

論 文 要 旨

歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来
Lipopolysaccharide の投与が
マウス脾臓の遺伝子発現に与える影響

令和元年度
北海道医療大学大学院歯学研究科

平木 大地

【緒 論】

近年、歯周炎は糖尿病や呼吸器疾患、感染性心内膜炎、自己免疫疾患、慢性腎臓病などの全身疾患の危険因子であることが示唆されており、加えて、歯周炎と口腔癌や食道癌、肺癌、膵臓癌などの発症との間に関連があるとする疫学的研究結果も報告されている。膵臓癌は非常に致命的であり、5年相対生存率は7.7%と全ての癌の中で最も低く、本邦における癌の部位別死因の第4位である。慢性膵炎やアルコール、肥満、喫煙、糖尿病等が膵臓癌の発症に関係する危険因子と考えられているが、原因は未だ解明されていない。

近年の大規模なコホート研究では、歯の喪失または歯周病と膵臓癌発症リスクとの関連が報告されており、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 由来 Lipopolysaccharide (LPS) に対する高い抗体価を有する患者では、膵臓癌発症のリスクが約2倍高いことがわかっている。また、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を用いて、口腔内細菌叢の変化と膵臓癌発症の関連が検討されており、*P. gingivalis* と *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* が存在すると膵臓癌発症のリスクが増加するとの報告もあり、歯周炎は膵臓癌に影響を及ぼしていると考えられる。しかしながら、どのように関与しているのか詳細なメカニズムについては不明である。

そこで今回は先行研究に基づき *P. gingivalis* 由来 LPS を用いて急性炎症を引き起こさないマウスモデルを使用し、*P. gingivalis* 由来 LPS の全身投与による、膵臓の遺伝子発現に対する影響を明らかにすることを目的として、遺伝子の網羅的な解析を行った。このデータの中で、発現の上昇が認められた遺伝子を抽出し、その局在について検討を行った。

【材料および方法】

1. *P. gingivalis* 由来 LPS の抽出

P. gingivalis ATCC33277 株を3日間嫌気培養し、ホットフェノール法にて LPS を抽出した。

2. 動物

実験動物には北海道医療大学動物実験倫理委員会の承認の元、C57BL/6J マウスを用いて実施した。

3. *P. gingivalis* 由来 LPS の投与

膵臓への影響を検証するため、8-10 週齢の C57BL/6J マウスに *P. gingivalis* 由来 LPS を 5.0 mg/kg の濃度で 3 日毎に、30 日間投与し、最終投与より 3 日後に屠殺した。屠殺後、膵臓を摘出して二分割にし、一方を 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液で 24 時間固定し、他方は total RNA を抽出した。

4. 組織学的観察

膵臓の組織学的変化を観察するため、摘出した膵臓組織について Hematoxylin eosin (H&E) 染色を行った。

5. 炎症性サイトカインの mRNA 発現解析

膵臓の炎症程度を評価するために、炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6 および TNF- α) の mRNA 発現変化を定量的 real-time reverse transcription polymerase chain reaction (quantitative real-time RT-PCR, qRT-PCR) 法により解析した。

6. マイクロアレイ網羅的解析

遺伝子のマイクロアレイ網羅的解析を行った。得られた解析結果から、発現上昇が強く認められた上位 10 遺伝子を選出した。

7. 遺伝子検索

マイクロアレイ解析より発現上昇が認められた上位 10 位遺伝子で、再現性が確認された遺伝子について、web サイト「The Human Protein Atlas」が提供している、遺伝子の発現情報データベースより、膵臓疾患に関連する遺伝子かどうか検索を行った。

8. マイクロアレイの再現性の確認

遺伝子検索により、膵臓疾患関連遺伝子の Reg3A および G (Reg3A/G) についての再現性を確認するため、qRT-PCR 法による mRNA 発現の確認を行なった。

9. 免疫組織化学染色

Reg3A/G の膵臓におけるタンパクの発現を観察するために、免疫組織化学染色を行った。免疫染色画像の二値化による領域抽出を行い、膵臓のランゲルハンス島に占める Reg3A/G 発現細胞の面積比率を測定し、定量化を行った。

10. 蛍光免疫染色

Reg3A/G の局在を調べるために、蛍光免疫染色を行った。

11. 統計分析

統計分析は、Mann-Whitney U 検定にて比較・検討し、有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果および考察】

1. 脾臓の炎症と組織観察について

これまで、LPS を腹腔内に投与して脾臓の変化を観察した報告では、大腸菌由来 LPS を用いて脾臓に急性炎症を誘発させたものがあるが、歯周病が臓器に急性炎症を起こすとの報告がないことから、この実験モデルは歯周病の脾臓への影響をみるものとしては適切ではないと考えられる。そこで本研究では、先行研究に基づき *P. gingivalis* 由来 LPS を用いて急性炎症を引き起こさないマウスモデルを使用した。H&E 染色による脾臓の組織標本の観察では、明らかな急性炎症所見や細胞の退行性変化は認められず、炎症性サイトカインである IL-1 β , IL-6 および TNF- α のいずれにおいても、対照群と LPS 投与群を比較して発現レベルに有意差はみられず、炎症性変化のないことが確認された。このことから、本実験モデルは歯周病の脾臓への影響を観察するモデルとして相応しいものと思われた。

2. *P. gingivalis* 由来 LPS 投与による脾臓の遺伝子発現変化

同実験モデルを用いて、マイクロアレイにより脾臓の遺伝子変化の網羅的解析を行った。その結果、発現比の大きかった上位 10 遺伝子は *Ighg3*, *S100A8*, *S100A9*, *LOC102642252*, *Ig κ* , *Iglv1*, *Reg3G*, *Ig κ v4-53*, *Ighv10-3*, *Chil3/Chil4* であった。この中で、qPCR で発現上昇の再現性が確認されたものは *Ighg3*, *Ig κ* , *Iglv1*, *Reg3G* であった。発現上昇が確認されたもののなかで *Reg3G* が脾臓疾患の発症と密接に関係しているものであり、これは *Reg3A* とホモロジーが高く、*Reg3A* も脾臓疾患との関連が明らかになっていることから、*Reg3A* の遺伝子変化を検索した。その結果、マイクロアレイの結果の発現上昇、上位 14 に位置しており、発現上昇の再現性も確認された。*Reg3A/G* は脾臓の前癌病変と癌の進行に関与しているという報告がある。本研究において *P. gingivalis* 由来 LPS で刺激された脾臓で *Reg3A/G*

の発現上昇のみられたことは、歯周病原菌が膵臓癌の発症に関連していることを示唆するものと考えられた。

3. *P. gingivalis* 由来 LPS 投与による膵臓での Reg3A/G タンパクの局在について

P. gingivalis 由来 LPS 投与マウスにおける Reg3A/G のタンパクの局在の変化を検討するため、抗 Reg3A/G 抗体を用いた免疫組織化学染色法を行った。その結果、LPS 投与群の膵臓のランゲルハンス島の外縁付近に茶褐色濃染の陽性反応が認められた。また Reg3A/G 発現の画像解析を行った結果、膵臓ランゲルハンス島に占める Reg3A/G 発現細胞の面積比率は、LPS 投与群で対照群と比較して有意に大きい値となった。さらに局在を調べるために抗 Reg3A/G 抗体および抗 Glucagon 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った結果、Reg3A/G の発現は、ランゲルハンス島の α 細胞と一致していた。以前の研究で、Reg3A はマウスのランゲルハンス島において α 細胞と共局在であることが報告されており、今回の知見は過去の報告と一致している。

【結 論】

歯周病原菌 *P. gingivalis* 由来 LPS は膵臓の Reg3A/G の発現を増加させ、膵臓癌の発症や進行に関与している可能性があることが示唆された。