

論文の内容の要旨

氏名：唐 橋 幸 宏

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名： Effects of *Fusobacterium nucleatum* on disruption of tight junction in human bronchial epithelial cell layer and mouse lung

(*Fusobacterium nucleatum* がヒト気管支上皮細胞層とマウス肺のタイトジャンクション破壊に及ぼす影響)

歯周病は歯肉の炎症と歯槽骨の吸収を特徴とする慢性の炎症性疾患で、30歳以上の約7割が罹患している。歯を喪失する最も大きな要因となるだけでなく、肺炎などの呼吸器疾患、糖尿病、及び低体重児出産など様々な全身疾患の誘因となることもわかってきた。したがって、歯周病予防は口腔の健康のみならず全身の健康維持にも重要との考え方が広まっている。特に喫煙性肺炎や慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) に代表される呼吸器疾患と歯周病との関連を示す臨床研究は多く報告されており、4 mm 以上の歯周ポケットが 10 歯以上ある人は、歯周ポケットが正常な人に比べ肺炎により死亡する危険性が約 4 倍高いことや、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 倍高いことなどが示されている。一方、口腔健康管理が呼吸器疾患予防に有効であることもわかっており、周術期や高齢者施設等において呼吸器疾患予防を目的とした口腔衛生管理と口腔機能管理が積極的に行われている。

最近、歯周病原菌が呼吸器疾患の発症と進行に及ぼす影響が分子レベルで解明されつつある。これまでに、*Fusobacterium nucleatum* や *Porphyromonas gingivalis* などが呼吸器上皮細胞に作用し、炎症性サイトカインの産生と肺炎起因菌の受容体発現を誘導することや、ムチンの過剰産生を引き起こすことが報告されている。呼吸器上皮細胞に局在するタイトジャンクションは、上皮細胞同士を機械的に繋ぐことでバリアを形成し、細菌やその病原因子およびウイルスの侵入を防ぐなど、感染防御において重要な役割を果たしている。肺炎や COPD 罹患患者では、炎症性サイトカインや酸化ストレス等が呼吸器上皮細胞のタイトジャンクションを破壊する結果、細菌やウイルスの 2 次感染が起こり、呼吸器疾患が重症化することが知られている。しかし、細菌感染が呼吸器上皮のタイトジャンクションに及ぼす影響はわかっていない。

そこで本研究では、歯周病原菌が呼吸器上皮のタイトジャンクション機能に影響を及ぼしているのではないかと推察し、気管支上皮細胞およびマウスを用いて実験を行った。

実験には、気管支上皮細胞株 (16HBE 細胞) とヒト気管支由来のプライマリー上皮細胞に、*F. nucleatum* (ATCC 25586 株) を添加することで行った。はじめに、上皮組織における細胞間結合の強さを調べるために、二層構造のトランスウェルプレートを用い、上層に細胞を下層には培地のみを用意し、上層と下層の経上皮電気抵抗値 (transepithelial electric resistance: TER) を 3 日間測定した。TER は、バリア機能を評価する指標として用いられている。TER 測定後、プレート上層に蛍光標識したデキストランを滴下した後、下層に透過するデキストラン量を吸光度計 (OD: 535 nm) にて測定することにより、実際にタイトジャンクションが破壊されているか否かを検討した。気管支上皮細胞のタイトジャンクション形成にかかわる遺伝子とその相互作用を網羅的に検索するために、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway Database 内の tight junction reference pathway から入手したデータセットと、ソフトウェア Cytoscape (NIH) を用いてコンピュータシミュレーション解析を行った。本解析で判明したタイトジャンクション形成に関わる遺伝子への *F. nucleatum* の影響は、細胞抽出液を回収した後に real-time PCR 法にて検討した。また、マウスの呼吸器に対する影響を調べるために、C57BL/6 マウスをイソフルランにて麻酔後、*F. nucleatum* (1×10^8 CFU) もしくは PBS を気管内に 3 日間連続投与した。その後、蛍光標識されたデキストランを気管内投与し、1 時間後にマウスの血液と肺を回収、血液においてはデキストラン透過性を、肺においては遺伝子発現を検討した。さらに、肺胞の破壊程度を調べるために、肺組織切片を作成後 H-E 染色を行い、肺胞 50 個の平均肺胞間距離を測定することにより、肺胞腔の大きさを定量した。

実験の結果、*F. nucleatum* は菌量依存的に 16HBE 細胞の TER を低下させることがわかった。プライ

マリー気管支上皮細胞においても同様の結果が得られたことから、*F. nucleatum* は気管支上皮においてタイトジャンクション機能を減弱させていることが示唆された。そこで、デキストラン透過性解析を行った結果、*F. nucleatum* 添加群においては、16HBE 細胞におけるデキストランの透過性が大幅に亢進したことから、実際にタイトジャンクションが破壊されていることが明らかとなった。次に、KEGG Pathway Database と Cytoscape を用いたシミュレーション解析から、気管支上皮細胞においては、claudin1 (CLDN1), ZO-1, ZO-2, occludin, E-cadherin および junctional adhesion molecule A (JAM-A) などが、タイトジャンクションの構成や細胞間結合に重要な役割を演じていることがわかった。そこで、*F. nucleatum* がこれら遺伝子に及ぼす影響を調べた結果、*F. nucleatum* は特に CLDN1, JAM-A, ZO-2 および occludin の遺伝子発現を有意に低下させた。*F. nucleatum* を気管内投与したマウスの肺においても、CLDN1 と JAM-A の遺伝子発現の低下が認められた。さらに、*F. nucleatum* 投与マウス肺では、好中球の浸潤とともに肺胞腔の拡大が認められた。デキストランの誤嚥実験においても、*F. nucleatum* 投与群においては、血清中に大量のデキストランが漏洩していることが認められたことから、*F. nucleatum* は実際にマウス肺のタイトジャンクションを破壊していることがわかった。

以上の結果より、*F. nucleatum* は CLDN1 や JAM-A などの遺伝子発現を抑制させることにより、呼吸器上皮のタイトジャンクションを破壊していることが初めて明らかとなった。肺におけるバリア機能の低下は、肺炎起因菌や COPD を増悪させる呼吸器ウイルスのさらなる感染を招く。本研究から、歯周病原菌の誤嚥が、肺のバリア機能の低下を介して呼吸器疾患の重症化に影響を及ぼしていることが示唆された。