

| | | | |
|---------|-------------------------------------|---------|----------|
| 氏名 | 磯島 大地 | | |
| 授与した学位 | 博士 | | |
| 専攻分野の名称 | 歯学 | | |
| 学位授与番号 | 博甲第5696号 | | |
| 学位授与の日付 | 平成30年3月23日 | | |
| 学位授与の要件 | 医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当) | | |
| 学位論文の題目 | 歯周炎罹患の有無によるアテローム性動脈硬化病変の細菌叢のメタゲノム解析 | | |
| 論文審査委員 | 仲野 道代 教授 | 森田 学 教授 | 苔口 進 准教授 |

学位論文内容の要旨

【緒言】

ヒトの口腔内や腸内には様々な細菌が共生しており、それら細菌叢全体はマイクロバイオーームと呼ばれている。歯周炎は、歯周病原細菌が歯周組織に感染し発症する感染症であるが、単一菌種による感染ではなく常在菌を含むマイクロバイオーームのバランスの崩壊から発症・進展すると考えられている。また、歯周炎は末梢臓器に影響を及ぼす軽微慢性炎症という側面も有しているため、糖尿病、動脈硬化、心臓弁疾患など様々な全身疾患に関与していることが示唆されてきている。

アテローム性動脈硬化症は、様々な原因によって血管内壁にアテローム性プラークが沈着する循環器疾患である。アテローム性動脈硬化症と歯周炎との関連は、疫学的分析やアテローム性プラーク内に歯周病原細菌が検出されたことから、相関関係が示唆されているが、両疾患の発症には、喫煙や糖尿病など共通交絡因子が多数存在するため、発症メカニズムに関する決定的な因果関係は明らかになっていない。

そこで、両疾患の関連性を細菌学的に探求するために次世代シーケンサーを使用したマイクロバイオーーム解析に着眼した。マイクロバイオーーム解析は、近年、16S rRNA遺伝子を用いた網羅的な細菌群集解析手法によって難培養性で検出が困難であった細菌についても解析することが可能となった。そこで本研究では、アテローム性動脈硬化症を有する患者の歯周炎の罹患状態を把握した上で、口腔内およびアテローム性プラーク内のマイクロバイオーームを次世代シーケンサーで網羅的に解析し、両疾患の関連性を細菌学的に検討することを目的とした。

【材料と方法】

1. **患者選別**：2016年4月から11月までの期間、脳神経センター大田記念病院を受診した内頸動脈狭窄症患者で頸動脈血栓内膜剥離術（CEA：carotid endarterectomy）を受ける患者17人から、現在歯数10歯以上である12人を被験者とした。被験者から歯周病学会ガイドライン（歯周治療の指針2015）に基づいて、中等度から重度群歯周炎群（Periodontitis群：4名）と非歯周炎群（Control群：4名）を抽出した。
2. **サンプル採取**：抽出した被験者から、以下の通りサンプルを採取し、 -40°C で冷凍し、冷凍状態で岡山大学歯周病態学分野に輸送した後、 -80°C で保管した。
 - アテローム性プラーク：CEA施行時に外科的に摘出
 - 歯周ポケットプラーク：歯周ポケット値の最深部にペーパーポイント（United Dental Manufactures）を挿入し採取
 - 舌表面唾液：舌表面からForensic Swab（Sarsted AG & Co）を用いてスワブ法にて採取

3. **細菌 DNA の抽出**：各種サンプルから QIAamp DNA Microbiome Kit (Qiagen) を使用し、細菌 DNA を抽出した。なお、ホモジナイズの方法はシリカ入りチューブである Lysing Matrix B に菌液を加え、Fast Prep 24 (ともに MP Biomedicals) で振盪させた。また、抽出した DNA は -80°C で保管した。
4. **次世代シーケンス (メタゲノム) 解析**：上記 3. で得られた細菌 DNA から、16S rRNA 遺伝子中の特定領域 (1352 bp) を polymerase chain reaction (PCR) 法で増幅した。その後、V3-4 領域 (460 bp) で次世代シーケンス解析を行い、各種サンプルの塩基配列を解読した。得られたデータを CLC Genomics Workbench (CLC bio) でデータベースに照合し、統計分析ソフトを使用し組成分析、主成分分析、クラスター分析、共起ネットワーク分析を実施した。
5. **血清 IgG 抗体価検査**： -80°C にて凍結保存した血清を酵素抗体法 (ELISA) 法によって歯周病原細菌 12 菌株に対する血清 IgG 抗体価の測定を行った。
6. **全身状態と歯周炎罹患状態の評価方法**：CEA の術前検査結果で両群間の特徴や交絡因子となり得る全身状態の検査値を評価した。また、歯周組織検査と歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価検査から、両群の現在歯数と歯周炎罹患状態を評価した。
7. **統計解析**：統計解析は、Mann-Whitney U Test を用いて行い、統計学的有意水準は 5 % 未満とした。

【結果】

1. **対象被験者の特徴と歯周炎罹患状態**：Control 群と Periodontitis 群間の特徴や全身状態で交絡因子となり得る因子はなかった。また、平均歯周ポケット深さには両群間に有意な差があった。Control 群と比較して Periodontitis 群では、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 3 菌株、*Capnocytophaga ochracea* 1 菌株、*Porphyromonas gingivalis* 1 菌株の血清 IgG 抗体価値が有意に高かった。
2. **マイクロバイーム組成分析**：Control 群と比較し、Periodontitis 群の口腔内では病原細菌の割合が増加し、常在細菌が減少する傾向があり、その傾向は歯周ポケットプラークのほうで顕著であった。また、Periodontitis 群において、舌表面唾液では *Filifactor* 属、歯周ポケットプラークでは *Desulfobulbus* 属といった歯周炎関連細菌の割合が有意に高かった。一方、アテローム性プラークのマイクロバイームは口腔内のものとは全く異なり、口腔内細菌はほとんど存在しなかった。
3. **マイクロバイーム主成分分析とクラスター分析**：主成分分析の結果から、Control 群と Periodontitis 群の舌表面唾液のマイクロバイームは類似しており、Control 群の歯周ポケットプラークのマイクロバイームも両群の舌表面唾液のマイクロバイームと類似していた。一方で、Periodontitis 群の歯周ポケットプラークのマイクロバイームは Control 群と比較し、総じて異なる傾向を示した。また、両分析結果とも、アテローム性プラークのマイクロバイームは、口腔内のものと全く異なっていた。しかし、クラスター分析においてアテローム性プラークのマイクロバイーム組成は、Control 群と Periodontitis 群間で変化する傾向が観察された。
4. **アテローム性プラークマイクロバイームの共起ネットワーク分析**：アテローム性プラークにおいて共起ネットワーク分析を行ったところ、相関関係を形成している中心細菌は両群間で類似していた。しかし、Control 群と比較して、Periodontitis 群では、*Cutibacterium acnes* を中心した相関関係において変化が見られた。

【考察】

本研究において、歯周炎罹患にかかわらずアテローム性プラークに存在する口腔内細菌の割合は著しく低く、またアテローム性プラークと口腔内のマイクロバイームの組成は大きく異なっていた。これら結果から、歯周病原細菌が血行性にアテローム性プラークに到達し、形成に影響した可能性は低いと考える。一方で、歯周炎罹患の有無でアテローム性プラーク内の *C. acnes* の相関関係に変化が生じていた。*C. acnes* は、近年、感染性心内膜炎や敗血症の起炎菌となった報告もある。また、動物モデルにおいて *C. acnes* の加熱死菌を投与することで生じるリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) 感受性の亢進は、interleukin-12 (IL-12) や interferon gamma (IFN γ) による Toll-like receptor 4 (TLR4) 発現増強に起因することが報告されている。したがって、歯周病原細菌の LPS が、血行性伝播や、微小慢性炎症による影響で *C. acnes* を介し、動脈硬化

症の病態悪化に関与している可能性が示唆された。

【結論】

アテローム性動脈硬化症の発症には、血行性に体内に侵入した口腔内細菌が直接影響を及ぼすのではなく、歯周炎感染がアテローム性プラークのマイクロバイオーームにおいて細菌の生態系構成を変化させて間接的に関与している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

ヒトの口腔内や腸内には様々な細菌が共生しており、現在、それら細菌叢全体はマイクロバイオーム (MB) と呼ばれている。歯周炎は、歯周病原細菌が歯周組織に感染して発症する感染症であるが、近年では、常在菌を含むMBのバランスの崩壊から発症・進展すると考えられている。また、歯周炎は軽微慢性炎症といった側面も有しているため、糖尿病や動脈硬化など様々な全身疾患に関与することが示唆されている。それらの疾患の中で、過去の知見からアテローム性動脈硬化症は、歯周炎との相関関係が示唆されているが、両疾患の発症には喫煙や糖尿病など共通交絡因子が多数存在するため、発症メカニズムに関する決定的な因果関係は明らかになっていない。

そこで、本研究は、両疾患の関連性を細菌学的に探求するために、次世代シーケンサーを使用した16S rRNAメタゲノム解析法に着眼した。研究について説明後、同意を得た頸動脈血栓内膜剥離術を受ける内頸動脈狭窄症患者17人から、歯周病学会ガイドライン (歯周治療の指針2015) に基づいて中等度から重度群歯周炎群 (Periodontitis群: 4名) と非歯周炎群 (Control群: 4名) を抽出した。そして、被験者の口腔内と外科的に摘出したアテローム性プラーク内のMBを、16S rRNAメタゲノム解析法で解析した。得られた結果は以下の通りである。

- 1) **対象被験者の特徴と歯周炎罹患状態**: Control群とPeriodontitis群間の特徴や全身状態で交絡因子となり得る因子はなかった。また、平均歯周ポケット深さには両群間に有意な差があった。Control群と比較してPeriodontitis群では、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 3菌株、*Capnocytophaga ochracea* 1菌株、そして*Porphyromonas gingivalis* 1菌株の血清IgG抗体価が有意に高かった。
- 2) **マイクロバイオーム組成分析**: Control群と比較して、Periodontitis群の口腔内では、病原細菌の割合が増加し、常在細菌が減少する傾向があり、その傾向は歯周ポケットプラークで顕著であった。また、Periodontitis群において、舌表面唾液では*Filifactor*属、歯周ポケットプラークでは*Desulfobulbus*属といった歯周炎関連細菌の割合が有意に高かった。一方、アテローム性プラークのMBは口腔内のものとは全く異なり、口腔内細菌はほとんど存在しなかった。
- 3) **マイクロバイオーム主成分分析とクラスター分析**: 主成分分析の結果、Control群とPeriodontitis群の舌表面唾液のMBは類似しており、Control群の歯周ポケットプラークのMBも両群の舌表面唾液のMBと類似していた。一方で、Periodontitis群の歯周ポケットプラークのMBはControl群と比較し、総じて異なる傾向を示した。また、両分析結果とも、アテローム性プラークのMBは、口腔内のものと全く異なっていた。しかし、クラスター分析において、アテローム性プラークのMB組成は、Control群とPeriodontitis群間で変化する傾向が観察された。
- 4) **アテローム性プラークマイクロバイオームの共起ネットワーク分析**: アテローム性プラークにおいて共起ネットワーク分析を行ったところ、相関関係を形成している中心細菌は両群間で類似していた。しかし、Control群と比較して、Periodontitis群では、*Cutibacterium acnes* を中心とした相関関係において変化が見られた。

以上のことから、歯周病原細菌が血行性にアテローム性プラークに到達し、形成に直接影響した可能性は低いと考えられた。しかし、歯周炎罹患の有無でアテローム性プラーク内の*C. acnes*の相関関係に変化が生じていたことから、歯周病原細菌のリポ多糖が、血行性伝播や、微小慢性炎症による影響で*C. acnes*を介し、動脈硬化症の病態悪化に関与している可能性が示唆された。本研究で得られた結果は、両疾患因果関係解明の一助となり、今後の医科歯科連携医療の発展に貢献すると考えられる。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認めた。