

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20442

研究課題名(和文) F.n菌を用いた慢性歯周疾患を起因とする腸管炎症の粘膜免疫ネットワークの解明

研究課題名(英文) Characterization of the mucosal immunity network between chronic periodontal disease and intestinal inflammation by using Fusobacterium nucleatum (F.n).

研究代表者

河野 哲朗 (KONO, Tetsuro)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：40757431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では慢性歯周疾患を起因とした腸炎誘発機序を解明するために、申請者らが確立した歯周病モデルマウスを応用し、Fusobacterium nucleatum (F.n)を用いて歯周病モデルマウスを作製したうえ、生体恒常性を制御する免疫細胞の臓器間(口腔-腸管)ネットワークの解明を行った。結果、有意差を持って歯槽骨吸収量の増加し、形態観察においてリンパ球浸潤を伴った歯槽骨破壊像、また小腸、大腸の粘膜固有層に炎症症状がみられた。加えて、フローサイトメトリー法による免疫細胞の解析を行ない、F.n感染マウスの歯周組織、腸管組織ではマクロファージ、樹状細胞の発現頻度が上昇しているのを確認した。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the enterocolitis induction mechanism that a chronic periodontal disease induced using the periodontal disease model mouse which applicants established before in this study. We produced the model mouse using Fusobacterium nucleatum (F.nucleatum). And we used this model mouse to elucidate it how immune cells involved in homeostasis using this acted on organs between oral cavity and intestinal tract. As a result, the decrease in significantly different alveolar bone loss occurred, and the destruction image of the alveolar bone with the lymphocytic infiltration was present in morphology observation. Also, inflammatory cell infiltration was present in lamina propria of small intestine and the large intestine in morphology observation. In addition, we analyzed immune cells by the flow cytometry. As a result, murine periodontal tissues and the intestinal tissue which infected with F. nucleatum, we confirmed that the frequency of a macrophage and dendritic cells increased.

研究分野：組織発生学

キーワード：Fusobacterium nucleatum 慢性歯周疾患 歯周組織 腸管組織 フローサイトメトリー法

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性偏性嫌気性桿菌 *Fusobacterium nucleatum* (*F.n*)は歯周病原性細菌のひとつであり、歯肉縁下プラークから高頻度に検出され、免疫抑制因子・細胞毒性因子や付着因子など種々の歯周病原性を有することが報告され歯肉炎の発症や歯周炎への進展に関わると考えられている (Sekine et al. 2000. J Dent Hlth. 50 (4): 588-589.)。歯周疾患は歯周病原性細菌によって惹起される炎症性疾患である。その発症には歯周組織における宿主細胞の免疫反応も大きく関与する。しかしながら、宿主側の炎症・免疫反応が持続するメカニズムについては不明な点が多く残されている。慢性歯周炎は様々な全身疾患のリスクを高めることが知られている。近年、我が国において男女ともに癌患者の増加、特に大腸癌による死亡率は増大している(図 1)。これは炎症性腸疾患の長期化により大腸癌の発生率が高まっているともいわれられており、炎症性腸疾患は1973年に特定疾患にも認定されている(平成24年度 衛生行政報告 厚生労働省)。また、潰瘍性大腸炎や大腸ガンの病変粘膜部位から *F.n* が検出されたとの報告もある (Marchesi JR, et al 2011. PLoS One. 6 (5): e20447)。慢性歯周炎の持続により歯周病原性細菌が腸管へ流入することで、腸内細菌叢の変化や腸管粘膜上皮組織への細菌の侵入により炎症が惹起され潰瘍性大腸炎の誘発に関与していることが報告されているが不明な点が多い。

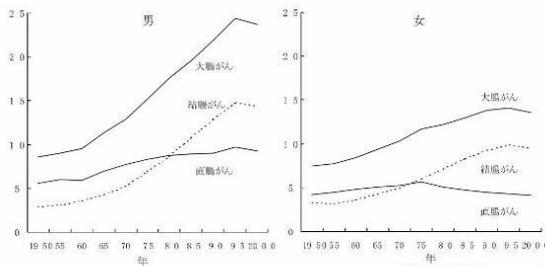


図1. わが国における大腸がん（結腸がん、直腸がん）の年齢調整死亡率の推移（1950-2000）

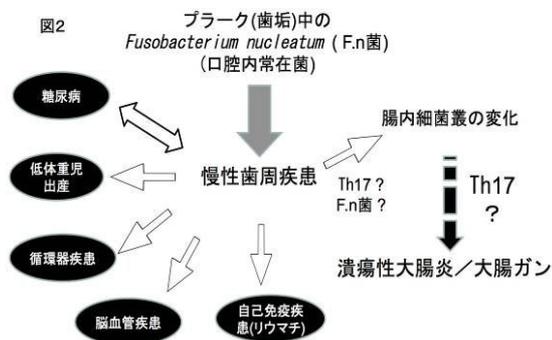
口腔と腸管は生体内において消化管また粘膜組織として連結している(臨床粘膜免疫学 清野宏)。共に、粘膜上皮で覆われ様々な常在菌が存在していることも共通している。外来からの細菌感染による細菌叢の変化も生体への炎症誘発に関連していることが考えられる。これまでに、炎症性腸疾患の誘発に Th17 細胞が関与することが多く報告されている (Weaver, CT. 2009. Nat. Rev. Immunol (9) 833-839)。

慢性歯周病と Th17 細胞の関与は、申請者らが確立した歯周病モデルマウスの解析により Th17 細胞が歯槽骨破壊を誘導することを報告している (T. Kono, et al 2011. Int. J. Oral-Med. Sci. 9 (3): 213-219.)。Th17 細胞による炎症疾患の制御はまだ不明な点が多い。

Th17 の出現により、これまで考えられてきた T 細胞介在性炎症の全面的な見直しが必要となっており、マウス関節炎モデルや早期関節炎患者においては役割の解明が進んでいる。しかしながら、歯周疾患における Th17 細胞の動態はまだ解明されていない。

患者数の増加は遺伝性素因をもとに食餌や腸内細菌叢変化などに対する腸管免疫機構の破綻などが関わっていると考えられる。

これらの学術的背景および研究成果から、申請者らが確立した *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*)を用いた歯周病モデルマウスを応用し、*F.n* を口腔内感染させることで、歯周炎による歯周組織の破壊と腸管を中心とした炎症性腸疾患の発症への関与を解明するという申請内容の着想を得るに至った(図 2)。



2. 研究の目的

本研究では慢性歯周疾患を起因とした大腸炎誘発機序を解明するために、申請者らが確立した歯周病モデルマウスを応用し、*Fusobacterium nucleatum* (*F.n*)を用いて歯周病モデルマウスを作製したうえ、生体恒常性を制御する免疫細胞の臓器間(口腔-腸管)ネットワークを解明する。慢性歯周炎によって誘発される腸炎の発症機序を解明することは、歯周疾患の予防だけでなく腸炎の発症を抑制する礎となり、予防や治療法の確立に寄与することを目的とする。

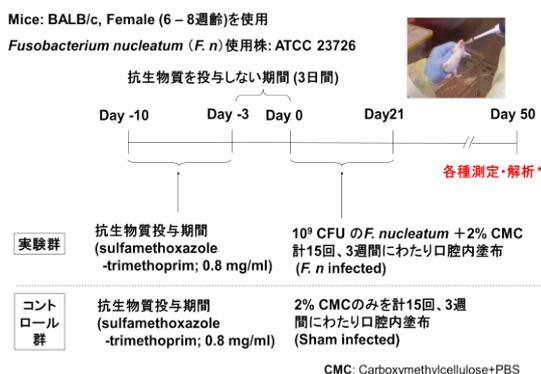
3. 研究の方法

Fusobacterium nucleatum (*F.n*)を口腔感染させた BALB/c マウスにおける炎症誘発機序を歯肉粘膜(歯肉粘膜上皮と歯肉粘膜下固有層)、腸管粘膜組織の各臓器間免疫ネットワークについて、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージを中心としてそれぞれの粘膜組織への関与を解明するために、以下の方法を用いた。なお、この研究は日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認を得て行った (AP15MD008 号)

(1) *E.n* 感染マウスの作成

これまでに申請者は *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) を用いた口腔感染により歯周炎モデルマウスの系を既に確立している (T. Kono, et al 2011. Int. J. Oral-Med. Sci. 9 (3): 213-219.)。そこでこの歯周病モデルの実験系を応用し、野生型 BALB/c マウス (6 ~ 8 週、雌) に 10^8 cfu の *F.n* (ATCC:23726) を口腔感染させた。適切な条件 (接種回数) はこれまでの実験結果を参考にし予備実験を行い、接種を 3 週間にわたり 15 回とした。

対照群は擬似感染マウスとし、抗生物質の前投与および、*E.n* を含まないカルボキシメチルセルロースを接種させた。



(2) 組織切片の作成

最終感染から 30 日後にマウスをチアミールナトリウム 15mg/Kg (2 : 3 の比率でリン酸緩衝液にて希釈) を腹腔内投与し麻酔奏効中に、開胸し左心室に 21G の留置針を挿入したのち、ヘパリン添加生理食塩水 (10U/ml) を用いて洗浄後、10% 中性緩衝ホルマリンにて灌流固定を行い歯周組織および腸管を採取し、同固定液に 3 日間固定液に浸漬させた。

歯周組織は 1 日間 5% ギ酸溶液にて脱灰を行い、通法に従いパラフィン包埋した。腸管は小腸、大腸より組織片を 5 mm 厚程度で切り出し、同じく通法に従いパラフィン包埋を行った。マイクロトームにて 4 μ m 厚に薄切片し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E 染色) により光学顕微鏡で観察した。

(3) 歯槽骨吸収量の計測

最終感染から 30 日後に炭酸ガスにて安楽死させたマウスより歯槽骨を含む上下顎を摘出し、3% 過酸化水素溶液にオーバーナイトさせたのち、1 分間漂白し、1% メチレンブルーにて染色をした。セメントエナメル境から歯槽骨縁までの距離を 1 匹のマウスにつき、頬側 28 か所を実態顕微鏡 (20 倍) にて計測を行った。

(4) フローサイトメーター (FACS) 解析

マウスの歯肉および小腸より単核細胞を単離するために、歯周組織、腸管組織 (小腸) をコラゲナーゼ (0.5mg/ml) を用いた酵素解離法により処理し、Percoll による不連続密度勾配遠心法で単核細胞を精製した。脾臓は通法通りステンレス製メッシュを用いて、2% FCS-RPMI1640 溶液内で静かにこすり、ACK バッファーを用いて単核細胞を精製した。精製した単核細胞は 2% FCS-RPMI1640 を用いて 1×10^7 cell/mL となるように調整した。

調整した各種単核細胞は蛍光色素標識抗体 CD3、B220、CD4、CD8、CD11c、CD11b モノクローナル抗体 (mAb) (BD Biosciences, NJ, USA) を組み合わせて、歯周組織および腸管から得られた単核細胞を染色し、FACS Caliber® (BD Biosciences, NJ, USA) による解析を行った。

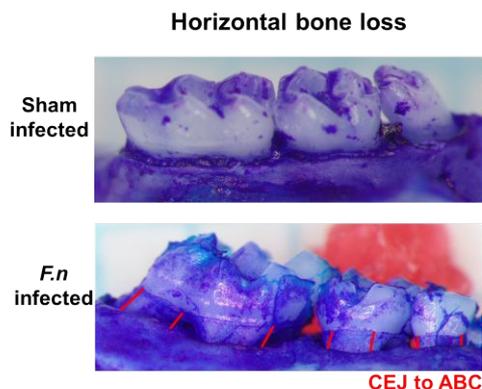
(5) 統計処理

得られた測定値は平均値 \pm 標準誤差で表した。これらの結果は Student's T test を用いて、有意差検定を行い、 $p < 0.05$, $p < 0.01$ を有意差があるとした。

4. 研究成果

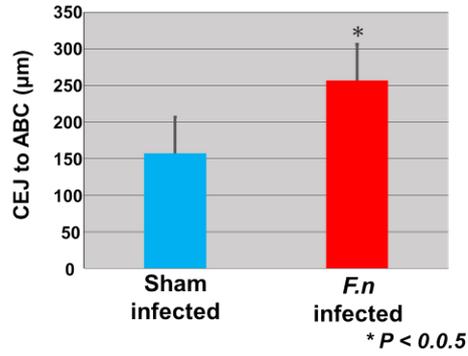
(1) マウス歯槽骨吸収と歯周組織の組織像

歯槽骨吸収像



歯槽骨吸収量

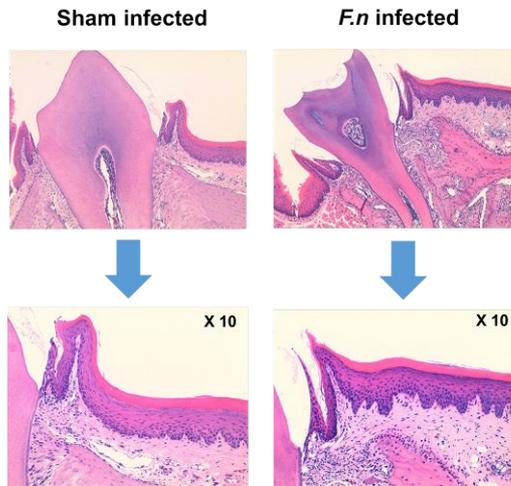
Measurements of alveolar bone loss



対照群と比べ実験群は歯槽骨吸収量が大きくなっていることが確認できた。

マウス歯周組織像

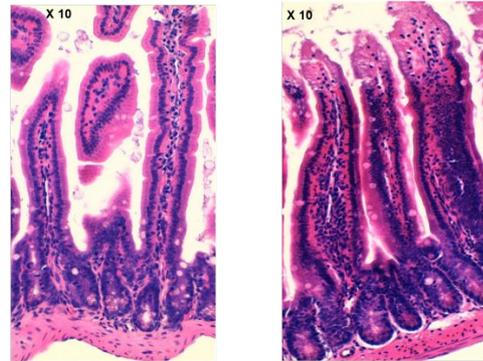
Induction of marginal gingiva inflammation in mice infected with *F. nucleatum*



対照群と比べ実験群では歯肉溝付近の歯肉固有層にリンパ球浸潤を認め、また歯槽骨頂付近の骨吸収も確認することができた。

(2) 腸管(小腸・大腸)の組織像

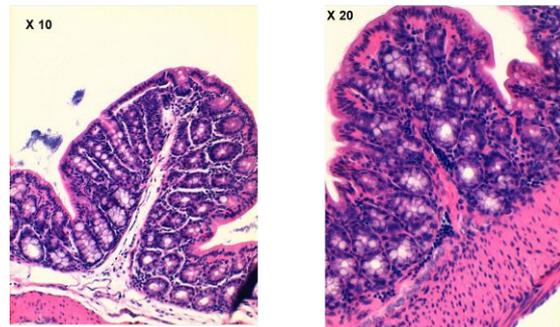
Small intestine



Sham infected

F.n infected

Large intestine



Sham infected

F.n infected

小腸・大腸の組織像を対照群と実験群で比較すると、実験群の方が小腸および大腸の粘膜固有層内に多くのリンパ球浸潤を認められた。

(3) フローサイトメーターによる解析

F. n 感染後の単核細胞の割合

Tissue	Mice infected with	Percentage of total lymphocytes			
		CD3	B220	CD11b	CD11c
GMCs	None	9.2 ± 1.1	44.8 ± 2.4	7.5 ± 1.1	2.9 ± 0.2
	<i>F. n</i>	41.3 ± 4.5	27.7 ± 2.7	27.3 ± 4.2	29.4 ± 2.3
Intestine	None	95.3 ± 2.5	51.8 ± 4.2	9.8 ± 0.9	2.3 ± 0.3
	<i>F. n</i>	32.7 ± 1.2	53.1 ± 0.4	10.0 ± 0.5	9.3 ± 0.4
Spleen	None	35.0 ± 0.7	50.5 ± 2.5	9.0 ± 0.2	3.4 ± 0.5
	<i>F. n</i>	32.9 ± 0.4	47.2 ± 0.4	7.5 ± 0.2	3.8 ± 0.1

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

特に歯肉単核細胞(GMCs)中の樹状細胞が持つマーカーの増加が実験群の方で確認できた。

樹状細胞(DC)サブセットの割合

Tissue	Mice infected with	Percentage of total CD11c ⁺ DCs			
		CD11c ⁺ B220 ⁺	CD11c ⁺ CD11b ⁺	CD11c ⁺ CD8 ⁺	
Gingiva	None	42.8 ± 7.1	26.2 ± 2.7]*	10.1 ± 1.2	
	<i>F. n</i>	25.7 ± 9.3	43.3 ± 1.6]*	35.8 ± 7.1	
Intestine	None	39.3 ± 2.0]*	29.2 ± 1.6	29.8 ± 2.6]*	
	<i>F. n</i>	16.4 ± 0.8]*	4.5 ± 1.0	7.8 ± 0.5]*	
Spleen	None	55.1 ± 0.4]*	12.4 ± 2.3]*	12.4 ± 1.6]*	
	<i>F. n</i>	60.8 ± 1.2]*	29.4 ± 1.8]*	28.1 ± 1.3]*	

** $p < 0.01$

DC サブセットの割合をみると、GMCs では CD11c⁺ CD11b⁺、小腸では CD11c⁺ B220⁺ および CD11c⁺ CD8⁺ の上昇が認められ、脾臓ではすべての DC サブセットの上昇が認められた。

以上の結果をまとめると本研究の実験群と疑似感染群において、歯周組織および腸管に炎症性細胞浸潤を認め、また歯槽骨吸収量の増加も確認することができた。

F. n 感染マウスの歯肉組織ではマクロファージ、樹状細胞(DC)それぞれの発現頻度が上昇しており、DC サブセットのうち CD11c⁺ CD11b⁺ および CD11c⁺ CD8⁺ に増加が認められた。以前、研究代表者が行った *P. g* 感染マウスでは DC サブセットのうち CD11c⁺ B220⁺ および CD11c⁺ CD8⁺ に増加が認められた。菌の種類によって異なったのは当初の予想は異なった結果となった。

また、小腸からは DC サブセットの上昇は認められなかった。これは免疫反応の抑制が働いている可能性が示唆された。なお、大腸に関しては手技が安定しないためか、データにばらつきが出てしまっている。

今後、n 数を増やし免疫反応を経時的に確認していき、かつ免疫反応の抑制に関わる細胞の解析を行っていく必要があると考えられた。また、炎症性骨吸収が生じた歯槽骨と生理的骨吸収の生じた歯槽骨との結晶学的変化を検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計2件)

1. 河野哲朗, 小林良喜, 渡辺新, 玉村亮, 落合智子, 岡田裕之. *Fusobacterium nucleatum* を用いた慢性歯周疾患に起因する炎症性腸管粘膜免疫ネットワークの解明. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017年.
2. 田口千恵子, 小林良喜, 河野哲朗, 有川量崇, 中山竜司, 竹内麗理, Bhawal Ujjal K.,

内山敏一, 那須郁夫. 老齢マウスにおける市販発酵食品摂取による抗菌性ペプチドの誘導について. 第66回日本口腔衛生学会・総会, 2017年.

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 哲朗 (KONO, Tetsuro)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号: 40757431

(4)研究協力者

小林 良喜 (KOBAYASHI, Ryoki)

松本 敬 (MATSUMOTO, Takashi)

落合 智子 (OCHIAI, Tomoko)

岡田 裕之 (OKADA, Hiroyuki)