

論 文 要 旨

女性ホルモンの変動による歯周組織と細菌叢の変化と
それらを介した切迫早産との関連

令和5年度
北海道医療大学大学院歯学研究科

杉山 のどか

【目的】

歯周病と早産・低体重児出産の関連について多くの知見がこれまでに得られているが、その詳細は未だ不明な点が多い。特に妊娠中の女性ホルモン濃度の変動による歯周組織と各部位の細菌叢への影響については十分に明らかにされていない。本研究では、女性ホルモンの変動による歯周組織と各部位の細菌叢の変化とそれらを介した切迫早産との関連を明らかにするために [研究 1] 切迫早産妊婦における女性ホルモンの歯周組織状態と細菌叢への影響, [研究 2] ヒト歯肉上皮細胞における女性ホルモンの影響, [研究 3] 卵巣摘出マウスにおける女性ホルモンの影響について検討した。さらに、歯周病原菌のリポポリサッカライド (LPS) による腸内細菌叢の変化を明らかにするために [研究 4] *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (Pg-LPS) の全身投与による腸内細菌叢の変化について検討した。

【方法】

[研究 1] 切迫早産妊婦 (TPL 群) と非切迫早産妊婦 (non-TPL 群), 各 30 名を被験者とした。被験者情報を聴取後、歯周組織検査を実施した。ホルモン濃度測定のために唾液を、細菌 DNA 抽出のために唾液・頬・膣・腸管粘膜を採取した。唾液中のエストラジオール (E2)、プロゲステロン (P4) 濃度は EIA 法で測定した。細菌 DNA を用いて、細菌叢解析と予測メタゲノム解析を行った。

[研究 2] ヒト歯肉上皮細胞 (HGEP) を培養し、E2 あるいは P4 (25 μ M, DMSO で溶解) を添加し、12 時間培養した。抽出した RNA を用いて RNA-seq を行った。そのデータを基に発現変動遺伝子 (DEG) を検出し、pathway 解析 (IPA) を行った。IPA によって得られた関連遺伝子について、RT-qPCR で再現性を確認した。

[研究 3] 卵巣摘出 Slc:ICR マウスに E2 あるいは P4 (2.5 mg/kg, ゴマ油で懸濁) を 20 日間皮下投与した。採取した頬粘膜から抽出した細菌 DNA を用いて、細菌叢解析と予測メタゲノム解析を行った。また、採取した歯肉組織から mRNA を抽出し、IL1 β , IL6, TNF α また in vitro で再現性を確認した遺伝子の発現度を解析した。

[研究 4] C57BL/6J マウスに Pg-LPS (5 mg/kg) を 3 ヶ月間投与した。便から抽出した細菌 DNA を用いて細菌叢解析と予測メタゲノム解析を行った。また、大腸・小腸組織から mRNA を抽出し、組織切片の製作、HE 染色、IL1 β , IL6, TNF α の発現度を解析した。

【結果】

[研究 1] TPL 群では non-TPL 群と比較して、プロービングポケット深さ (PPD)、歯肉の炎症程度が大きかった。唾液中ホルモン濃度は TPL 群で有意に低く、P4 濃度は子の在胎期間と出生体重で正の相関、PISA で負の相関を認めた。ロジスティック回帰分析の結果、切迫早産は P4 濃度の低下と 4 mm 以上 PPD の増加と有意差が認められた。細菌叢解析では、 α 多様性で膣粘膜の faith pd にのみ有意差が検出され、 β 多様性では全ての検体採取部位で有意差が認められた。ANCOM では、TPL 群の唾液中 *Lactobacillales* 属の減少、頬粘膜 *Veillonella* 属の減少と *Staphylococcus* 属の増加、腸粘膜 *Bifidobacterium* 属の減少、膣粘膜 *Muribaculaceae* 属、*Alistipes* 属、*Staphylococcus* 属の増加が検出された。

[研究 2] DEG は対照群と比較して、E2 群では 699 遺伝子の増加と 348 遺伝子の減少、P4 群では 1448 遺伝子の増加、924 遺伝子の減少が DEG で認められた。E2 群では 143 経路、P4 群では 154 経路の変化が認められた。E2・P4 群に共通して、wound healing signaling pathway を上昇させることが予測された。また、DEG で上位に検出された経路に関する遺伝子の発現が確認された。

[研究 3] 細菌叢解析では α 多様性の faith pd と β 多様性に変化が認められた。歯肉組織の遺伝子発現では、IL1 β 、IL6、TNF α に有意差は認められなかったが、in vitro で抽出した遺伝子のいくつかに有意差が認められた。

[研究 4] 細菌叢解析では α ・ β 多様性に変化は認めなかった。予測メタゲノム解析では、Pg-LPS 群で 47 の経路が上昇、17 の経路が低下した。遺伝子発現解析では全てに変化は認められなかった。

【考察】

[研究 1] では口腔・膣・腸内細菌叢において切迫早産による種の豊富さや均等度に変化はみられないが、組成や構造が変化していた。また TPL 群では女性ホルモン依存性に増殖する共生細菌である唾液中の *Lactobacillales* 目や腸内の *Bifidobacterium* 属の減少を認めた。女性ホルモン濃度の低下は共生細菌に影響し、妊婦や子の健康に影響する可能性がある。また、頬粘膜と膣粘膜の ANCOM において TPL 群で増加が確認された *Staphylococcus* 属は、タクソノミーで割合の多い属であり、ペプチドグリカン生合成の上昇の経路とも関係していると考えられる。女性ホルモンと *Staphylococcus* 属の関係は女性ホルモンにより抑制されるという過去とも一致している。

[研究 2] で検出された経路の中に創傷治癒に関する経路が確認され、これより妊娠期で女性ホルモンの上昇は歯肉の恒常性の維持に作用することが推察される。これは[研究 1] を支持する結果である。また、Th1/Th2 バランスは正常妊娠に重要であり、正常妊娠時は Th2 免疫応答反応に傾く。Th2 型免疫応答に関与する IL33 は上昇し、Th1 型免疫応答に関与する interferon signaling は減少したことから、Th1/Th2 バランスが Th2 型免疫反応に傾いていると考えられる。

[研究 3] では、ホルモン投与により、 α 多様性の faith pd と β 多様性が変化し、これらは臨床研究を支持する結果であった。また、乳酸菌は P4 によって増加する可能性があり、臨床研究での増加も P4 によるものと考えられる。デオキシリボヌクレオチドの生合成も、臨床研究と同じ結果であった。[研究 2] で再現性が確認された遺伝子が本研究でも確認され、[研究 2] を支持する結果であり、ヒトの口腔内でも同じ現象が起きている可能性がある。

[研究 4] では、Pg-LPS 投与により炎症マーカーに変化は認められなかった。またコンドロイチン硫酸分解に関わる経路が Pg-LPS で上昇しており、これは[研究 1] でも変化している経路であった。このコンドロイチン硫酸は妊娠とともに上昇するものであり、その分解と早産に関係があると考えられている。

【結論】

切迫早産妊婦は健常妊娠と比較してプロゲステロン濃度は低下し、歯肉の炎症が増悪する可能性が示された。また、妊娠時の女性ホルモンの変動は、歯肉上皮や口腔細菌叢に影響を及ぼすことが示唆された。これらのことから、切迫早産にはプロゲステロン濃度、歯肉の炎症、細菌叢の変化が相互に関連して影響する可能性が示された。