

歯周病が低体重児出産に及ぼす影響のメカニズム解明

Elucidation of the mechanism of the effect of periodontal disease on low birth weight deliver

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験センター 主任研究官 堀 武志
(前：東京科学大学生体材料工学研究所 診断治療システム医工学分野 助教)

要 約

歯周病は、早産や低出生体重児の出産などのリスク因子であることが疫学的に知られているが、その詳細なメカニズムには不明な点が多い。このメカニズムの一つとして、血中に移行した歯周病原細菌が胎盤に到達し、影響を及ぼす経路が考えられている。しかし、ヒトの胎盤は実験動物と構造や機能が大きく異なるため、動物実験の結果をヒトへ直接外挿することは困難であり、ヒト細胞を用いた適切な評価モデルの欠如が研究の障壁となっていた。本研究では、ヒト胎盤に由来するヒト栄養膜幹細胞（TS細胞）およびTS細胞から作製したヒト胎盤オルガノイドを用いて、主要な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* がヒト胎盤組織に及ぼす影響とその分子メカニズムを解析した。まず、TS細胞の平面培養系（2D）において *P. gingivalis* を曝露したところ、菌量依存的な細胞増殖抑制効果が認められた。この抑制効果は、加熱死菌では消失したことから、LPSなどの耐熱性因子ではなく、菌体由来のタンパク質性因子の関与が示唆された。次に、胎盤の絨毛構造を模倣し、表面にバリア機能（合胞体性栄養膜細胞層）を有する3次元胎盤オルガノイドに対して *P. gingivalis* を曝露した。その結果、オルガノイド表面のバリア細胞層および微絨毛の顕著な破壊が観察された。この組織傷害性のメカニズムを解明するため、遺伝子欠損株および阻害剤を用いた解析を行った。その結果、タンパク質分解酵素であるジンジパインを欠損した *P. gingivalis* 株においては組織傷害性が消失し、特にアルギニン特異的ジンジパイン（Rgp）の阻害剤（KYT-1）がバリア破壊を有意に抑制した。また、接着に関与する線毛（FimA）の欠損株でも毒性が減弱した。以上の結果より、血流を介して胎盤に到達した *P. gingivalis* は、線毛を介して胎盤組織に付着し、プロテアーゼである Rgp によって胎盤バリアを直接的に破壊することで、胎盤機能不全や胎児の発育遅延を引き起こす可能性が示唆された。

緒 言

胎盤は胎児の発育に必要な栄養や酸素を供給すると同時に、母体血中の薬物、環境化学物質、病原体などから胎児を守るバリア機能を有している極めて重要な臓器である。胎盤機能の破綻は、胎児の発育不全や先天性異常に繋がる。歴史的にはサリドマイド薬害事件などが知られており、胎盤を介した物質輸送や毒性の評価は次世代の健康を守る上で必須の課題である。

一方で、歯周病は成人の有病率が高い慢性の炎症性疾患であり、近年、糖尿病や心疾患などの全身疾患との関連が注目されている。産科領域においても、歯周病は早産や低出生体重児の出産のリスク因子であることが疫学研究や動物実験により示されている。その機序として、歯周組織で産生された炎症性

サイトカインによる間接的な作用に加え、歯周病原細菌が血流に乗って胎盤へ移行し、直接悪影響を引き起こす可能性が想定されている。実際に、低出生体重児の出産時の胎盤から *Porphyromonas gingivalis* 等のDNAが検出されたケースが報告されている。

しかしながら、歯周病原細菌がヒトの胎盤に与える影響の詳細は未解明なままである。その最大の理由は、ヒト胎盤が齧歯類等の実験動物と構造的・機能的に大きな種差を持つことにある。また、従来の研究で使用されてきたヒト絨毛癌由来の細胞株は、生体内の正常な栄養膜細胞とは性質が大きく異なるため、得られた知見の信頼性には限界があった。

2018年に、東北大学医学部のグループが、ヒト胎盤（栄養膜）幹細胞（TS細胞）を世界で初めて樹立した¹。我々はこのグループと共同で研究を進め、TS

細胞を用いて、生体内の胎盤絨毛構造を模倣した3次元のヒト胎盤オルガノイドの開発に成功した²。このオルガノイドは、外層に分化した合胞体性栄養膜細胞（バリア細胞）、内層に未分化な細胞性栄養膜細胞を有し、バリア細胞の表面には微絨毛が発達しているという、生体絨毛に類似した特徴を持っている。本研究では、これらの2Dと3Dのヒト胎盤モデルを用いて、主要な歯周病原細菌である *P. gingivalis* がヒト胎盤細胞に及ぼす影響を調べ、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

方法

1. 倫理的配慮

ヒトTS細胞は、東北大学医学部倫理委員会の承認を得て樹立されたものを使用した。

2. 細胞培養とオルガノイド作製

ヒトTS細胞は既報¹に基づき維持培地（0.15% BSA, 50 units/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 1% ITS-X, 1% KSR, 0.2 mM L-ascorbic acid, 2.5 μ M Y-27632, 25 ng/mL EGF, 0.8 mM VPA, 5 μ M A83-01, and 2 μ M CHIR99021, 0.25 μ g/mL iMatrix-511を含むDMEM/F12培地）を用いて培養した。

胎盤オルガノイドは、アガロース製マイクロウェルプレートを用いた3次元培養法により作製した。具体的には、1ウェルあたり約400個の細胞を播種し、3種類の分化誘導培地²にて8日間培養することで、表面にバリア機能を有する均一なオルガノイドを得た。

3. 細菌株と培養

歯周病原細菌として *P. gingivalis*（野生株 ATCC 33277、ジンジパイン欠損株、FimA欠損株）および、対照として *P. gingivalis* よりも毒性の低いことが知られている *Fusobacterium nucleatum* を用いた。細菌は嫌気条件下で培養し、実験に使用した。

4. 細菌の曝露実験

4-1)2D培養実験： 24ウェルプレートの各ウェルで平面培養したTS細胞に対し、 $1 \times 10^2 \sim 10^8$ /wellの *P. gingivalis* を添加し低酸素条件下で培養した。細菌と共培養をする際は、抗生物質を含まない培地を使用した。曝露24~72時間後の生細胞数をCalcein AM染色し、画像解析により定量評価した。また、加熱処理（76℃、1時間）によりタンパク質を変性さ

せた *P. gingivalis* を用いた比較実験も行った。

4-2)3Dオルガノイド実験： 8日間の培養により12ウェルプレート内に作製したヒト胎盤オルガノイドに対し、 $2.6 \times 10^2 \sim 10^8$ /well濃度で *P. gingivalis* を添加し48時間共培養した（細胞あたりの菌体曝露量を統一するため、2D実験で使用した菌体量の2.6倍量を用いた）。固定後、凍結切片を作製し、バリア細胞マーカー（SDC1）および未分化TSマーカー（E-cadherin）の免疫染色を行った。また、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いてオルガノイド表面の微細構造変化を観察した。

5. 阻害実験

P. gingivalis の主要な病原因子であるジンジパインの影響を調べるため、 $2.6 \times 10^2 \sim 10^4$ /wellの *P. gingivalis* 処理時に、アルギニン特異的ジンジパイン（Rgp）阻害剤（KYT-1, 20 μ M）あるいはリジン特異的ジンジパイン（Kgp）阻害剤（KYT-36, 20 μ M）で同時に処理した。

48時間後に、オルガノイドの形態変化（バリア破壊の有無）を定量的に評価した。

結果

1. TS細胞（平面培養）の増殖への影響

2D平面で培養した未分化なTS細胞に対し *P. gingivalis* を曝露した結果、菌体量および時間依存的に細胞増殖が有意に抑制された（図1）。わずか100個程度の少数の菌数であっても、48時間後には顕著な増殖抑制が認められた。一方、*F. nucleatum* の曝露では、極めて高濃度（ 10^8 cells/well）の曝露条件を除き、増殖抑制効果は観察されなかった。

増殖抑制に寄与する *P. gingivalis* 由来の因子の特性を調べるため、加熱処理した菌体を用いたところ、増殖抑制効果は完全に消失した。LPS (lipopolysaccharide) は耐熱性であることから、増殖抑制にはLPSではなく、熱に不安定なタンパク質性の因子が関与していることが示唆された。

2. 3Dヒト胎盤オルガノイドへの影響

胎盤オルガノイドに対し *P. gingivalis* 野生株を曝露した結果、濃度依存的にオルガノイドの構造が破壊された。免疫染色による解析では、コントロール群（細菌曝露無し）で見られたオルガノイド最外層のSDC1陽性バリア細胞層（合胞体性栄養膜細胞層）が、*P. gingivalis* 曝露群では断裂あるいは消失して

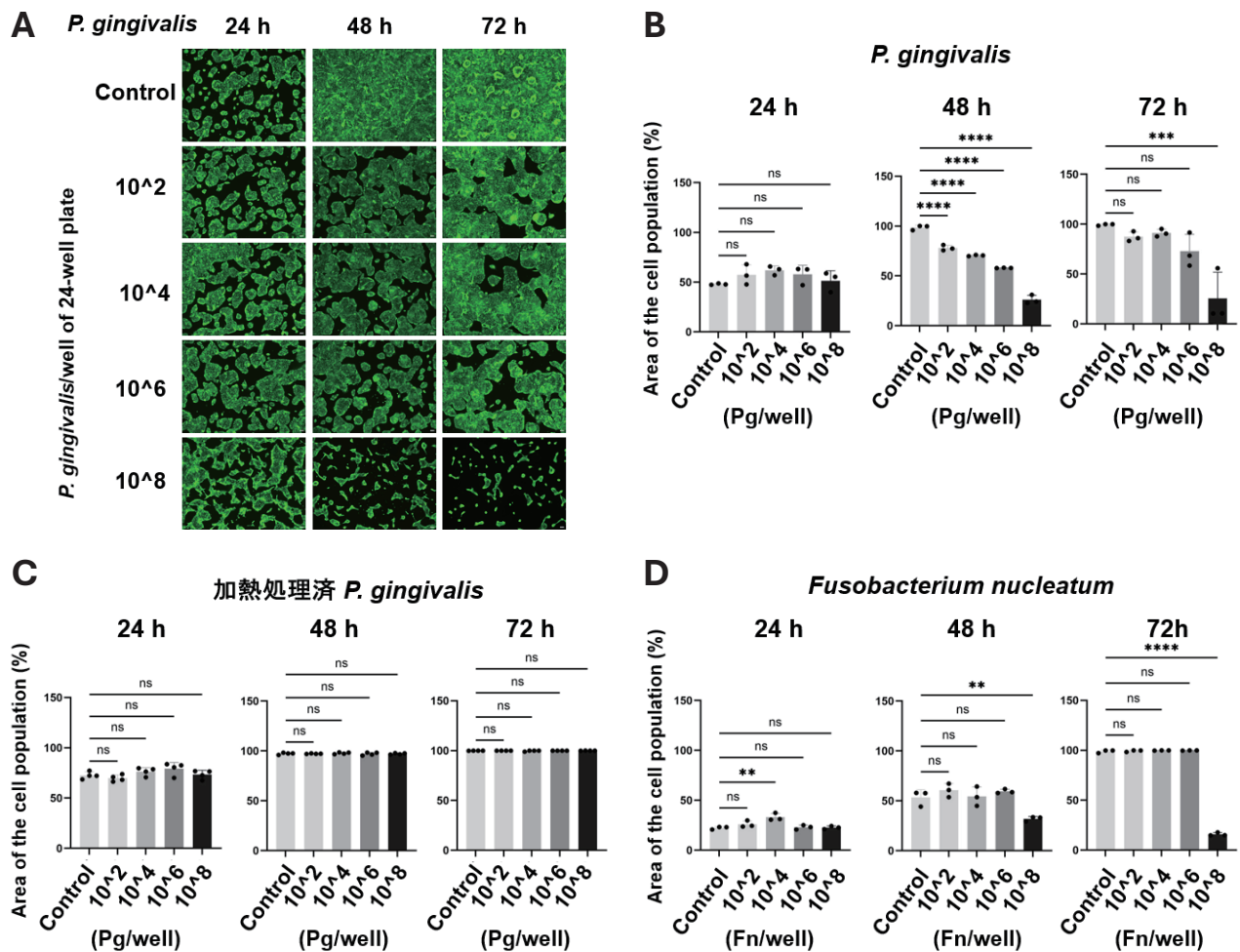


図1 ヒト栄養膜幹細胞 (TS細胞) に対する*P. gingivalis*曝露の影響

(A) 24ウェルプレートの各ウェルへTS細胞を播種した。24時間後、*P. gingivalis*に24~72時間曝露した。生細胞をCalcein-AMで染色し、蛍光顕微鏡により観察した。(B-D) 単位面積あたりのTS細胞が占める割合を定量化した。生存した*P. gingivalis*を使用した条件(B) (図1Aを定量化したもの)、加熱処理済*P. gingivalis*を使用した条件(C)、比較対象として*Fusobacterium nucleatum*を用いた条件(D)において面積の割合を解析した。Dunnett検定: not significant (ns), $P \geq 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

いた (図2)。SEMによる微細構造観察では、正常なオルガノイド表面に密生している微絨毛が、細菌曝露により脱落・破壊されている様子が確認された。

3. 分子メカニズムの解明

バリア細胞の破壊を引き起こす因子を特定するため、遺伝子改変*P. gingivalis*株および阻害剤を用いた解析を行った。

3種類のジンジパイン遺伝子 (rgpA, rgpB, kgp) を全て欠損させた変異株を曝露した結果、野生株で見られたようなオルガノイドの形態異常およびバリア破壊は観察されなくなった (図3)。これにより、ジンジパインがバリア細胞破壊の主因であることが明らかとなった。

次に、RgpおよびKgpのそれぞれの特異的阻害剤を用いた実験を行った。その結果、Rgp阻害剤 (KYT-1) を添加した群において、バリア破壊が著し

く抑制されたのに対し、Kgp阻害剤 (KYT-36) の効果は限定的であった。これにより、特にアルギニン特異的ジンジパイン (Rgp) がバリア層の破壊に中心的な役割を果たしていることが示唆された。

さらに、菌体表面の主要な線毛であるFimAを欠損させた*P. gingivalis*株 (Δ FimA) を用いた実験では、野生株と比較してオルガノイドへの傷害性が減弱した。FimAは接着に関与することが報告されていることから、*P. gingivalis* はFimAを介して胎盤細胞に付着することで、Rgpによる局所的なタンパク質分解と細胞破壊を効率的に行っている可能性が示唆された。

考 察

本研究では、ヒト胎盤オルガノイドを用いることで、歯周病原細菌*P. gingivalis* がヒト胎盤細胞 (栄養膜細胞) に対して直接的な破壊作用を持つことを、

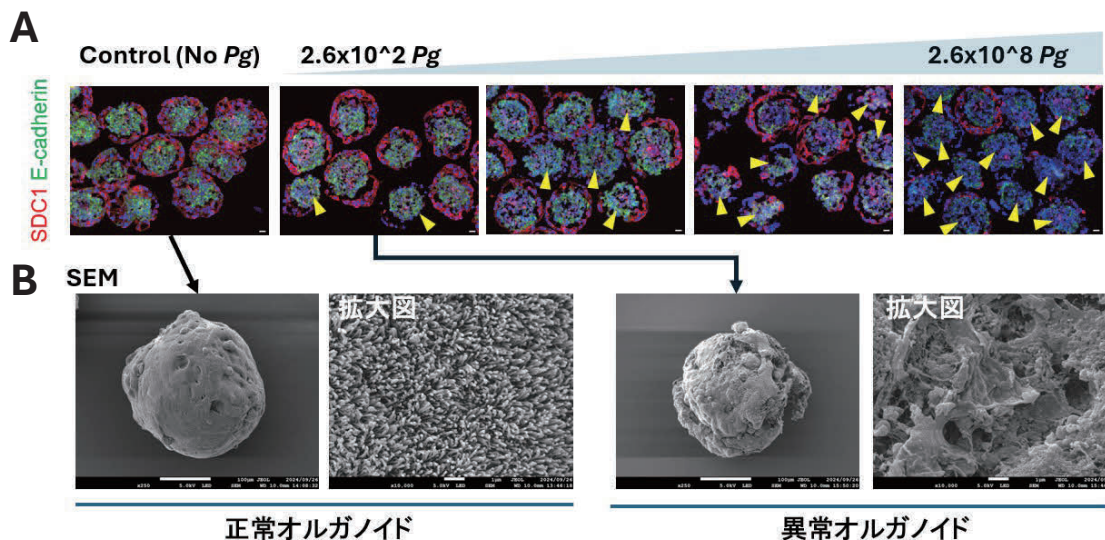


図2 ヒト胎盤オルガノイドに対する*P. gingivalis*曝露の影響
 (A) 胎盤オルガノイド切片サンプルの免疫染色結果。黄色の矢印: *P. gingivalis* (Pg)によりバリア細胞が破壊された異常オルガノイド。赤: SDC1(バリア細胞マーカー)、緑: E-cadherin、青: ヘキスト(核)。
 (B) 走査型電子顕微鏡(SEM)を用いてオルガノイド表面を解析した結果。

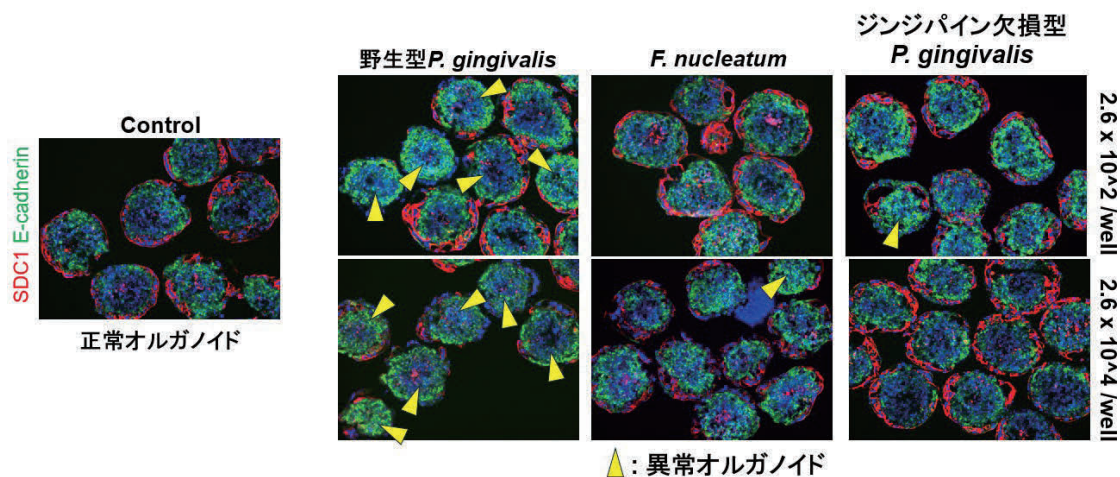


図3 *P. gingivalis*によるバリア細胞の破壊におけるジンジパインの関与
 野生型*P. gingivalis*、*F. nucleatum*、ジンジパイン欠損型*P. gingivalis*を使用した結果。Controlは菌体無し。赤: SDC1(バリア細胞マーカー)、緑: E-cadherin、青: ヘキスト(核)。黄色矢印は異常オルガノイドを示す。

ヒトTS細胞由来のオルガノイドを用いて実証することができた。

2D培養の結果から、*P. gingivalis*は未分化な栄養膜細胞の増殖を抑制することが示された。これは、未分化な栄養膜細胞が絨毛に多く存在する胎盤形成初期において、細菌感染が絨毛の発達そのものを阻害する可能性を示唆していた。

3Dオルガノイドを用いた解析では、*P. gingivalis*が胎盤のバリア機能の中核を担う合胞体性栄養膜細胞層を破壊することが示唆された。この破壊過程において、菌体表面の線毛(FimA)による細胞への接着と、プロテアーゼであるジンジパイン(特にRgp)による障害の双方が協調して働いている可能性が分子レベルで示唆された。Rgpは細胞接着分子

や細胞外マトリックスを分解することが知られており、本研究でも微絨毛表面に存在するタンパク質等が影響を受けた可能性がある。バリア細胞破壊のメカニズムについては、今後さらなる解析が必要である。

以上の結果は、妊婦の口腔内から血流を介して*P. gingivalis*が胎盤に到達した場合、胎盤絨毛の形成不全やバリア機能の破綻を惹起する可能性があることを示唆していた。これにより、*P. gingivalis*が胎児への栄養供給不全等に関与し、結果として低出生体重児の出産や早産のリスク要因の一つとなりうる可能性がある。

本研究で確立したヒト胎盤オルガノイドによる細菌曝露評価系は、従来の動物実験では評価困難で

あったヒト特異的な応答を再現可能であり、ヒト胎盤に関連する疾患メカニズムの理解を一層深めるうえで、今後も有用であるものと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました神澤医学研究振興財団並びに関係者の皆様に、心より御礼申し上げます。また、*Porphyromonas gingivalis*の野生株・変異株および*Fusobacterium nucleatum*の使用に際し、ご支援を賜りました東京

科学大学口腔生命医科学分野の片桐さやか先生、大杉勇人先生、ならびに東京科学大学細菌感染制御学分野の鈴木 敏彦先生、岡野 徳壽先生に、心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Okae H, Toh H, Sato T, et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2018;22(1):50-63.e6.
2. Hori T, Okae H, Shibata S, et al. Trophoblast stem cell-based organoid models of the human placental barrier. *Nat Commun*. 2024;15(1):962.

Abstract

Periodontal disease has been recognized as a risk factor for adverse pregnancy outcomes, including low birth weight and preterm birth. However, the precise mechanisms underlying this association remain unclear. One proposed mechanism is that periodontal pathogenic bacteria translocate into the bloodstream, reach the placenta, and directly exert detrimental effects. Moreover, substantial interspecies differences in placental structure and function limit the translational relevance of animal models for elucidating these mechanisms. In this study, we evaluated the effects of *Porphyromonas gingivalis*, a major periodontal pathogen, on human placental cells using human trophoblast stem (TS) cell-derived placental organoids. In 2-dimensional cultures, exposure to *P. gingivalis* suppressed TS cell proliferation in a dose-dependent manner. This effect was abolished by heat inactivation of the bacteria, implicating heat-labile protein factors. In 3-dimensional placental organoids, *P. gingivalis* exposure caused significant disruption of the outer syncytiotrophoblast (ST) barrier layer and loss of microvilli. Using gingipain-deficient mutants and specific inhibitors, we identified arginine-specific gingipains (Rgp) as the primary drivers of this ST damage. Furthermore, a FimA-fimbriae deficient mutant exhibited reduced toxicity, implicating that bacterial adhesion via fimbriae facilitates the damage. These findings suggest that *P. gingivalis* translocation to the placenta can directly impair placental villous tissue through proteolytic degradation, potentially contributing to adverse birth outcomes. Our study underscores the utility of human placental organoids for investigating pathogen-placenta interactions.