところ、肺実質における IL-17, IL-22, IL-1 β の mRNA 発現量が対照群と比べて増加したことを見出した。肺組織中では T 細胞が増加しており、リンパ球浸潤も確認された。IL-22 は IL-17 存在下で肺線維化モデルの炎症促進に働くことが報告されている²⁹。今回解析したブレオマイシン投与後 9 日では、顕著なリンパ球浸潤は認められるものの線維化は進行しておらず炎症期であったと考えられた。絹糸結紮による歯周病誘導により IL-17 と IL-22 が増加した状態では肺線維化形成における初期炎症が亢進する可能性が考えられる。IL-17 と IL-22 の産生増加は歯周病患者の歯周ポケット、歯肉組織、血中組織でも確認されているため、同様な機構で歯周病でも存在しているのかもしれない。

本研究での絹糸結紮によるマウス歯周病モデルでは、歯槽骨吸収、口腔内細菌叢の異常が認められ、口腔内だけではなく全身の免疫活性化を観察された。これらはヒトの歯周病の症状を再現していると考えられる。一方で、歯槽骨吸収、口腔内の免疫活性化は 3 週間程度で終息し、歯の脱落もなく全身への影響も軽微であった。口腔内細菌の解析では、代表的な歯周病の原因菌が属する *Porphyromonas* 属、*Prevotella* 属、*Treponema* 属、*Tannerella* 属が検出されず、病原性の高い細菌が定着しないため炎症が持続しないことが、その一因と考えられる。一方で本研究の結果は歯周病の原因菌と言われていない *Enterococcus* 属、*Proteus* 属、*Escherichia*_*Shigella* 属の細菌の定着が口腔内炎症を活性させることで、全身へと影響を及ぼす可能性を示した。そして、これらの細菌による免疫応答が長期には抑制される機構の存在が示唆された。これらの知見は今後の歯周病治療や歯周病による全身性疾患リスクの増大機構の理解に有用となると考えられる。

参考文献

1. 厚生労働省. 令和 4 年 歯科疾患実態調査結果の概要. June 29, 2023. Accessed January 5, 2025. https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_33814.html
2. Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol* 2000. 2017;75(1):7-23. doi:10.1111/prd.12221
3. Genco RJ, Sanz M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontol* 2000. 2020;83(1):7-13. doi:10.1111/prd.12344
4. Vos T, Barber RM, Bell B, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015;386(9995):743-800. doi:10.1016/S0140-6736(15)60692-4
5. Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PPC, Lindholm C, Lerner UH. Porphyromonas gingivalis Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem*. 2015;290(33):20147-20158. doi:10.1074/jbc.M115.655787
6. Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, et al. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun*. 2018;9:701. doi:10.1038/s41467-018-03147-6
7. H. Bokhari SA, Khan AA, Butt AK, et al. Non-surgical periodontal therapy reduces coronary heart disease risk markers: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol*. 2012;39(11):1065-1074. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01942.x
8. Genco RJ, Van Dyke TE. Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(9):479-480.

doi:10.1038/nrcardio.2010.120

9. Schenkein HA, Papapanou PN, Genco R, Sanz M. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontol* 2000. 2020;83(1):90-106. doi:10.1111/prd.12304
10. D'Aiuto F, Orlandi M, Gunsolley JC. Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and CVD outcomes. *J Clin Periodontol*. 2013;40(s14):S85-S105. doi:10.1111/jcpe.12061
11. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(7):426-440. doi:10.1038/s41577-020-00488-6
12. Beydoun MA, Beydoun HA, Hossain S, El-Hajj ZW, Weiss J, Zonderman AB. Clinical and bacterial markers of periodontitis and their association with incident all-cause and Alzheimer's disease dementia in a large national survey. *J Alzheimers Dis JAD*. 2020;75(1):157-172. doi:10.3233/JAD-200064
13. Baker JL, Mark Welch JL, Kauffman KM, McLean JS, He X. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health. *Nat Rev Microbiol*. 2024;22(2):89-104. doi:10.1038/s41579-023-00963-6
14. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):382-392. doi:10.1016/j.chom.2014.02.005
15. Schirmer M, Denson L, Vlamakis H, et al. Compositional and temporal changes in the gut microbiome of pediatric ulcerative colitis patients are linked to disease course. *Cell Host Microbe*. 2018;24(4):600-610.e4. doi:10.1016/j.chom.2018.09.009
16. Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, et al. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut*. 2019;68(7):1335-1337. doi:10.1136/gutjnl-2018-316661

17. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, et al. Binding of the Fap2 Protein of *Fusobacterium nucleatum* to Human Inhibitory Receptor TIGIT Protects Tumors from Immune Cell Attack. *Immunity*. 2015;42(2):344-355. doi:10.1016/j.immuni.2015.01.010
18. Rubinstein MR, Baik JE, Lagana SM, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer by inducing Wnt/ β -catenin modulator Annexin A1. *EMBO Rep*. 2019;20(4):e47638. doi:10.15252/embr.201847638
19. de Melo Neto JP, Melo MS a. E, dos Santos-Pereira SA, Martinez EF, Okajima LS, Saba-Chujfi E. Periodontal infections and community-acquired pneumonia: a case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2013;32(1):27-32. doi:10.1007/s10096-012-1710-y
20. Gomes-Filho IS, Soledade-Marques KR, Seixas da Cruz S, et al. Does Periodontal Infection Have an Effect on Severe Asthma in Adults? *J Periodontol*. 2014;85(6):e179-e187. doi:10.1902/jop.2013.130509
21. Soledade-Marques KR, Gomes-Filho IS, da Cruz SS, et al. Association between periodontitis and severe asthma in adults: A case-control study. *Oral Dis*. 2018;24(3):442-448. doi:10.1111/odi.12737
22. Abe S, Ishihara K, Adachi M, Sasaki H, Tanaka K, Okuda K. Professional oral care reduces influenza infection in elderly. *Arch Gerontol Geriatr*. 2006;43(2):157-164. doi:10.1016/j.archger.2005.10.004
23. Marouf N, Cai W, Said KN, et al. Association between periodontitis and severity of COVID - 19 infection: A case-control study. *J Clin Periodontol*. 2021;48(4):483-491. doi:10.1111/jcpe.13435
24. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech*. 2018;81(12):1412-1421. doi:10.1002/jemt.23101
25. Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Jiao Y, et al. The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. *Cell*.

- 2020;182(2):447-462.e14. doi:10.1016/j.cell.2020.05.048
26. Li X, Wang H, Yu X, et al. Maladaptive innate immune training of myelopoiesis links inflammatory comorbidities. *Cell*. 2022;185(10):1709-1727.e18. doi:10.1016/j.cell.2022.03.043
27. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013;394(1):49-54. doi:10.1016/j.jim.2013.05.002
28. Abusleme L, Hong BY, Hoare A, Konkel JE, Diaz PI, Moutsopoulos NM. Oral Microbiome Characterization in Murine Models. *Bio-Protoc*. 2017;7(24):e2655. doi:10.21769/BioProtoc.2655
29. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med*. 2010;207(6):1293-1305. doi:10.1084/jem.20092054

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導してくださった長谷耕二教授、木村俊介准教授、高橋大輔専任講師に深く感謝いたします。加えて、実験や解析にご協力いただいた藤村由美子様、遠藤真弓様、小口宙之様、木梨祐輔様、込山星河様、大谷祐貴様に深く感謝いたします。

日頃からお世話になりました慶應義塾大学薬学部生化学講座の皆様に感謝いたします。最後に、本研究の遂行中、生活面の経済的な支援をいただきました日本免疫学会「きぼう」プロジェクトに感謝申し上げます。

図1

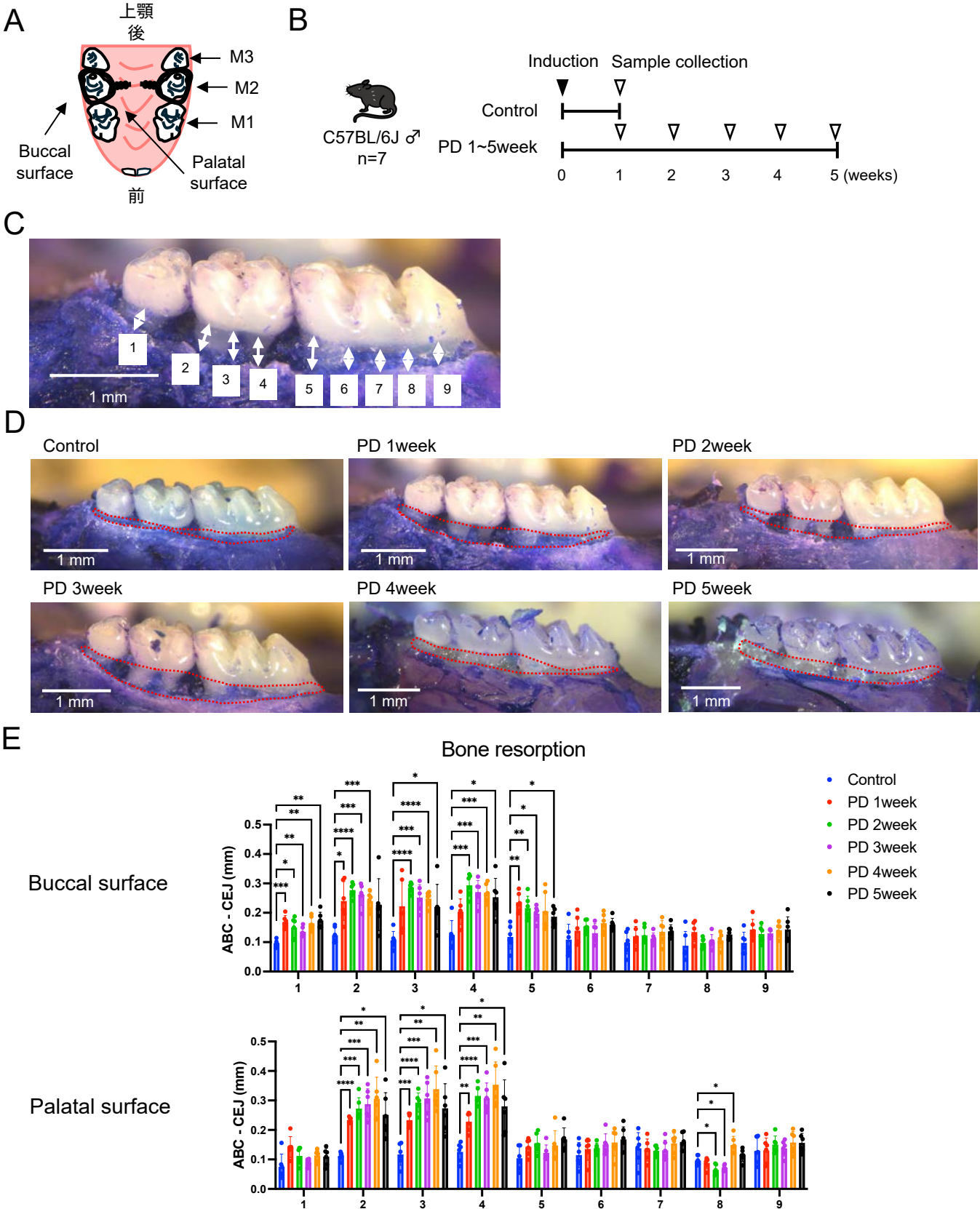
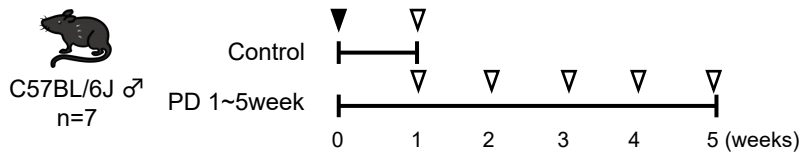


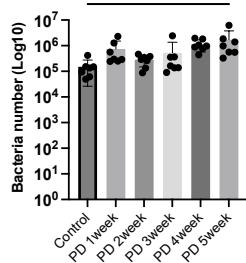
図1 絹糸誘導性歯周病モデルにおける骨吸収は長期間維持された
 (A) マウス上顎の図解。上顎両側の第2臼歯に絹糸を結索した。頬側はBuccal surface、口蓋側はPalatal surface。
 (B) 骨吸収測定スケジュールの概略図。コントロール群は麻酔のみ行い1週間後に解剖した。歯周病群は誘導から5週間後まで1週間ごとに解剖した。
 (C) 歯槽骨吸収測定の測定位置を示した。第3臼歯(M3) から9ヶ所測定し、それぞれNo.1~9までの番号を振った。
 (D) 代表的な頬側からのマウス臼歯・歯槽骨写真。スケールバーは1 mmを示している。
 (E) コントロールおよび各歯周病群の頬側もしくは口蓋側それぞれの測定位置(C)における歯槽骨(ABC)-セメントエナメル境(CEJ) 距離 (n=3、平均±S.D.)。結果は1回の実験を示す。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001、****P < 0.0001。Two-way ANNOVA分析とDunnet検定。

A

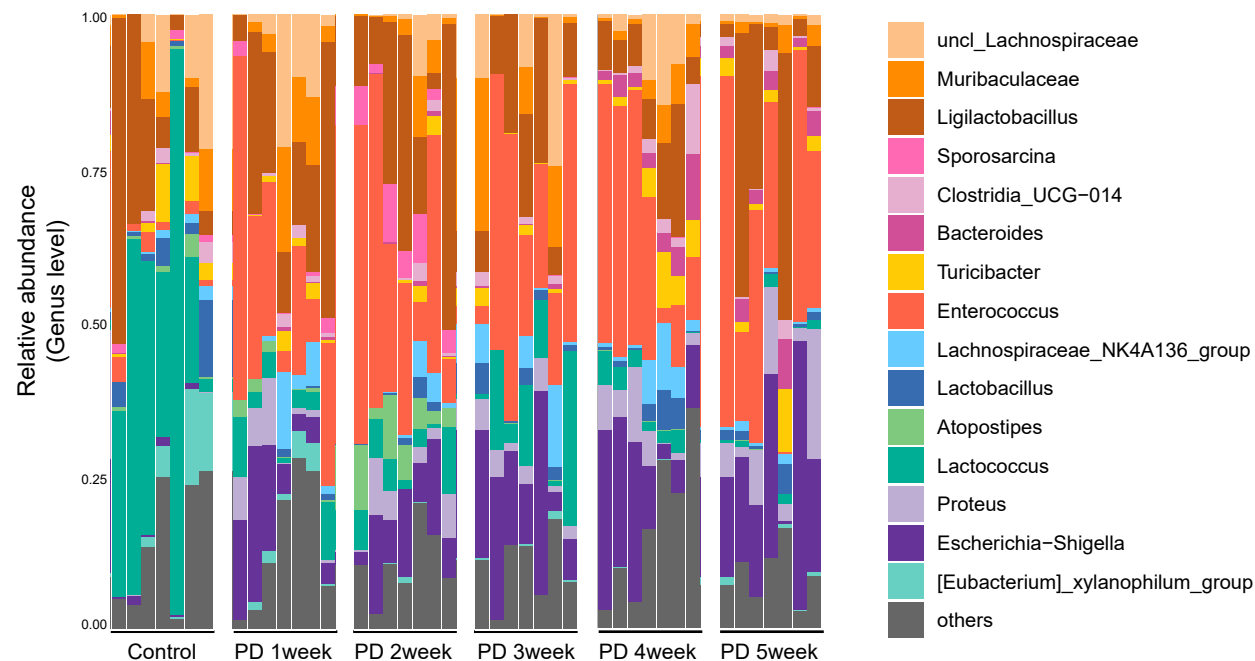


B

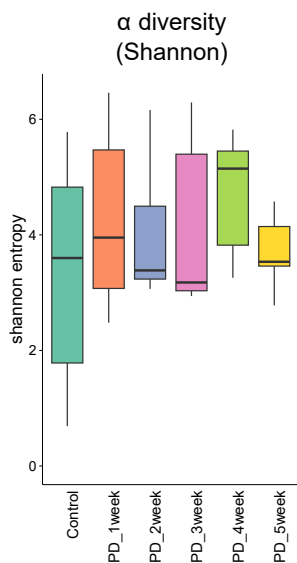
Bacteria number in the oral cavity



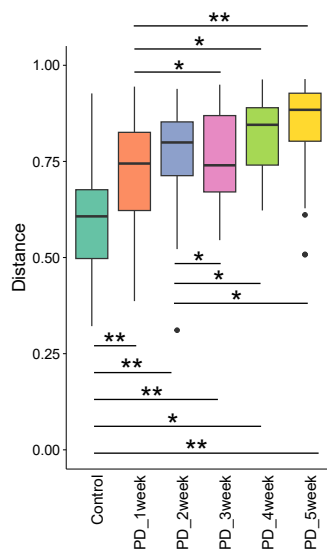
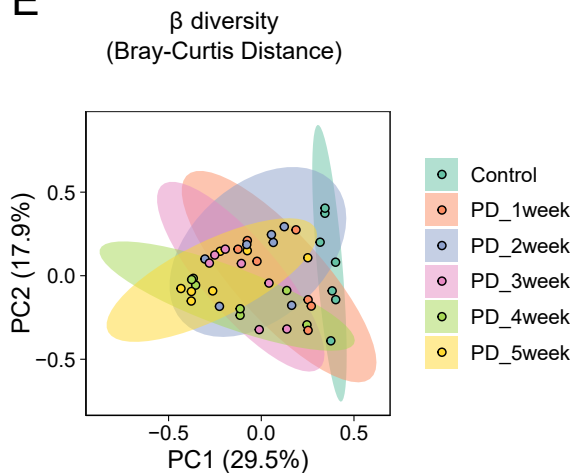
C



D



E



F

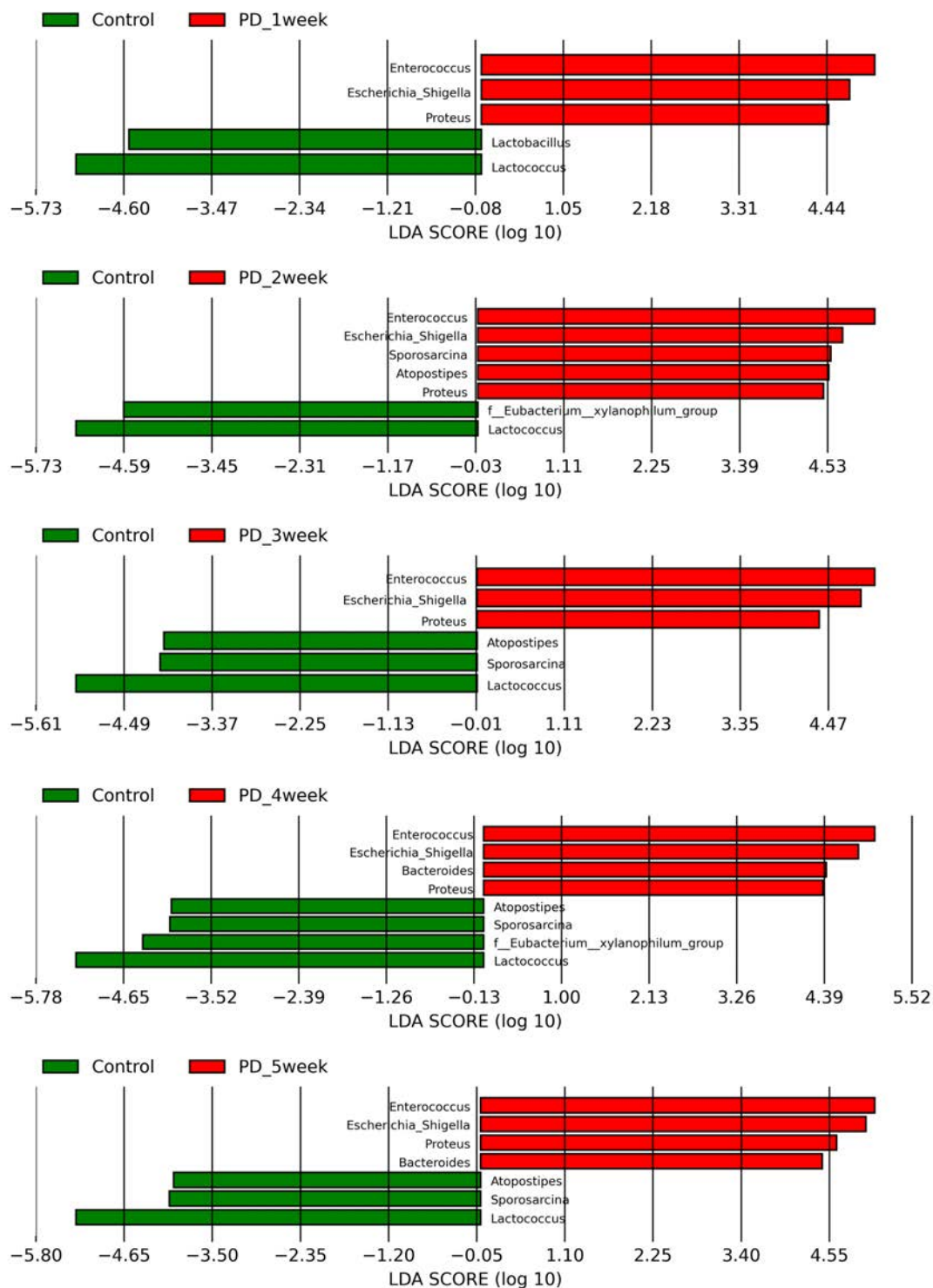
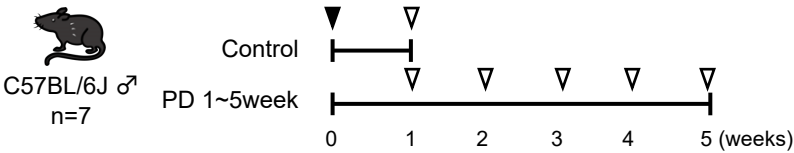


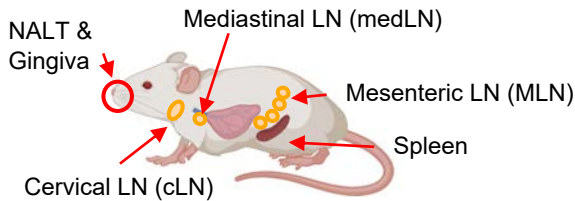
図2 絹糸誘導性歯周病モデルにおける口腔内細菌叢の破綻は長期間維持された

(A) 口腔内細菌叢採取スケジュールの概略図。コントロール群は麻酔のみ行い1週間後に採取した。歯周病群は誘導から5週間後まで1週間ごとに採取した。(B) コントロール群、歯周病各群のqPCRによる口腔内細菌数 (n=7, 平均±S.D.)。(C)–(F) 16S rRNA シーケンス解析による口腔内細菌叢構成の比較 (n=7)。(C) 属レベルの細菌叢組成。(D) Shannon Entropyによるα多様性 (min. to max.)。(E) (左) Bray-Curtis解析に基づく主座標分析プロットと (右) コントロール群に対する距離を示す棒グラフ (min. to max.)。(F) コントロール群と歯周病誘導1~5週間それぞれの群間比較解析 (LEfSe)により属レベルで有意に割合が変化した細菌。データはLDA score > 2.0、P < 0.05の細菌を示す。結果は1回の実験を示す。*P < 0.05、**P < 0.01。PERMANOVA検定とPairwise permanova検定。

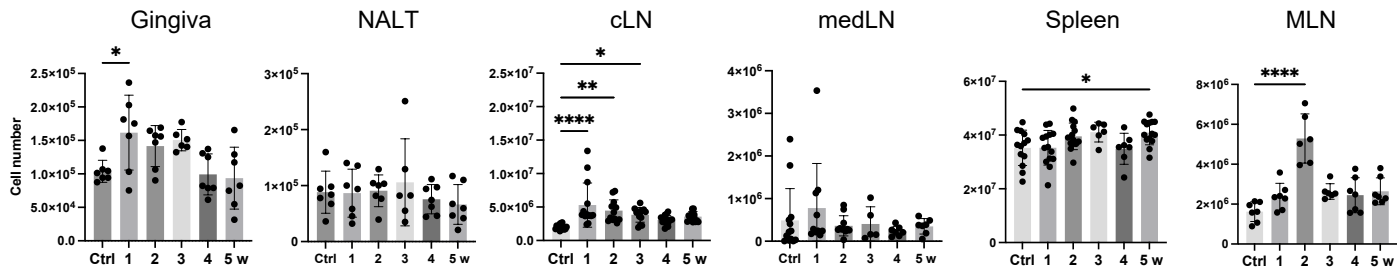
A



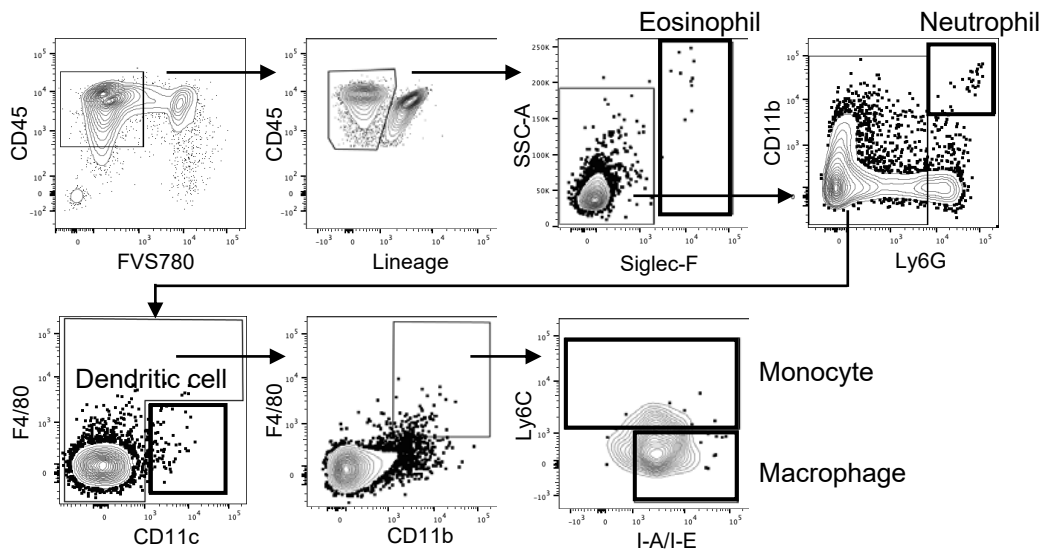
B



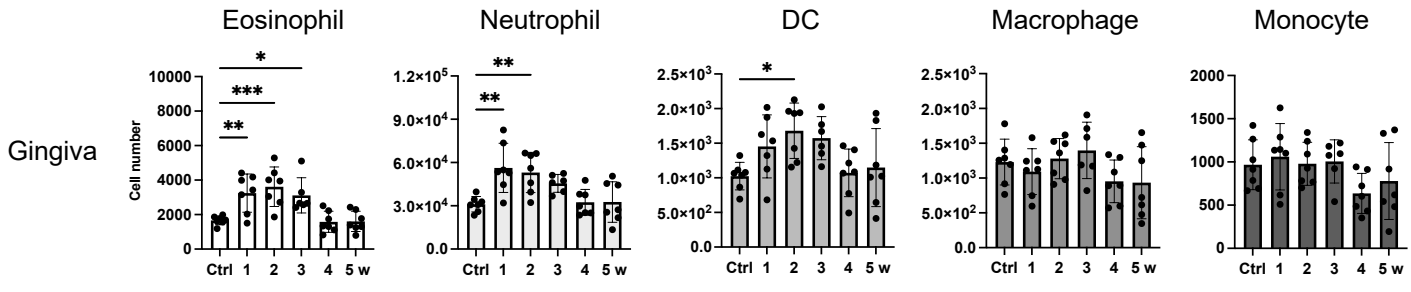
C



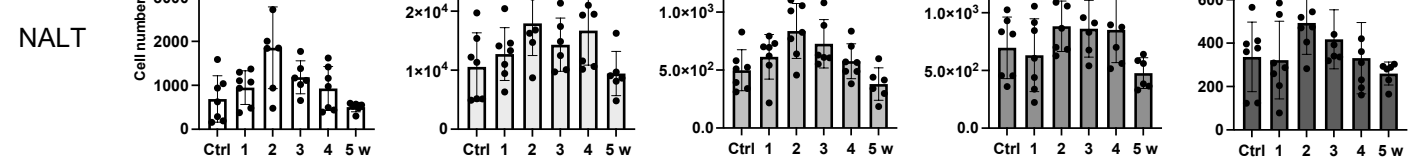
D



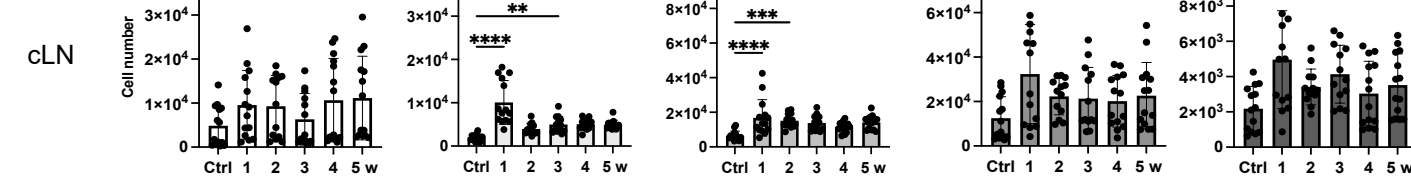
E



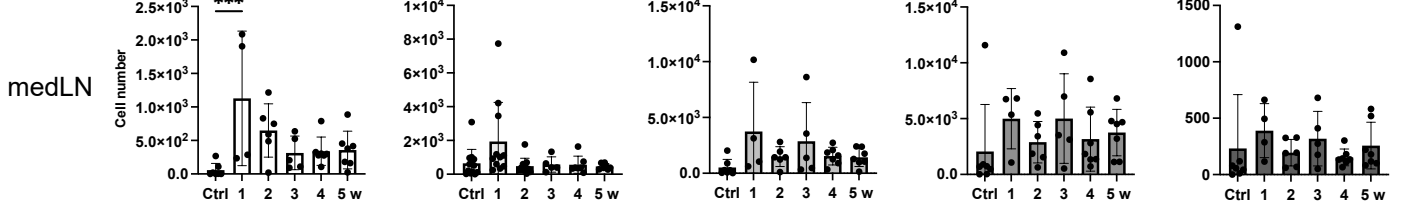
F



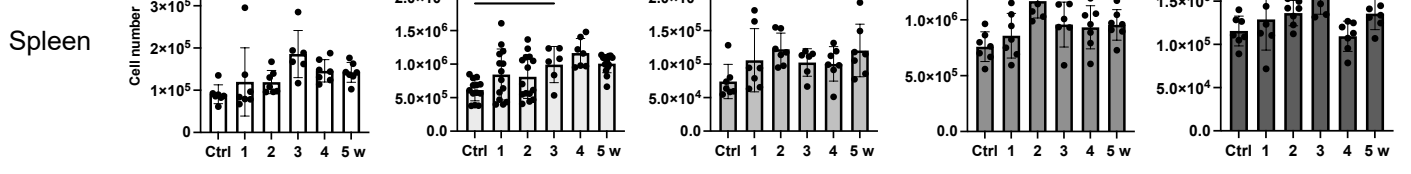
G



H



I



J

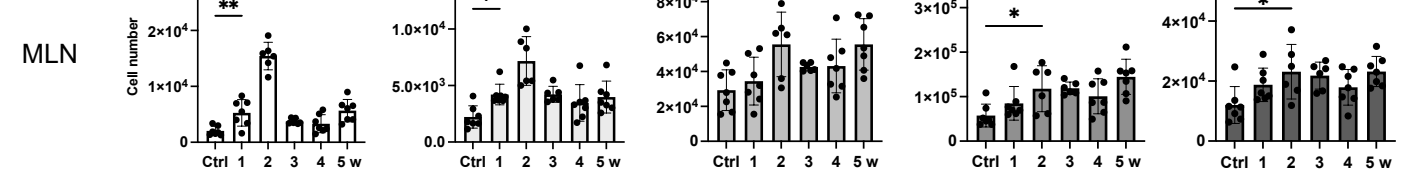
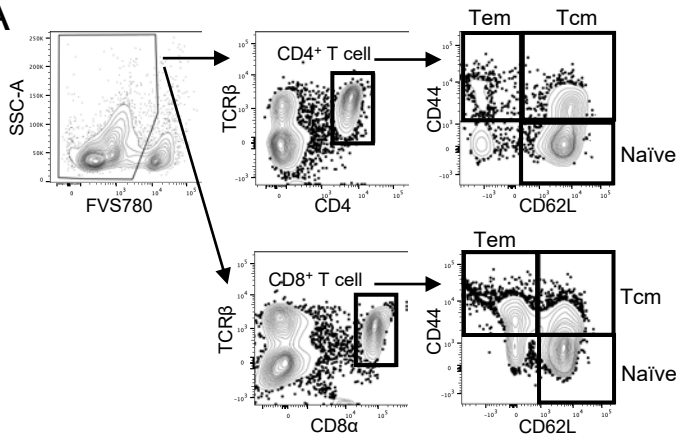
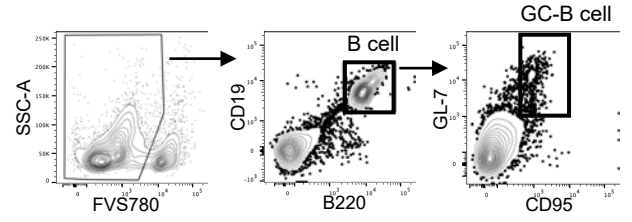
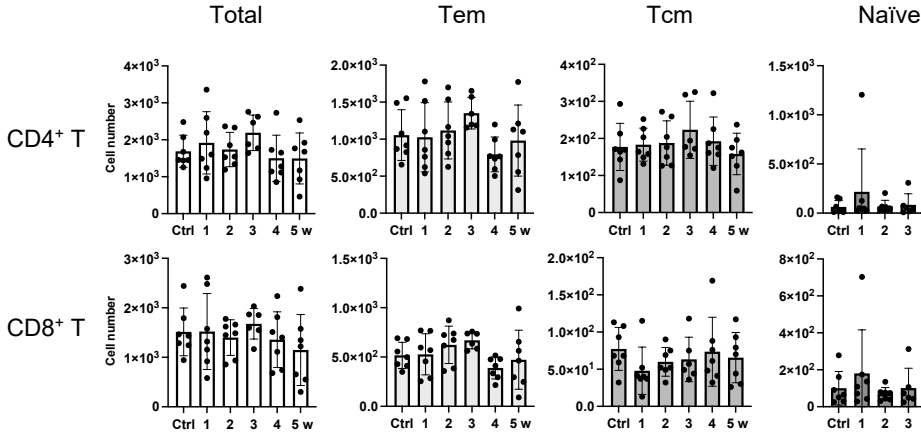
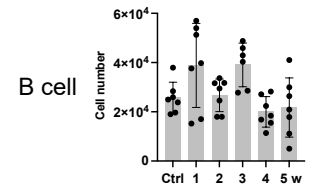
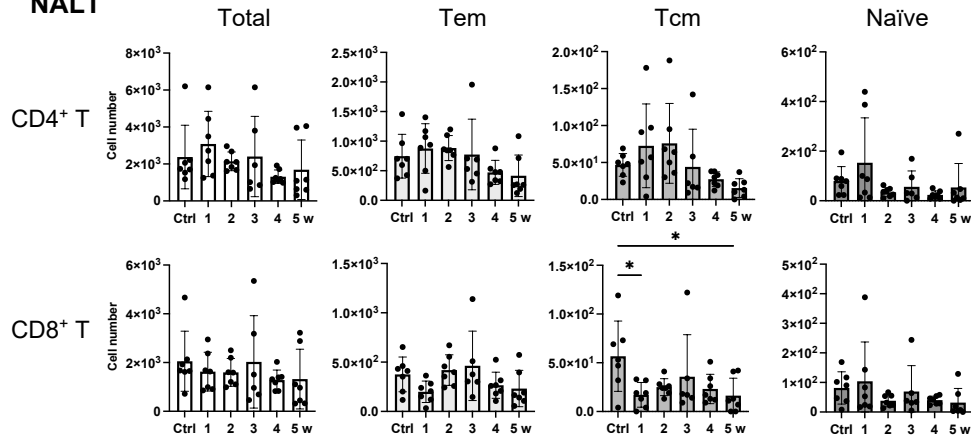
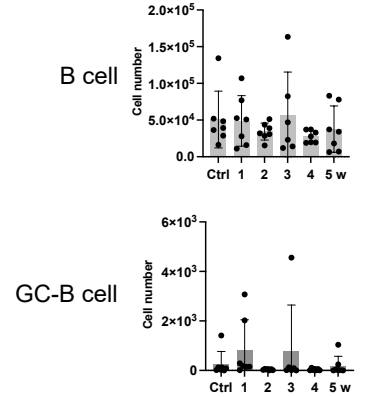
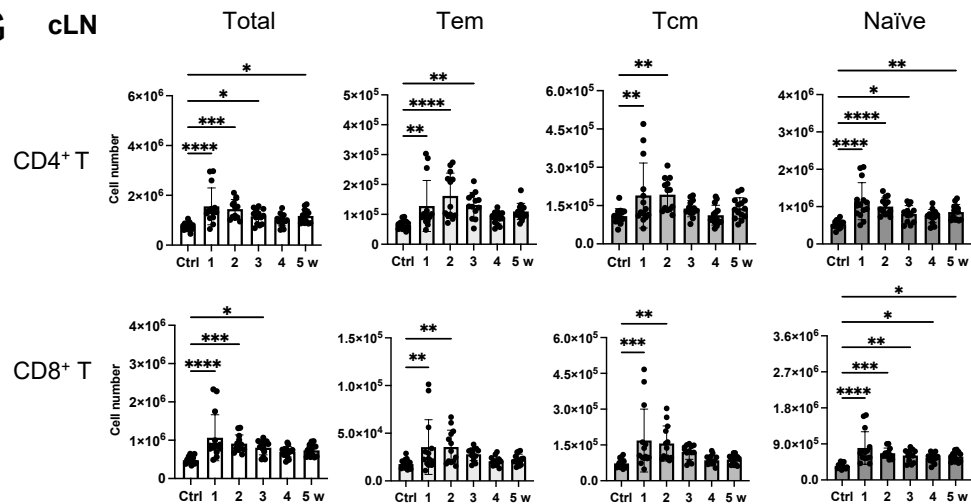
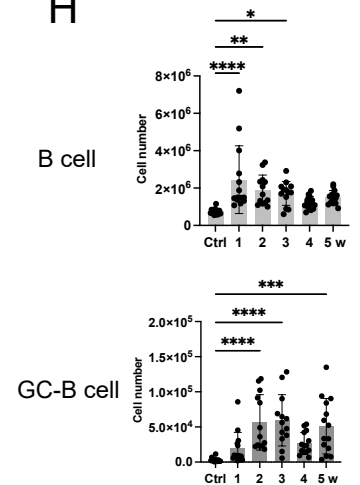


図3 絹糸誘導性歯周病モデルは全身で自然免疫応答を誘導した

(A) 全身の自然免疫応答解析スケジュールの概略図。コントロール群は麻酔のみ行い1週間後に解剖した。歯周病群は誘導から5週間後まで1週間ごとに解剖した。(B) 解析のため採取した部位とリンパ節の図解。歯肉・歯根膜 (Gingiva)、鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT)、頸部リンパ節 (cLN)、縦隔リンパ節 (medLN)、腸管膜リンパ節 (MLN)、脾臓 (Spleen) を採取した (Created with Biorender)。(C) コントロール群および歯周病各群における各組織の全リンパ球 (CD45⁺細胞) 数 (Gingiva: n=6~7、NALT: n=6~7、cLN: n=13~14、medLN: n=5~13、MLN: n=6~7、Spleen: n=6~15、平均±S.D.)。(D) 解析した自然免疫細胞のゲーティングストラテジー。ミエロイド系生細胞 (FVS780⁻, CD45⁺, Lineage [CD3e, B220]⁻) をゲートし、Eosinophil (Siglec-F⁺)、Neutrophil (Siglec-F⁻, CD11b⁺, Ly6G⁺)、Dendritic cell (Siglec-F⁻, Ly6G⁻, F4/80⁺, CD11c⁺)、Monocyte (Siglec-F⁻, Ly6G⁻, F4/80⁺, CD11c⁻, CD11b⁺, Ly6C⁺)、Macrophage (Siglec-F⁻, Ly6G⁻, F4/80⁺, CD11c⁻, CD11b⁺, Ly6C⁻, I-A/I-E⁺) を解析した。(E) - (J) コントロール群および歯周病各群における各組織の自然免疫細胞の細胞数 (平均±S.D.)。(E) Gingiva (n=6~7)、(F) NALT (n=6~7)、(G) cLN (n=13~14)、(H) medLN (n=5~13)、(I) Spleen (n=6~15)、(J) MLN (n=6~7) における自然免疫細胞の細胞数。結果は1回もしくは2回の実験を示す。
*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001、****P < 0.0001。One-way ANNOVA分析とDunnet検定。

**A****B****C Gingiva****D****E NALT****F****G cLN****H**

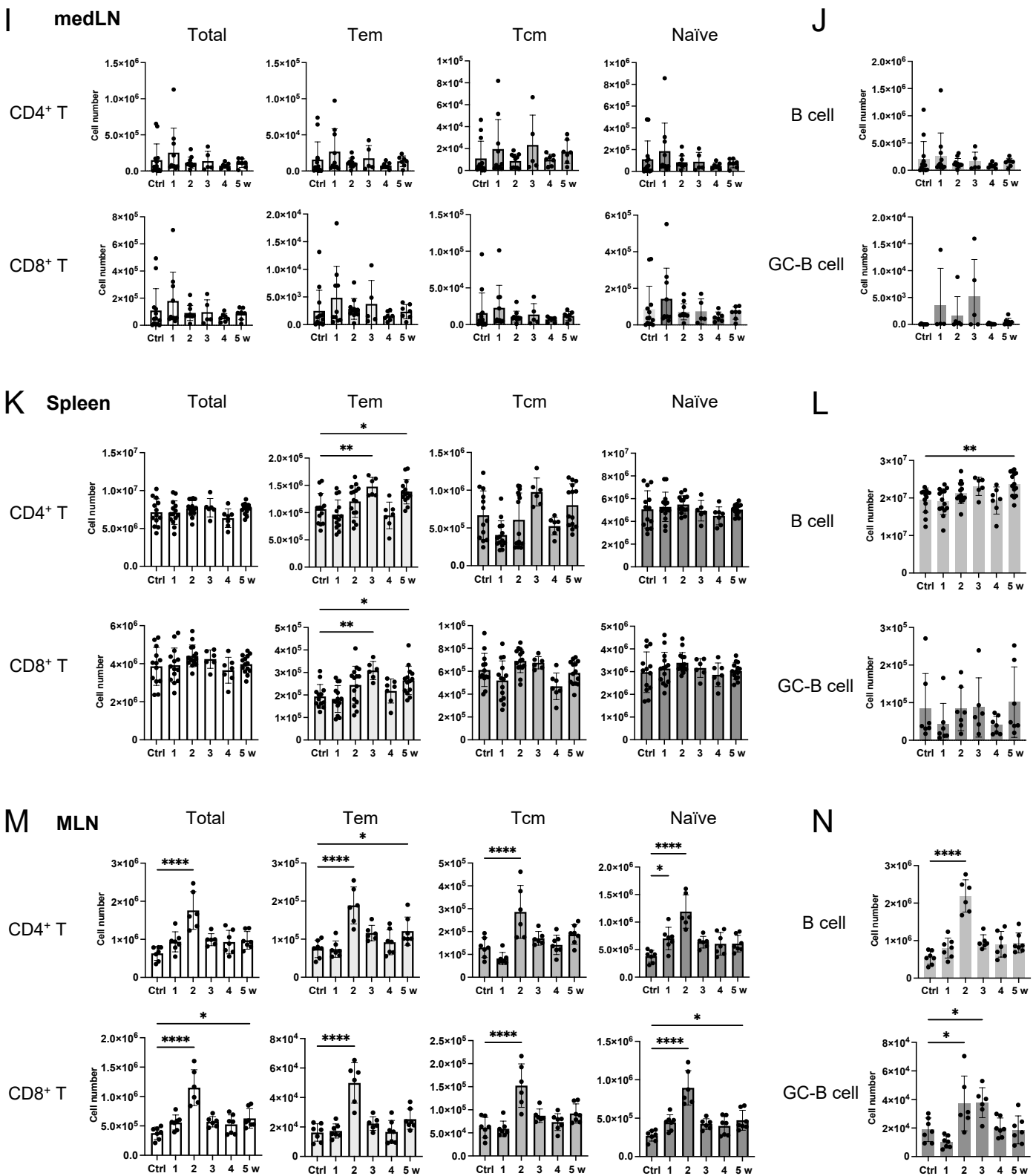


図4 絹糸誘導性歯周病モデルは全身で適応免疫応答を誘導した

(A) - (B) 解析した適応免疫細胞のゲーティングストラテジー。(A) T細胞は生細胞 (FVS780-) をゲートし、CD4⁺T細胞 (TCRβ⁺ CD4⁺)、CD8⁺T細胞 (TCRβ⁺ CD8a⁺)を解析した。さらに、CD4/8⁺T細胞中のエフェクターメモリーT細胞 (Tem: CD44⁺ CD62L⁻)、セントラルメモリーT細胞 (Tcm: CD44⁺ CD62L⁺)、ナイーブT細胞 (Naïve: CD44⁻ CD62L⁺) を解析した。(B) B細胞は生細胞 (FVS780-) をゲートし、B細胞 (CD19⁺ B220⁺)、胚中心B細胞 (GC-B細胞: CD19⁺ B220⁺ GL-7⁺ CD95⁺) を解析した。(C) - (N)コントロール群および歯周病各群における各組織の適応免疫細胞の細胞数 (平均±S.D.)。 (C, D) Gingiva (n=6~7)、(E, F) NALT (n=6~7)、(G, H) cLN (n=13~14)、(I, J) medLN (n=5~13)、(K, L) Spleen (n=6~15)、(M, N) MLN (n=6~7) における適応免疫細胞の細胞数。結果は1回もしくは2回の実験を示す。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001、****P < 0.0001。One-way ANNOVA分析とDunnet検定。

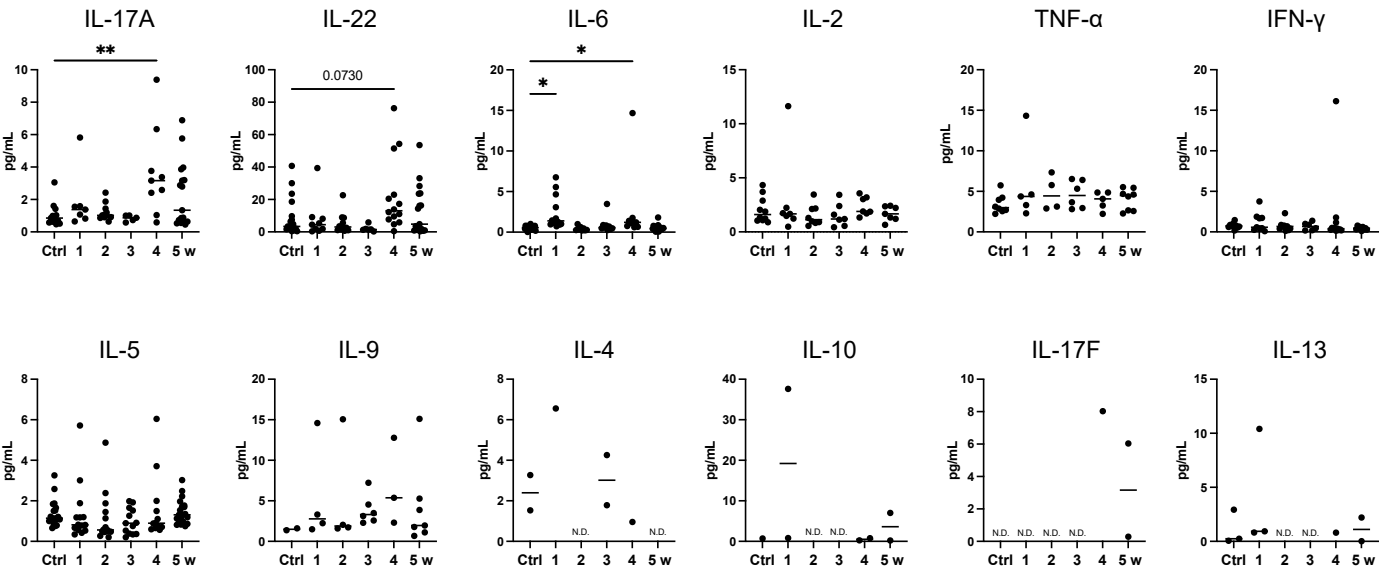
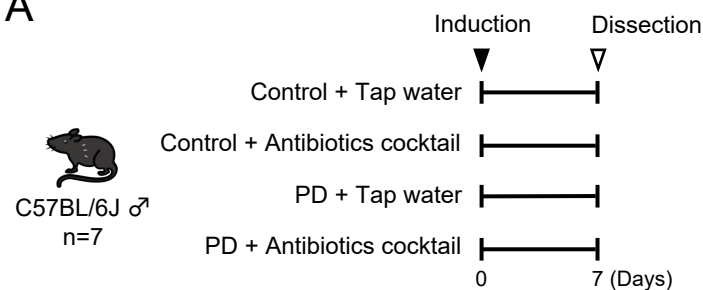


図5 絹糸誘導性歯周病モデルの血清でTh17関連サイトカインが上昇した

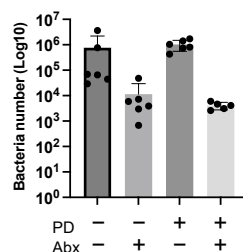
(A) コントロール群および歯周病誘導1~5週間後における血清中のTh1/2/17関連サイトカインをマルチプレックス・アッセイによって網羅的に解析した (n=14~21、N.D.: Not detected、バーは中央値を示す)。検出限界以下の個体は示していない。4回の実験を結合した結果を示している。*P < 0.05、**P < 0.01。One-way ANNOVA分析とDunnet検定。

A



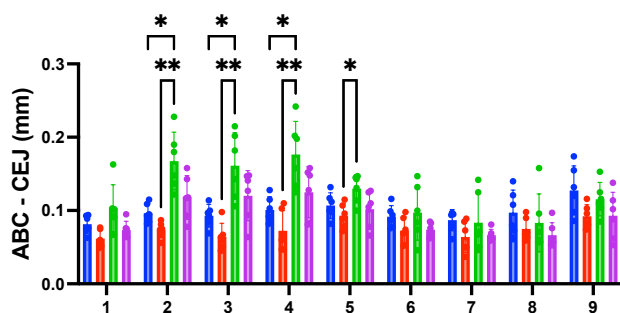
B

Bacteria number in the oral cavity

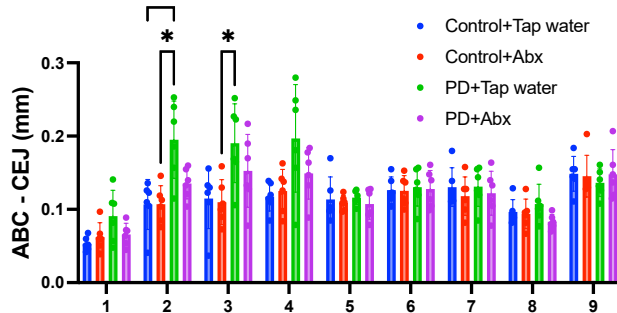


C

Bone resorption (Buccal surface)

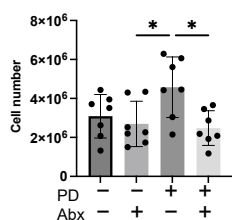


Bone resorption (Palatal surface)

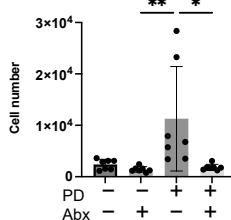


D

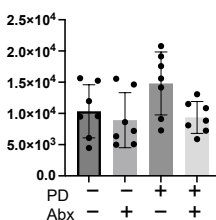
CD45⁺ cells



Neutrophil

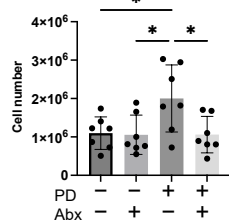


Dendritic cell

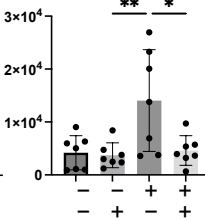


B cell

Total

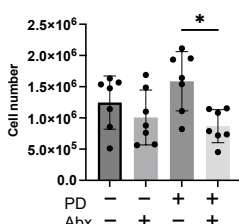


GC-B

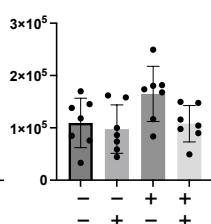


CD4⁺ T cell

Total

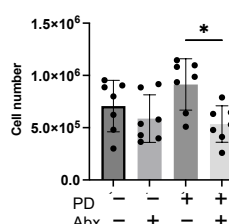


Tem



CD8⁺ T cell

Total



Tem

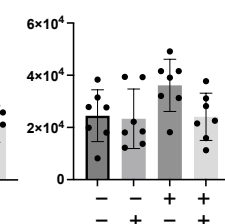
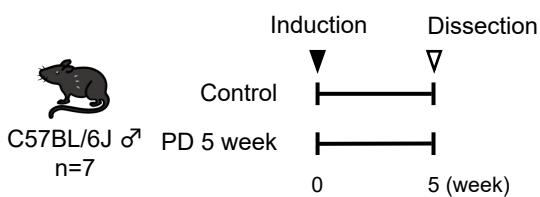


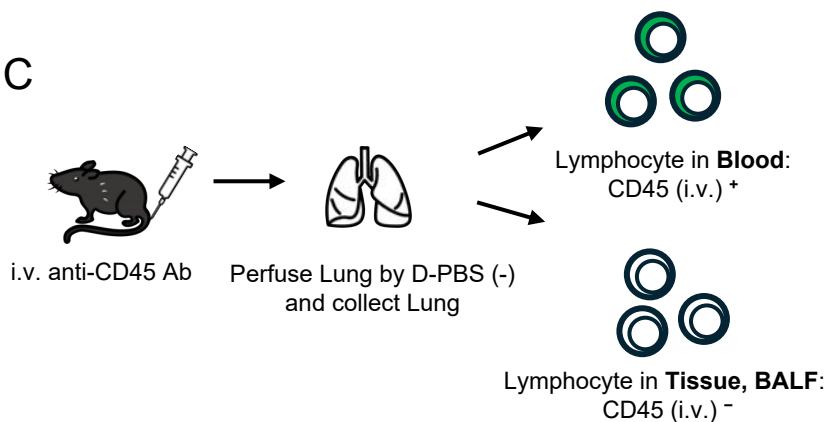
図6 口腔内細菌叢依存的に免疫応答が誘導されていた

(A) 抗生物質処理実験スケジュールの概略図。コントロール群と歯周病誘導群に水もしくは抗生物質カクテル (Abx) を1週間自由飲水させ、解剖した。抗生物質カクテル: アンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン。(B) 各群のqPCRによる口腔内細菌数 (n=5-6, 平均±S.D.)。(C) 各群における頬側もしくは口蓋側の歯槽骨(ABC)-セメントエナメル境 (CEJ) 距離 (n=3, 平均±S.D.)。x軸の1~9は図1(C) の測定位置に対応している。(D) 各群の全リンパ球 (CD45⁺細胞) 数 (n=7, 平均±S.D.)。(E) 各群の自然免疫細胞、適応免疫細胞の細胞数と頻度 (n=7, 平均±S.D.)。結果は1回の実験を示す。*P < 0.05, **P < 0.01。One-way ANNOVA分析とDunnet検定 (C) もしくはTukey検定 (D, E)。

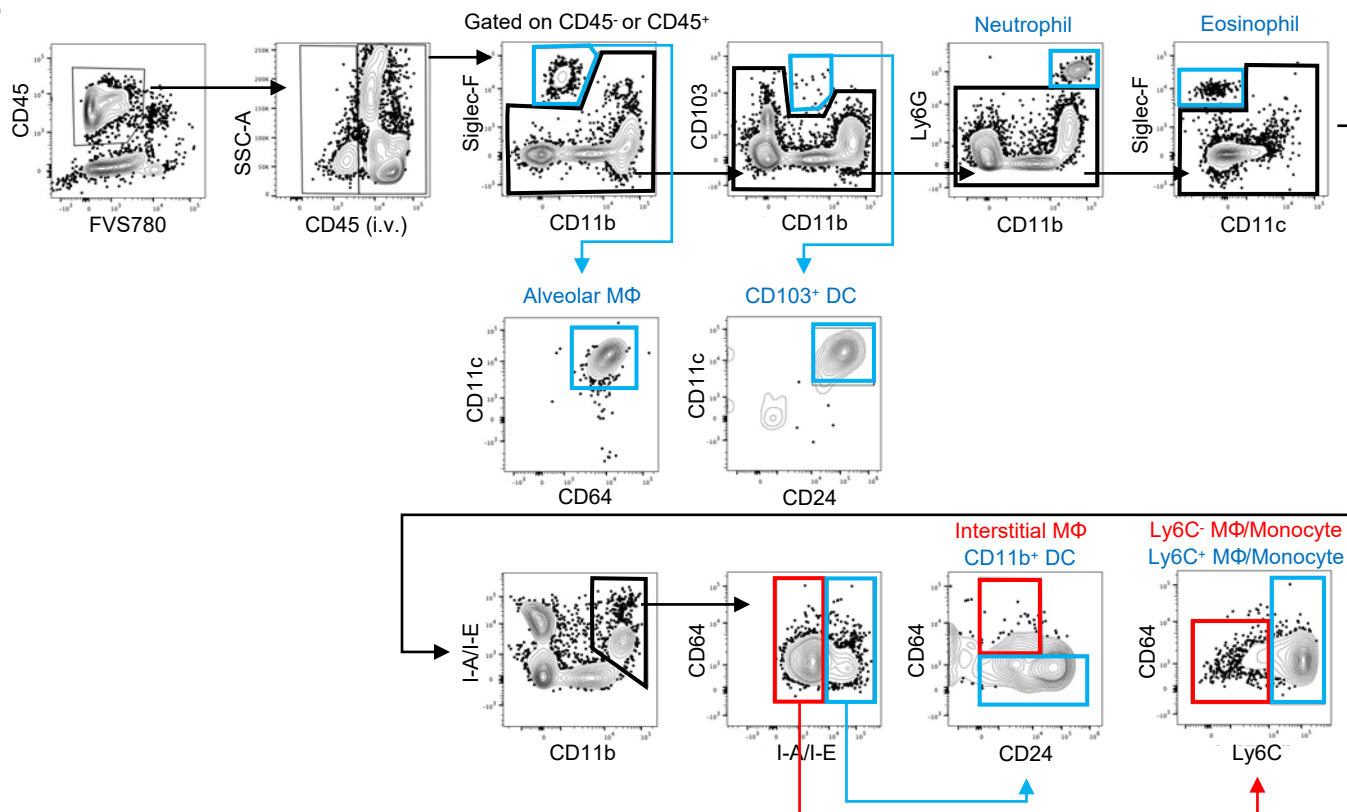
A



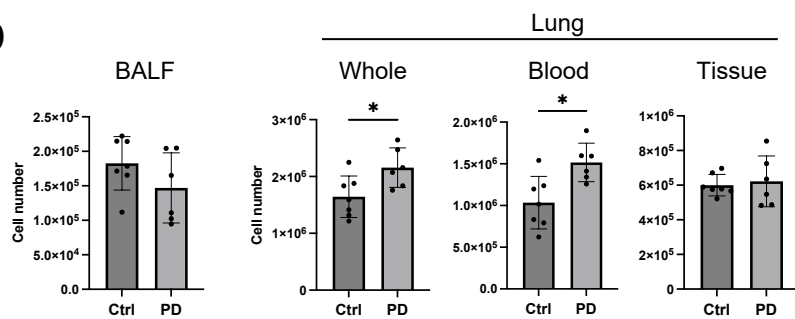
C



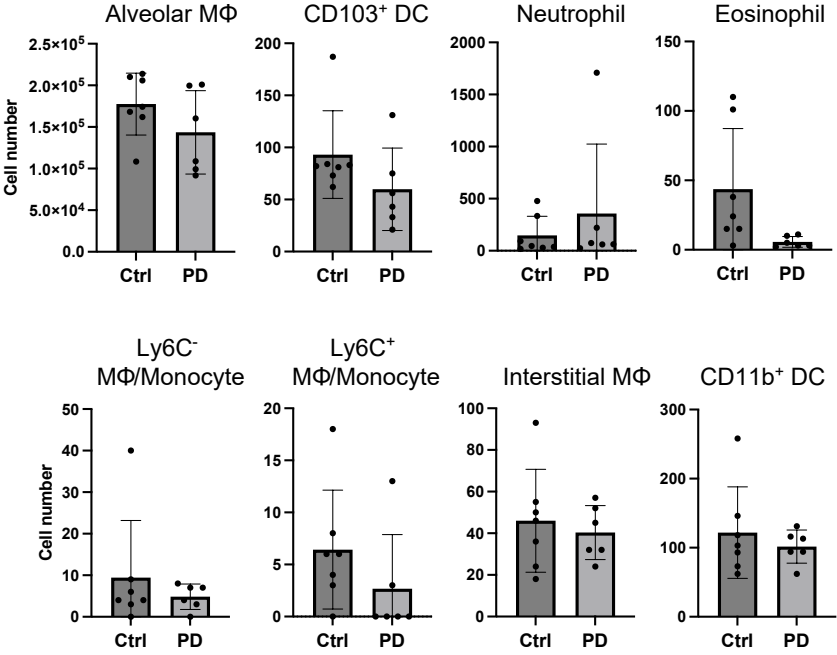
B



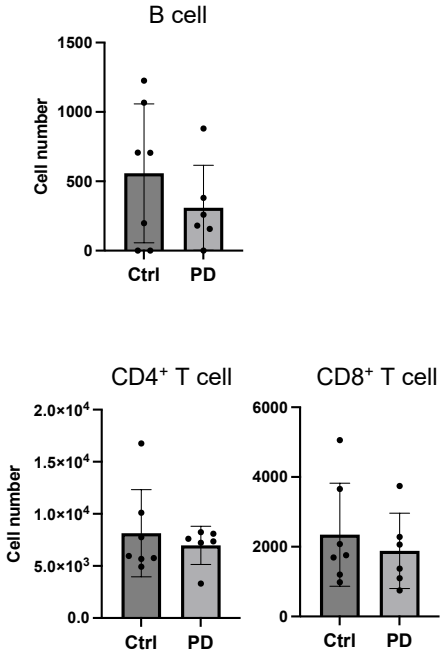
D



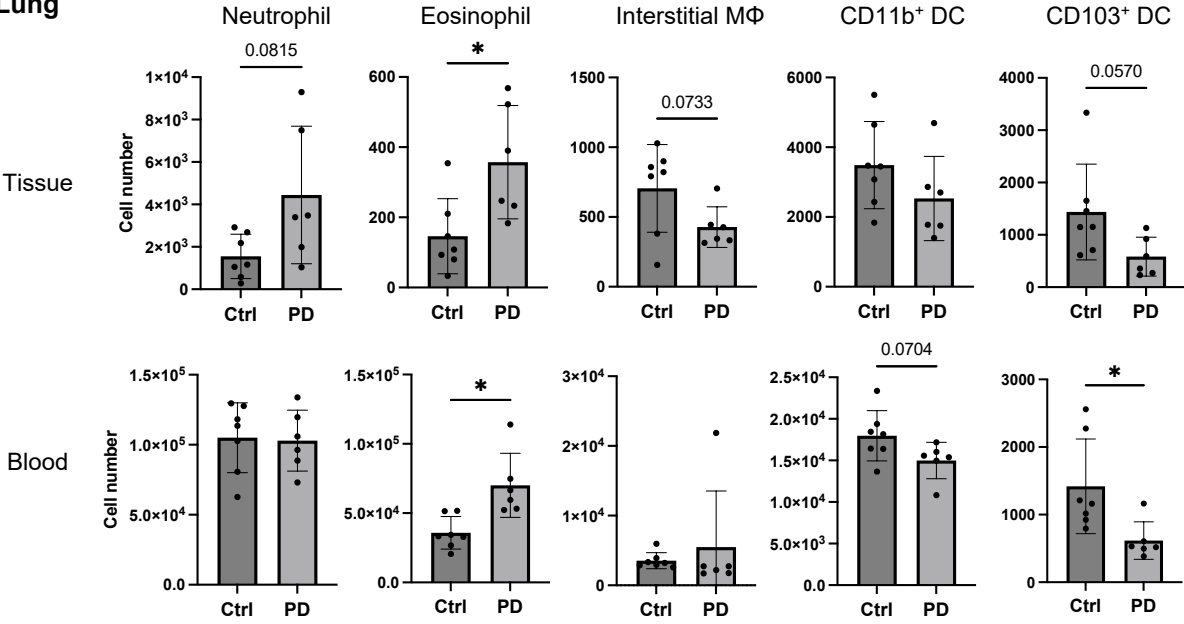
E BALF



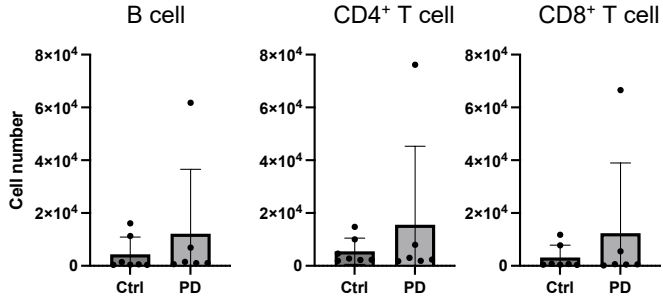
F BALF



G Lung



H Tissue



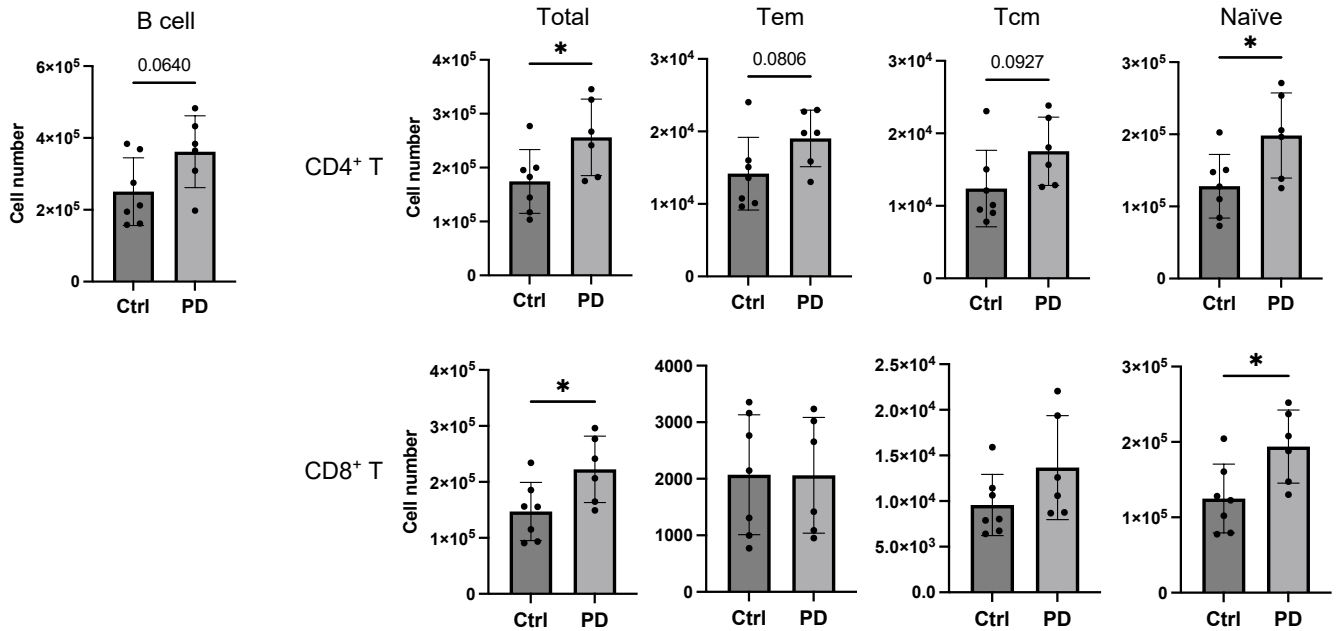
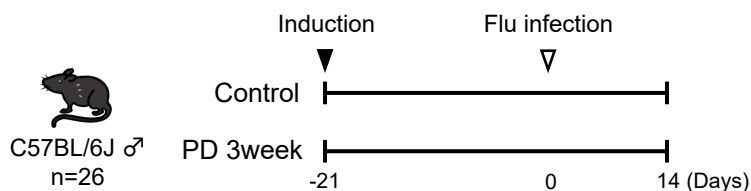


図7 絹糸誘導性歯周病モデルは肺における免疫応答を誘導した

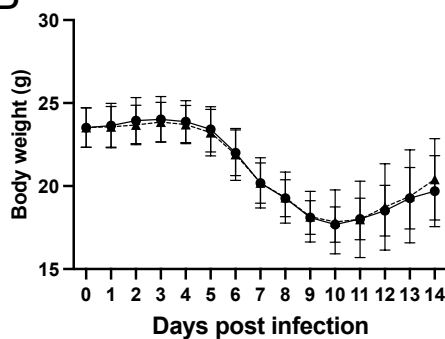
(A) 肺の免疫応答解析スケジュールの概略図。誘導5週間後に解剖した。コントロール群には麻酔のみ行った。(B) 解析したBALF、肺における自然免疫細胞のゲーティングストラテジー。生細胞 (FVS780⁻, CD45⁺) をゲートし、Alveolar Macrophage (MΦ) (Siglec F⁺ CD11b⁻ CD11c⁺ CD64⁺)、CD103⁺ dendritic cell (DC) (CD11c⁺ CD103⁺ CD24⁺)、Neutrophil (CD11b⁺ Ly6G⁺)、Eosinophil (Siglec-F⁺ CD11b⁺ CD11c⁻)、interstitial MΦ (CD11b⁺ I-A/I-E⁺ CD11c⁺ CD64⁺ CD24⁻)、CD11b⁺ DC (CD11b⁺ I-A/I-E⁺ CD11c⁺ CD24⁺ CD64⁻)、Ly6C⁻ and Ly6C⁺ MΦ/Monocyte (CD11b⁺ I-A/I-E⁻ CD64⁺ Ly6C⁻ or Ly6C⁺)を解析した。適応免疫細胞のゲーティングは図4と同様。(C) 肺解析の概略図。抗CD45抗体を尾静脈投与 (i.v.) し、肺をPBSを用いて脱血したのち回収した。これにより血中リンパ球はCD45⁺となり、組織中・BALF中の細胞はCD45⁻と識別できる。(D) 各群における気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺全体 (Whole)、肺毛細血管中 (Blood)、肺間質中 (Tissue) の全リンパ球 (CD45⁺細胞) 数 (n=6~7、平均±S.D.)。 (E) 各群におけるBALF中の自然免疫細胞数(n=6~7、平均±S.D.)。 (F)各群におけるBALF中の適応免疫細胞数 (n=6~7、平均±S.D.)。 (G) 各群における肺間質中、肺毛細血管中の自然免疫細胞数 (n=6~7、平均±S.D.)。 (H) 各群における肺間質中の適応免疫細胞数 (n=6~7、平均±S.D.)。 (I,J) 各群における肺毛細血管中の適応免疫細胞数 (n=6~7、平均±S.D.)。 (I) B細胞数と(J) T細胞全体とT細胞サブセットの細胞数。結果は1回の実験を示す。 *P < 0.05。Studentのt検定もしくはWelchのt検定。

A

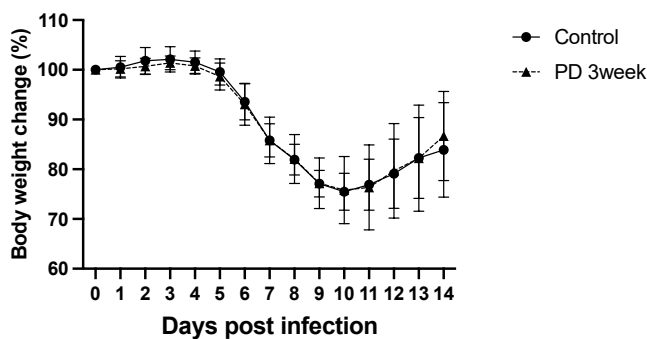


B

Bodyweight (g)



Bodyweight (%)



C

Survival rate

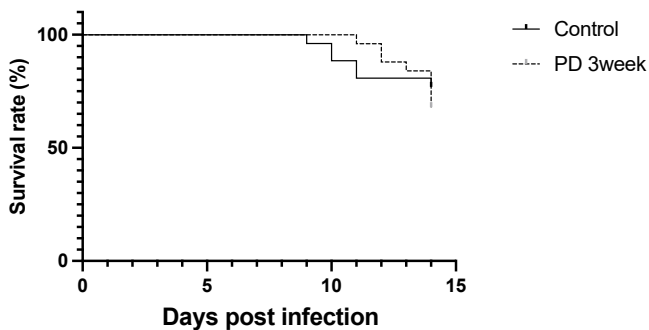
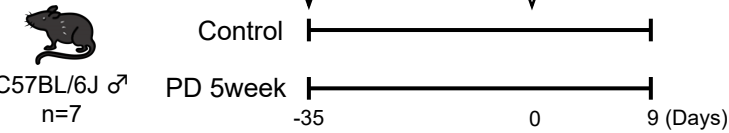


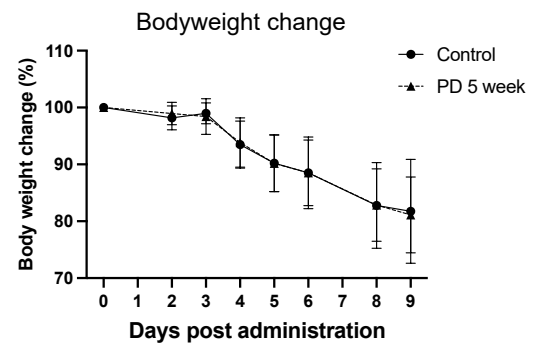
図8 絹糸誘導性歯周病モデルはインフルエンザ感染の重症度に影響を与えなかった

(A) 歯周病モデルマウスに対するインフルエンザ感染スケジュールの概略図。コントロール群には歯周病誘導時は麻酔のみ行った。誘導から3週間後に両群に50 PFUのA型インフルエンザウイルスを経気管感染させた。感染から2週間体重測定と生存率を測定した。(B) 感染から2週間の実体重（左）と感染当日の体重を100%とした体重変化率（右）（n=26、平均±S.D.）。(C) 感染から2週間の生存率。結果は1回の実験を示す。

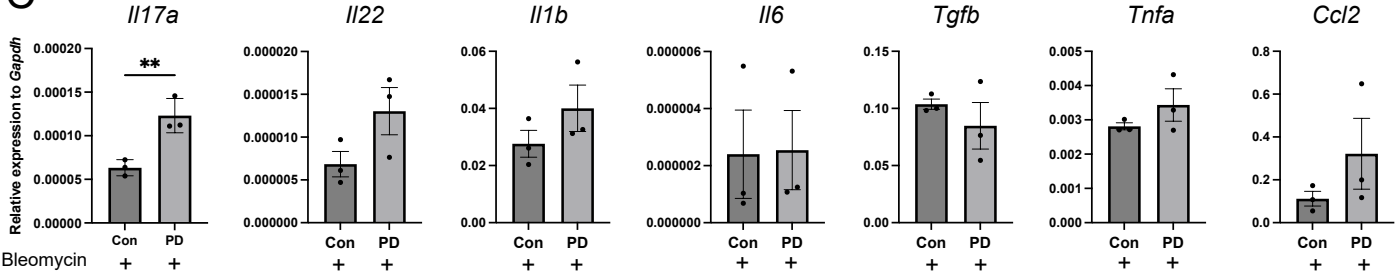
A



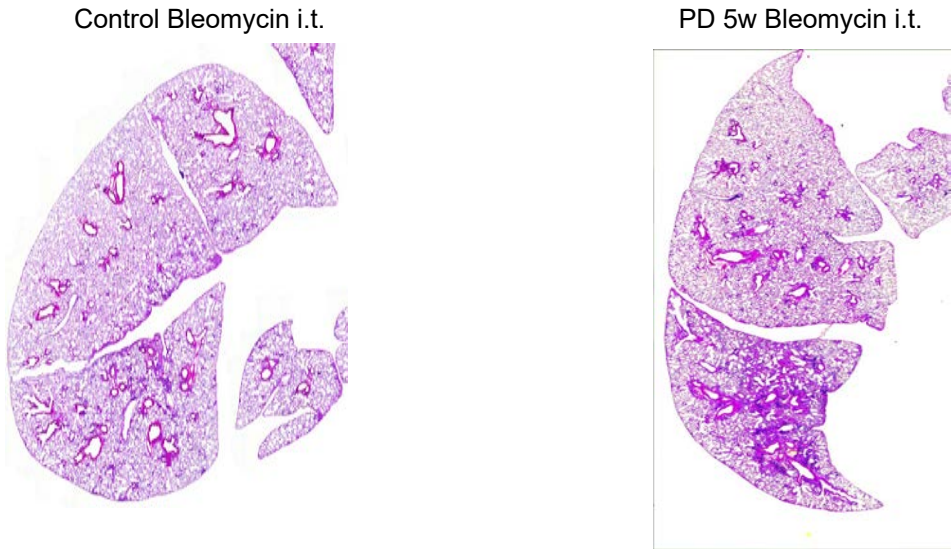
B



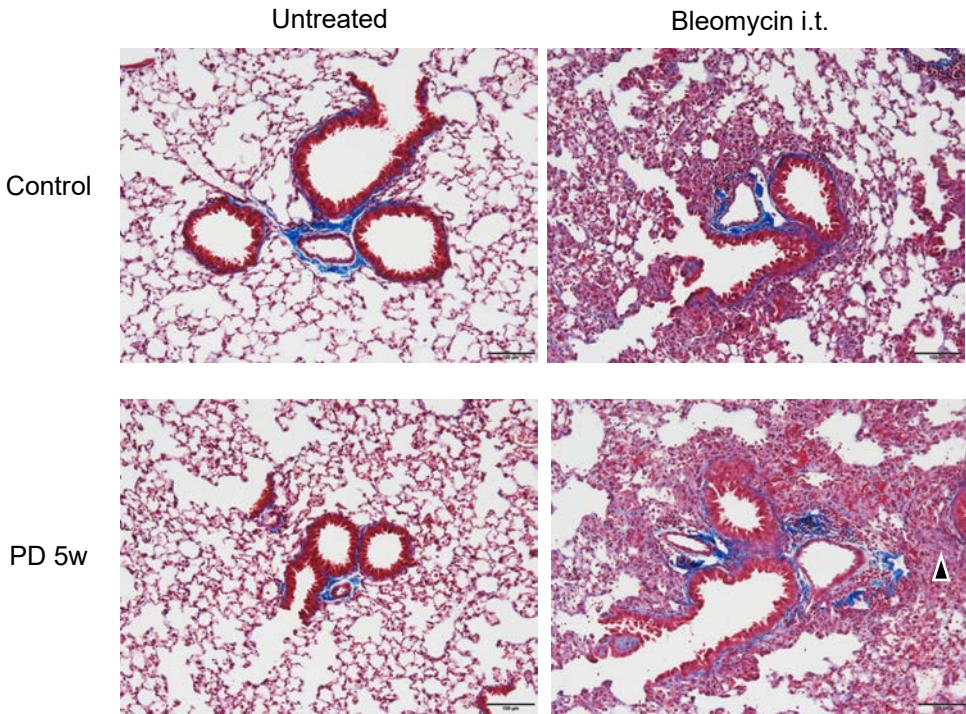
C



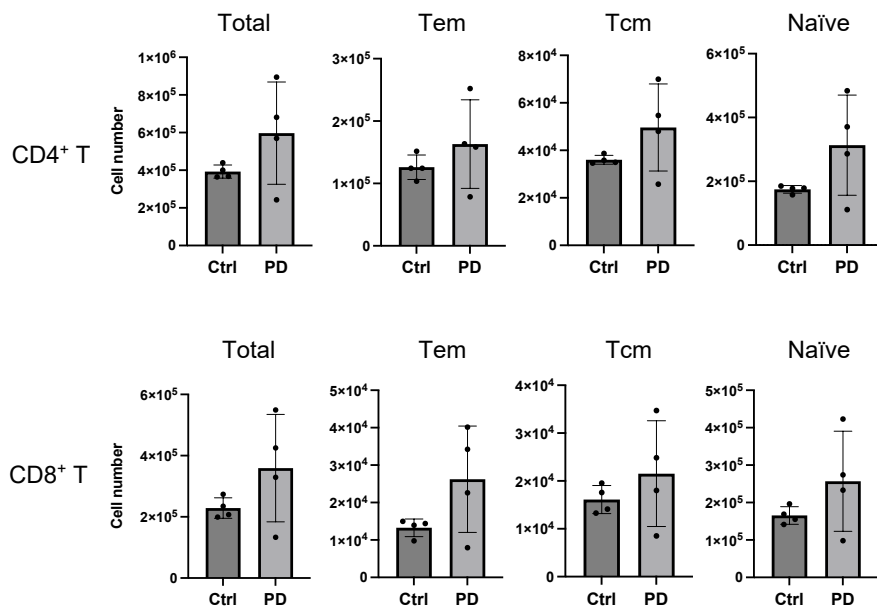
D



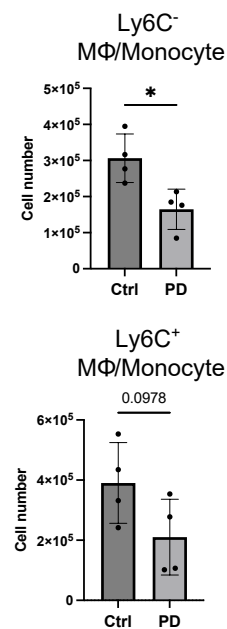
E



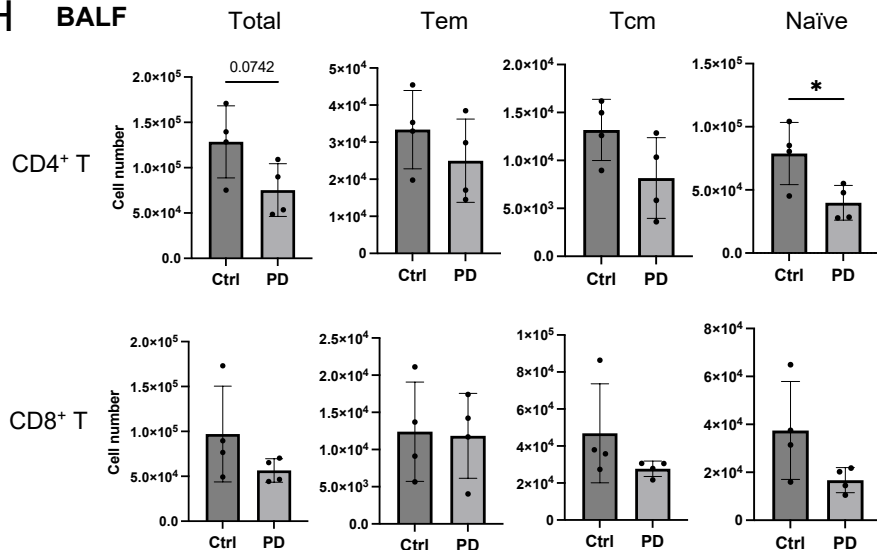
F Lung



G Lung



H BALF



I BALF

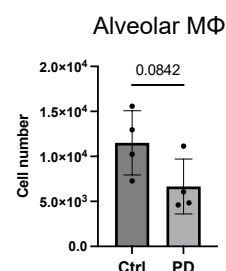


図9 絹糸誘導性歯周病モデルはブレオマイシン誘導性肺線維化を増悪させる傾向にあった

(A) 歯周病モデルマウスに対するブレオマイシン投与スケジュールの概略図。コントロール群には歯周病誘導時は麻酔のみ行った。誘導から5週間後に両群にブレオマイシンを気管投与した。投与から9日後に解剖した。(B) 投与当日の体重を100%とした体重変化率 (n=7、平均±S.D.)。(C) qPCRによるブレオマイシン投与マウス肺組織の*Gapdh*に対する炎症性メディエーター発現量 (n=3、平均±S.D.)。(D) 両群の肺HE染色像。(E) コントロール群、歯周病5週間群の非処理肺とブレオマイシン投与肺のトリクローム染色像。スケールバーは100 μ mを示す。矢頭はリンパ球浸潤内部の繊維を示している。(F, G) 肺組織中の免疫細胞数 (n=4、平均±S.D.)。(F) CD4/8⁺T細胞全体とT細胞サブセットの細胞数と (G) Ly6C⁺マクロファージ/単球の細胞数。(H, I) BALF中の免疫細胞数 (n=4、平均±S.D.)。(H) CD4/8⁺T細胞全体とT細胞サブセットの細胞数と (I) 肺泡マクロファージの細胞数。結果は1回の実験を示す。*P < 0.01。Studentのt検定もしくはWelchのt検定。