

論文の内容の要旨

氏名：鈴木 隆 太

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Intratracheal administration of *Fusobacterium nucleatum* worsens elastase-induced emphysema in mice

(*Fusobacterium nucleatum* の気管内投与はマウスのエラスターゼ誘導肺気腫を悪化させる)

歯周病は歯肉の炎症と歯槽骨の吸収を特徴とする炎症性疾患で、30歳以上の約8割が罹患している。歯周病の発症と進展には、バイオフィルムに生息する口腔細菌が複合的に関与しているが、その中でも *Fusobacterium nucleatum* は主要な歯周病原菌の一つである。偏性嫌気性である *F. nucleatum* は、紡錘状のグラム陰性桿菌であり、口腔衛生状態が不良な者や慢性歯周炎患者の口腔内から高頻度に分離される。歯周病は、歯を喪失する最も大きな要因になるだけでなく、近年では糖尿病、動脈硬化および呼吸器疾患など、さまざまな全身疾患の誘因としても注目されている。特に肺炎や慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease : COPD）などの呼吸器疾患は、多くの臨床研究により歯周病との関連が報告されている。COPD は、これまで慢性気管支炎や肺気腫と呼ばれてきた疾患の総称であり、近年 COPD による死亡者数が増加している。現在では世界の死因第3位となっており、世界的にその対策が喫緊の課題となっている。COPD は、細菌やウイルス感染をきっかけに増悪し、症状や QOL を悪化させる。COPD 増悪時は、肺への炎症細胞浸潤、炎症性サイトカインや肺胞破壊因子（マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、perforin など）の産生誘導および粘液の過剰分泌、さらには肺気腫が進行する。増悪を繰り返すことで呼吸機能が低下し、生命予後が悪化することから、COPD の増悪を予防することは重要である。これまでの臨床研究により、重度の歯周病罹患者はそうでない者に比べ、COPD を発症する割合が 3.5 倍高いことや、歯周病の治療を行うことにより COPD の症状が改善することなどが報告されている。さらに、COPD 増悪患者の喀痰では *F. nucleatum* に対する抗体価が顕著に上昇しているのみならず、重症 COPD 患者の喀痰では *Fusobacterium* 属の細菌数が多く検出されることも示されている。したがって、*F. nucleatum* が COPD の増悪に影響を及ぼしていると考えられるものの、その分子基盤は不明である。そこで本研究では、エラスターゼ誘導肺気腫モデルマウスを用いて、*F. nucleatum* の気管内投与が COPD の増悪にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

実験には、マウス（C57BL/6）にブタ膵臓エラスターゼを気管内へ投与し、3週間飼育することにより作製した肺気腫モデルマウスを用いた。肺気腫モデルマウスおよびコントロールマウスに加熱殺菌した *F. nucleatum*（ATCC25586 株）を 1×10^8 CFU もしくは PBS を 7 日間連続で気管内へ投与し、最終投与後 1, 3, 7, 42 日目に解析した。気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid : BALF）中の炎症細胞数は、塗抹標本を Giemsa 染色することにより計測した。また、肺から RNA を抽出し、real-time PCR 法により炎症性サイトカイン（TNF, IL6, CXCL1, CXCL5, CCL2, CXCL10）、プロテアーゼ（MMP12, MMP2）およびムチン（MUC5AC）の遺伝子発現状態を調べた。さらに、肺組織中の MMP12 と BALF 中の perforin のタンパク質発現状態を Western Blotting 法により検討した。肺胞腔の大きさを測定するために、肺組織切片を作製後 H-E 染色を行い、肺胞 100 個の平均肺胞間距離を計測した。肺組織における MUC5AC 発現状態は免疫染色により評価し、また粘液を産生する杯細胞の数は AB（Alcian Blue）/PAS（Periodic acid-Schiff）染色により検討した。

BALF 中の炎症細胞数を計測した結果において、肺気腫モデルマウスの *F. nucleatum* 投与群では、他の群に比べ有意に総細胞数、マクロファージ数、リンパ球数、好中球数が増加していた。炎症性サイトカインの遺伝子発現に及ぼす影響について検討した結果、最終投与後 1 日目および 7 日目における肺気腫モデルマウスへの *F. nucleatum* 投与群では、TNF の遺伝子発現が最も増加していた。一方、IL6, CXCL1, CXCL5, CCL2, CXCL10 の遺伝子発現は、*F. nucleatum* の投与により肺気腫モデルマウスおよびコントロールマウスのいずれにおいても同程度の増加を認めた。肺胞破壊因子である MMP12 および MMP2 の遺伝子発現を調べた結果、肺気腫モデルマウスにおいて *F. nucleatum* 投与群で MMP12 の遺伝子発現が最も強く誘導されたが、MMP2 の遺伝子発現は、コントロールマウスと同程度の変化

であった。また、肺における MMP12 のタンパク質発現状態および BALF 中の perforin のタンパク質発現状態は、*F. nucleatum* の投与により、肺気腫モデルマウスおよびコントロールマウスのいずれも同程度の誘導を認めた。次に平均肺胞間距離を計測した結果、肺気腫モデルマウスにおける *F. nucleatum* 投与群では平均肺胞間距離が顕著に増加しており、肺胞腔の拡大を認めた。また、*F. nucleatum* 投与群では、他の群に比べ杯細胞の数が有意に増加していた。さらに MUC5AC の遺伝子発現が有意に増加しており、免疫染色像においても顕著な MUC5AC タンパク質の発現誘導を認めた。

本研究により、肺気腫モデルマウスへの *F. nucleatum* 気管内投与は、炎症細胞の増加と、炎症性サイトカインおよび肺胞破壊因子の産生を誘導することで、肺胞腔を拡大させるのみならず、ムチンの過剰産生も促進することが明らかとなった。以上の結果は、COPD 患者の増悪時にみられる症状に類似していることから、*F. nucleatum* は COPD を増悪させる可能性を示唆している。