

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍)	川村直矢(千葉県)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	甲第499号
学位授与年月日	平成31年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学位論文題目	Effects of chronic <i>Porphyomonas gingivalis</i> lipopolysaccharide infusion on skeletal muscles in mice (<i>Porphyomonas gingivalis</i> 由来 LPS 慢性投与がマウスの骨格筋に及ぼす影響) The Journal of Physiological Sciences 第69巻 第3号 503頁～511頁掲載 2019年3月8日発行
論文審査委員	主査 教授 河原 博 副査 教授 五味 一博 副査 教授 山越 康雄

内容の要旨

【背景】

歯周病は歯周病原細菌によって引き起こされる感染性炎症疾患として知られている。歯周炎は歯と歯周組織の付着機構の破壊をもたらし深い歯周ポケットが形成される。その環境下に存在するグラム陰性嫌気性細菌の細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖は宿主の炎症反応を引き起こし、全身性の炎症負荷及び糖尿病、心筋梗塞、肺疾患などの関連性について多くの報告がある。近年、米国疾病対策予防センター(CDC)によると、65歳以上の成人では、有病率が70.1%増加し、高齢者では歯周炎が遍在していることが示されている。さらに加齢に関連した炎症は、骨格筋の大きさ及び機能低下(サルコペニア)と関連しており、自立性の低下及び生活の質の低下を伴う。骨格筋の炎症で炎症性サイトカイン(TNF- α)及びIL-6は循環LPSによって強く誘導され、高齢者では上昇する。重要なことに、TNF- α 及びIL-6の血清レベルもまた、歯周炎において増加する。しかしながら、主要な歯周病原因子である*Porphyomonas gingivalis*(PG)に由来するLPSの持続的な曝露における骨格筋の影響についての報告はなかった。

【目的】

PG-LPS慢性投与がサルコペニアの発生に重要な役割を果たすかもしれないと仮説し、歯周病患者の循環LPSレベルと同等の用量でPG-LPS腹腔内投与を行い、骨格筋への影響を組織学的及び分子生物学的に解析を行うこととした。

【材料と方法】

雄マウス(C57BL6/J, 8週齢)を用いてPBS投与群(Control)と*Porphyomonas gingivalis*由来のlipopolysaccharide(PG)投与群(PG-LPS; 0.8 mg/kg/day: 腹腔内投与)を4週間行った。体重、餌、水摂取量を計測し4週間後、咬筋(MA)、前脛骨筋(TA)、ヒラメ筋(SOL)を摘出し、筋重量(筋重量/前脛骨長比(tibia; mg/mm))、HE染色により筋線維周径(CSA)、Masson-trichrome染色により線維化面積(%), TUNEL染色によりアポトーシス陽性細胞率(%)を測定した。さらにウエスタンブロッディング法にて関連シグナルの解析を行った。

【結果】

① PG-LPS慢性投与後、体重はControl群と比較しPG-LPS投与(Control ($n=6$) vs. PG-LPS ($n=6$): $P=27.5\pm 0.8$ g vs. 26.8 ± 0.7 g, $P=\text{not significant (NS)}$)に有意差は認めなかった。また、水及び餌摂取量に有意差は認められなかった。次に、咬筋(MA)、前脛骨筋(TA)、ヒラメ筋(SOL)の筋重量の解析を行った結果、速筋型である咬筋(Control ($n=5$) vs. PG-LPS ($n=5$): 7.7 ± 0.3 mg/mm vs. 6.3 ± 0.3 mg/mm, $P<0.01$)及び前脛骨筋(Control ($n=5$) vs. PG-LPS ($n=5$):

3.5±0.08 mg/mm vs. 3.2±0.09 mg/mm, $P < 0.01$) では有意に筋線維断面面積の減少を認めた。一方、遅筋型であるヒラメ筋 (Control ($n=6$) vs. PG-LPS ($n=5$): 0.54±0.04 mg/mm vs. 0.58±0.03 mg/mm, $P=NS$) においては有意差は認められなかった。これらの結果から、PG-LPS 慢性投与において咬筋、前脛骨筋のような速筋型に対しては筋委縮を誘発するが、ヒラメ筋のような遅筋型には影響しない可能性が示唆された。

② HE 染色を行い、筋線維断面面積 (CSA) の測定を行った結果、速筋型である咬筋 (Control ($n=5$) vs. PG-LPS ($n=5$): 1663.8±60.8 μm^2 vs. 1470.3±58.8 μm^2 , $P < 0.05$) 及び前脛骨筋 (Control ($n=4$) vs. PG-LPS ($n=4$): 1710.7±41.7 μm^2 vs. 1535.6±46.6 μm^2 , $P < 0.05$) では有意に筋線維断面面積は減少を示したのに対し、遅筋型であるヒラメ筋 (Control ($n=6$) vs. PG-LPS ($n=6$): 1332.1±50.4 μm^2 vs. 1416.8±39.1 μm^2 , $P=NS$) には筋重量と同様の結果を示した。これらの結果から、速筋型の咬筋、前脛骨筋に対しては、筋重量と同様に筋委縮を誘導し、遅筋型であるヒラメ筋では変化は認められなかった。

③ PG-LPS 慢性投与における咬筋、前脛骨筋及びヒラメ筋に対し線維化面積を定量するため Masson-trichrome 染色を用いて解析を行った。咬筋 (Control ($n=6$) vs. PG-LPS ($n=6$): 2.5±0.2 μm^2 vs. 4.3±0.3 μm^2 , $P < 0.05$) は有意に線維化面積の増加を示したが、前脛骨筋及びヒラメ筋 (TA: Control ($n=6$) vs. PG-LPS ($n=6$): 1.8±0.3 μm^2 vs. 2.1±0.2 μm^2 , $P=NS$; SOL: Control ($n=6$) vs. PG-LPS ($n=6$): 2.2±0.2 μm^2 vs. 2.4±0.5 μm^2 , $P=NS$) は有意差はなかった。これらの結果から、速筋型においても、下肢の骨格筋と比較し、咬筋の方がより PG-LPS に感受性が高いことが示唆された。さらに、線維化亢進を認めた咬筋において、TUNEL 染色を用いて、アポトーシス陽性細胞率の測定を行った結果、咬筋 (Control ($n=6$) vs. PG-LPS ($n=6$): 0.9±0.06 % vs. 7.3±0.8 %, $P < 0.01$) で有意な増加を示した。

次に咬筋における組織学的影響を示した関連シグナルの解析をウエスタンブロッティング法を用いて解析を行った。

① 線維化関連因子である ERK1/2 は PG-LPS 慢性投与後、咬筋において有意にリン酸化亢進を認めた。この結果は PG-LPS 慢性投与が誘導した線維化及びアポトーシスは局所的ではあるが、ERK シグナルの活性化を介して、誘導される可能性が示唆された。

② 次に骨格筋の生理学的恒常性の維持に重要な役割を果たしている咬筋のオートファジーについて解析を行った。PG-LPS 慢性投与において、オートファゴソームのマーカーである LC3-II の発現は Control 群と比較し PG-LPS 投与群 (Control ($n=4$) vs. PG-LPS ($n=4$): 100±10.5 vs. 58.8±7.2%, $P < 0.05$) では有意に減少を示した。このことから、咬筋におけるオートファジーの活性化が PG-LPS 慢性投与によって局所的に抑制される可能性があることを示唆している。

③ Akt/mTOR シグナル伝達経路はオートファジーの抑制に重要な役割を果たしているため、Akt/mTOR シグナル伝達経路の解析を行った。Akt のリン酸化レベルは Control 群と比較し、PG-LPS 投与群 (Control ($n=6$) vs. PG-LPS ($n=6$): 100±15.5% vs. 142.5±11.0%, $P < 0.05$) では有意にリン酸化亢進を認めた。次に p70S6K のリン酸化レベルは Control 群と比較し、PG-LPS 投与群 (Control ($n=6$) vs. PG-LPS ($n=6$): 100±13.2 vs. 170.4±27.8%, $P < 0.05$) では有意にリン酸化亢進をみとめ、4E-BP1 のリン酸化レベル (Control ($n=5$) vs. PG-LPS ($n=5$): 100±20.4 vs. 210.4±40.4%, $P < 0.05$) も同様な結果を示した。これらの結果は、Akt/mTOR シグナル伝達の活性化が、慢性 PG-LPS 曝露中のオートファジーの阻害を介した咬筋のリモデリングに重要な役割を果たしている可能性があることを示唆している。

【考 察】

本研究では、歯周病患者の循環レベルと一致する PG-LPS 投与量でマウスの速筋型である咬筋及び前脛骨筋、遅筋型であるヒラメ筋に及ぼす影響を検討した。筋委縮は速筋型の骨格筋で有意に誘導されたが、遅筋型では誘導されなかった。さらに、線維化及び筋細胞アポトーシスのような組織学的異常は、Control 群と比較して咬筋で有意な増加を認めたが、前脛骨筋及びヒラメ筋では有意で認められなかった。近年、咬筋の機能は歯周炎の重症度と密接に関連していると報告されている。本研究の結果は、PG-LPS 誘発性筋萎縮を誘導する感受性が速筋に特異的であり、飢餓や筋疲労、敗血症及び急性糖尿病などによる筋委縮と同様の傾向が確認された。興味深いことに速筋型でも前脛骨筋に比較して咬筋では PG-LPS に対する感受性が高いことが本研究で示唆された。咬筋では PG-LPS 投与により線維化領域が有意に増加傾向を示した。またオートファジーは、骨格筋量を維持するために重要な役割を担っており、不十分なオートファジーは、筋機能に影響を及ぼす機能不全のミトコンドリアの蓄積をもたらす可能性がある。咬筋ではオートファジーマーカーである LC3-II タンパク質の発現が有意に減少し、さらに、Akt-mTOR 経路 (骨格筋細胞における自食作用の負の制御因子) が、PG-LPS 投与群の咬筋において有意に増加したことを示した。歯周炎は、様々な口腔内細菌によって引き起こされ、成人における歯の損失の主な原因の一つであり、多数の全身性疾患の進行を導くことが知られている。本研究は、PG-LPS への持続的な無症候性の曝露が、速筋型

骨格筋において萎縮を誘発するが、遅筋型骨格筋では誘導されないことが示唆された。さらに重要なことに、咬筋は他の筋肉と比較してPG-LPSに対する感受性が高いことも示された。これらの結果は、歯周病が口腔内サルコペニアの発症の主要な原因の1つである可能性を示唆している。

審査の結果の要旨

歯周ポケットに存在するグラム陰性嫌気性細菌の細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖（LPS）は、全身性の炎症負荷、及び糖尿病、心筋梗塞、肺疾患などの発症との関連性が報告されている。骨格筋量と骨格筋力の低下（サルコペニア）は、高齢者の自立性の低下、生活の質の低下につながるが、LPSとサルコペニアの関連性については明らかとなっていない。本研究は、歯周病原因菌である *Porphyromonas gingivalis* (PG) に由来する LPS (PG-LPS) のサルコペニア発症への関与について検討している。

その結果、雄性 C57BL/6/J マウスへの、歯周病患者の血液中濃度と同等レベルとなる PG-LPS の4週間腹腔内投与によって、速筋型骨格筋である咬筋と前脛骨筋の筋萎縮が誘導され、遅筋型骨格筋であるヒラメ筋では筋萎縮が誘導されないこと、さらに、筋の線維化及び筋細胞アポトーシスは、咬筋で増加するのに対し、前脛骨筋及びヒラメ筋では増加しないことを明らかとした。また咬筋では、オートファジーマーカーである LC3-II タンパク質の発現が減少し、骨格筋細胞におけるオートファジーの抑制制御因子である Akt/mTOR 経路が活性化することも明らかとした。これらの結果から、咬筋は、他の筋肉と比較して PG-LPS に対する感受性が高く、歯周病が、口腔サルコペニア発症原因の一つである可能性が示唆された。

本研究は、口腔サルコペニア発症機序解明に寄与する研究と考えられた。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文としての価値を有するものと判定した。