

令和元年6月13日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11841

研究課題名(和文) 多因子性疾患の視点から探る歯周炎の宿主制御による新規治療法の探索

研究課題名(英文) Periodontitis as a multifactorial disease: Investigation on the novel host regulation therapy

研究代表者

齋藤 淳 (Saito, Atsushi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60266559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルコール含有E0洗口液は、ヒト歯肉上皮細胞の増殖能、遊走能を阻害しなかった。アルコール非含有E0洗口液については増殖能の低下という影響が認められた。

Porphyromonas gingivalis Hgp44においてTreponema denticolaとの付着に関わる主たるドメインは、アミノ酸配列の199-316間に存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、歯周炎の治療は、機械的なブラークコントロールや抗菌薬の補助的使用が主な対応であった。今回の研究で得られた知見をさらに発展させることにより、歯周病原性バイオフィーム中の異なる細菌間の付着を阻害したり、宿主細胞との相互作用を制御することによる新たな治療法開発の足がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：A mouthrinse containing essential oils and ethanol exerted no inhibitory effect on proliferation and migration of the human gingival epithelial cells.

Residues 199-316 of *P. gingivalis* Hgp44 are mainly responsible for adhesion to *T. denticola*; inhibiting this domain could potentially disrupt periodontopathic biofilm formation and maturation.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 歯周病原細菌 デンタルプラーク バイオフィーム 宿主細胞 歯肉上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、歯周炎の発症・進展メカニズムの解明に向けて、歯周病原細菌の感染と宿主応答については様々なモデルが使用され検討されてきた。応募者らは、歯周病原細菌の宿主細胞への侵入が歯周炎、さらには動脈硬化症の発症・進展に及ぼす影響を検討するために一連の研究を行ってきた。成果として、Polymicrobial 感染の条件下では、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* は単独感染とは異なるメカニズムでヒト歯肉上皮細胞および大動脈内皮細胞に侵入すること (Saito et al. FEMS Immunol Med Microbiol 2008)、宿主細胞侵入は *Fusobacterium nucleatum* の存在下において顕著に促進されることを見だし、これには、膜マイクロドメインである lipid raft が関与していることを明らかにした (Saito et al. Microb Pathog 2009, 2012)。

歯周炎の疾病概念は、細菌感染から生活習慣病、そして多因子性疾患へと変遷している (Genco and Borgnakke, Periodontol 2000 2013) が、細菌 - 宿主間の相互作用に及ぼす環境因子の影響についての検討は不足している。喫煙は、歯周病の環境面における最大のリスクファクターの一つである。これまで、環境因子としての喫煙が歯周組織の細胞機能や歯周病原細菌による宿主細胞侵入に及ぼす影響については、ほとんど明らかにされていなかった。そこで申請者らは、ニコチンおよびタバコ煙濃縮物 (cigarette smoke condensate: CSC) が、ヒト歯肉上皮細胞の機能に及ぼす影響を解析すべく研究に着手した。これまでの所、CSC は濃度により、歯肉上皮細胞の遊走能に二相性の影響を与えること、これには細胞骨格やインテグリン発現の変化が関与していることを見出した (Imamura K et al. J Periodontal Res 2015)。さらに、*P. gingivalis* 感染によりこれらの現象は修飾されることを報告した (次ページ図 1)。

近年、歯周炎の発症・進展におけるエピジェネティクスの関与が注目されており、マイクロ RNA (miRNA) による転写後修飾もその一つである。miRNA は宿主細胞において、免疫応答を含めた様々な細胞プロセスを制御している (Schwegmann and Brombacher, Sci Signal 2008)。感染症の発症・進展において、細菌が宿主の miRNA に影響を与えることから、miRNA の制御による治療法も研究されている。歯周炎やその関連疾患においても細菌因子や環境因子が宿主の miRNA の発現に関わり、病態に影響を及ぼすことが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は歯周炎を多因子性疾患の概念でとらえ、細菌、環境因子と宿主因子との複雑な相互作用の一端を明らかにし、宿主細胞を制御することによる新たな予防・治療法の開発を目指すという構想のもと、具体的には次の目的を定めて実施する。

(1) 環境因子としてのタバコ煙、細菌因子としての歯周病原細菌の複数菌感染が宿主細胞・組織の機能に及ぼす影響について明らかにする。

(2) 上記の宿主細胞の反応について、マイクロ RNA レベルで解析し、宿主側の標的遺伝子を明らかにし、それを制御することによる歯周炎の新たな治療法を検討する。

3. 研究の方法

まず、in vitro におけるヒト歯肉上皮細胞の機能に対する各種洗口液の影響について検討した。エッセンシャルオイル(EO) 配合洗口液は優れたプラークへの浸透性や付着抑制能、抗炎症作用があり、機械的清掃が及ばない部位に対する効果も報告されている。しかし、歯周組織の治癒過程への影響については明らかにされていない点が多い。そこで今回、EO 洗口液がヒト歯肉上皮細胞の機能、とくに遊走能および増殖能に及ぼす影響を検討した。ヒト歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) を 10 %FBS 添加培地にてセミコンフルエントに達するまで培養した。希釈したアルコール含有 EO 洗口液、非含有 EO 洗口液、塩化セチルピリジニウム(CPC) 配合洗口液を 60 秒間作用、洗浄、24 時間培養後、細胞遊走能を Wound healing assay、増殖能を WST-1 によって評価した。

次に細菌と宿主間の相互作用についても検討するため、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* と *Treponema denticola* の付着に関する Hgp44 の付着領域の解析を行った。*P. gingivalis* ATCC 33277 の Hgp44 (アミノ酸配列 1-419) を含む プラスミドベクターをテンプレートとし、PCR 法にて増幅後、self ligation し、pHgp441-124, pHgp441-199, pHgp441-316, pHgp441-419, pHgp44199-419, pHgp44124-199, pHgp44199-316 を作製した。これらを *Escherichia coli* BL21Star (DE3) に形質転換し、培養した。菌液の sonication、遠心分離の後、沈殿を可溶化し、リコンビナントタンパク質を精製した。これらについて、SDS-PAGE および抗 His-tag 抗体を使用した Immunoblotting で発現を確認した。その後、r-Hgp441-6, r-Hgp44 の *T. denticola* ATCC 35405 への付着は ELISA にて評価した。その後、Coaggregation assay にて、r-Hgp44 フラグメントが *P. gingivalis* と *T. denticola* の共凝集に及ぼす影響を評価した。さらに、走査型電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡にて r-Hgp446 の *P. gingivalis* と *T. denticola* のバイオフィルム形成への影響を評価した。

4. 研究成果

アルコール含有 EO 群と CPC 群は、コントロール群(PBS) と比較して Ca9-22 の遊走能、増殖能に有意な影響を与えなかった。一方、アルコール非含有 EO 群は、増殖能を約 20 %に低下

させた。アルコール非含有 EO 洗口液の作用直後に細胞形態の変化を認め、wound assay においてスクラッチ後の細胞剥離が生じたため、この実験系では遊走能の評価はできなかった。この細胞形態の変化と剥離は、界面活性剤の影響によるものが考えられた。アルコール含有 EO 洗口液は、歯肉上皮細胞の増殖能、遊走能を阻害しなかった。アルコール非含有 EO 洗口液については増殖能の低下という影響が認められた。

SDS-PAGE の結果、r-Hgp44 の各フラグメントは、目的の分子量であることを確認し、Immunoblotting で、単一のバンドとして認めた。ELISA では、r-Hgp44、r-Hgp443、r-Hgp444 と *T. denticola* の付着はコントロールに比べて有意に高い値を示した。さらに、r-Hgp446 と *T. denticola* の付着はコントロールと比較して有意に高かった。Coaggregation assay の結果、r-Hgp446 と r-Hgp44 は低濃度で *P. gingivalis* と *T. denticola* の共凝集を阻害した。走査型電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡による解析の結果、r-Hgp446 はバイオフィルム形成を阻害した。以上の結果より、Hgp44 において *T. denticola* との付着に関わる主たるドメインは、アミノ酸配列の 199-316 間に存在することが明らかになった。

尚、当初予定していた miRNA レベルでの検討は、予備的実験の実施に留まり、十分な知見を得るに至らなかったため、今後、継続して検討する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yoshikawa K, Kikuchi Y, Kokubu E, Imamura K, Saito A, Ishihara K, Identification of a specific domain of *Porphyromonas gingivalis* Hgp44 responsible for adhesion to *Treponema denticola*, Pathog Dis, 査読有, 76, 2018, 1-8

DOI: 10.1093/femspd/fty047

Yoshikawa K, Sekino J, Imamura K, Ota K, Kita D, Saito A, In vitro effect of mouthrinse containing essential oils on proliferation and migration of gingival epithelial cells, Phytother Res, 査読有, 30, 2016, 1113-1118

DOI: 10.1002/ptr.5613

〔学会発表〕(計 3 件)

吉川幸輝, 喜田大智, 今村健太郎, 勢島 典, 齋藤 淳

Treponema denticola に対する *Porphyromonas gingivalis* Hgp44 の付着の特性.

日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会 (第 147 回), 平成 29 年 10 月 27 日, 盛岡市

日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会(第 147 回)プログラムおよび講演抄録集 ,xlili,197

吉川幸輝, 喜田大智, 今村健太郎, 青木栄人, 勢島 典, 齋藤 淳

Treponema denticola に対する *Porphyromonas gingivalis* Hgp44 の付着ドメインの解明.

日本歯科保存学会 2017 年度春季学術大会 (第 146 回), 平成 29 年 6 月 9 日, 青森市

日本歯科保存学会 2017 年度春季学術大会(第 146 回)プログラムおよび講演抄録集 ,p.xxxvi, 158

Yoshikawa K, Ota K, Imamura K, Kita D, Yamashita K, Kitamura Y, Saito A, Ishihara K.

Characterization of adhesion of *Porphyromonas gingivalis* Hgp44 to *Treponema denticola*.

95th General Session of the IADR, March 23, 2017, San Francisco, CA, USA

Program Book, p144

Yoshikawa K, Ota K, Imamura K, Kita D, Yamashita K, Ishihara K, Saito A.

Elucidation of the adhesion domain of *Porphyromonas gingivalis* Hgp44 for *Treponema denticola*.

The 102nd annual meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology and Japanese Academy of Clinical Periodontology, 平成 28 年 9 月 10-13 日, San Diego, CA, USA

Abstracts of JSP/JACP Poster Session, p8, 2016

日歯周誌 58(3), 170, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：国分栄仁

ローマ字氏名：Eitoyo Kokubu

所属研究機関名：東京歯科大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：70453785

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉川幸輝

ローマ字氏名：Kouki Yoshikawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。