

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04371

研究課題名(和文)腸内フローラが司る歯周病の免疫制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of immune system in periodontal disease controlled by intestinal flora

研究代表者

田中 芳彦(Tanaka, Yoshihiko)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：00398083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は、国民の多くがかかっている増加傾向にある国民病ともいえる病気です。歯周病は口腔内の細菌が原因となる治りにくい慢性感染症ですが、免疫がこの病気に関わっていることが知られています。歯周病が全身の健康と密接に関連した病気であることが明らかにされる一方で、腸内フローラとの関わりに注目が集まっています。本研究では、マウスの研究から腸内フローラと歯周病に関わりがありそうなことが分かってきました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内フローラがダメージを受けると歯周病が悪化する可能性があることがマウスの研究で示されました。歯周病の原因となる細菌に対する免疫や腸内フローラを整えることで病気を改善できるかもしれません。歯周病原細菌に着目した新しい実験モデルを構築する手がかりを得ました。本研究をさらに進めることで、歯周病に関する知られていない原因や新しい診断法、予防法や治療法の開発に発展することが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is one of the increasing diseases affecting many people in Japan. It is known that periodontal disease is a persistent chronic infection caused by bacteria in the oral cavity and immunity is involved in this disease. It has been noted that periodontal disease is not only a disease closely related to general health, but also a disease related to intestinal flora. We have found that the intestinal flora may be associated with periodontal disease in this study.

研究分野：病態系口腔科学

キーワード：歯周病 口腔細菌 免疫応答 リンパ球 口腔感染

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は国民の多くが罹患しており、その患者数は約 332 万人と著しい増加傾向にあります¹⁾。悪性新生物の約 163 万人を上回り、まさに国民病ともいえる疾患で、社会的な関心が高まっています。歯周病は難治性の慢性感染症であり、Th17 細胞による免疫応答が病態に関与していることが示されています²⁾。局所での口腔常在細菌が原因でおこる疾患と考えられてきた歯周病は、全身へ影響を及ぼすのみならず、その病態や疾患の進行には全身における多臓器間連携による恒常性維持機構が機能していることに疑いはありません。近年、歯周病が全身の健康と密接に関連した病気であることが明らかにされる一方で、腸管を介した全身での免疫応答が歯周病に及ぼす影響についても脚光を浴びつつあります。

歯周病原細菌をはじめとする口腔細菌やそのエンドトキシンは、歯肉組織の外傷、デンタルフロス、歯科的処置や食事などの機械的作用によって「直接的」に血管内に移行することで全身に影響を及ぼします(図1)。また、局所としての口腔での感染は、炎症反応と免疫応答によって産生されたサイトカインが血管内に放出されることで「間接的」に全身へ影響を及ぼします(図1)。このように従来の歯学の概念を拡大して、歯およびその周囲組織を含めた口腔領域全体を全身の臓器の一つとしてとらえる学問体系を「口腔医学」と呼びます³⁾。口腔と全身の関連性がある疾患が明らかになってきていますが、不明な点が多く残されています。

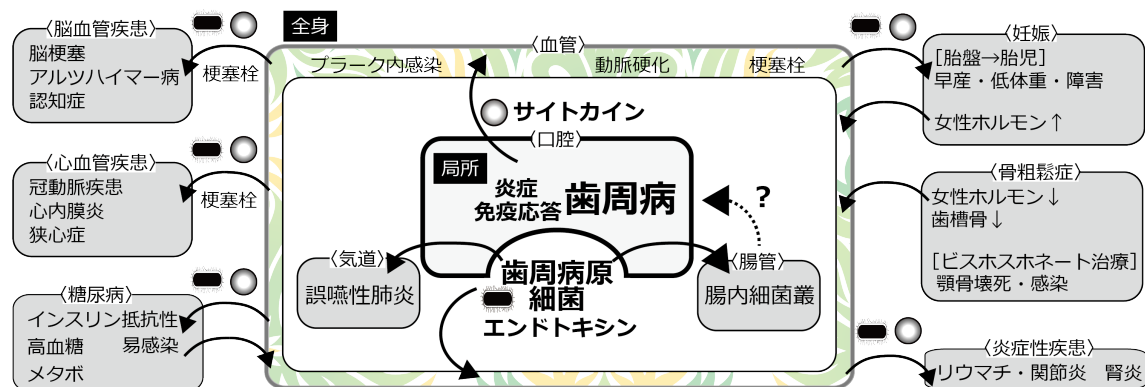


図1 口腔と全身の関連性

インターロイキン-17 (IL-17) 産生を特徴とするヘルパーT 細胞 Th17 は慢性関節リウマチや多発性硬化症といった多くの自己免疫疾患の発症と関係があり、端的にいうと、矛先を自己に向けた場合には Th17 細胞は悪者で攻撃性の高い細胞と考えられています。また、IL-17 欠損マウスを用いた歯周病原細菌の感染実験により、歯周病の発症と進行に IL-17 が必須の役割をもつことが明らかになっています⁴⁾。加えて、歯周病患者の口腔内局所に Th17 細胞が多く存在することが知られており、近年、歯周病の病態が Th17 細胞を介した免疫応答による歯周囲組織の破壊であることが明らかになってきました⁵⁾。

Th17 細胞の生体内における主たる分化の場が、小腸であることが明らかになりました⁶⁾。実際に、腸内フローラによって活性化された Th17 細胞がブドウ膜炎や脳脊髄炎といった自己免疫疾患の発症に関わっていることが次々と明らかにされており、腸内フローラが司る Th17 細胞によって様々な疾患の発症が制御されていることに注目が集まっています⁷⁾。歯周病が口腔内の常在細菌を原因として発症する疾患であることから、自己免疫疾患と類似した発症メカニズムがあることが示唆されます。口腔内で増殖した菌体が経消化管的に小腸へ到達し、腸管粘膜内に取り込まれていると考えられます。このような背景から歯周病の病態には腸内フローラが関与している可能性があります。一方、歯周病原細菌を選択的に認識する T 細胞責任抗原は未だに明らかにされておらず、このような解析によって腸内フローラが司る歯周病病態の全貌が明らかになることが期待されます。

2. 研究の目的

近年、腸内フローラが自己免疫疾患をはじめとする様々な疾患に影響を及ぼすことが注目されているものの、歯周病にも影響を及ぼすか明らかになっていません。本研究では、腸内フローラが歯周病感受性に及ぼす影響を無菌マウスの実験系を用いて解析するとともに、歯周病原細菌の T 細胞責任抗原の探索を起点として歯周病の免疫制御機構を解明することを目的としています。

3. 研究の方法

腸内フローラが歯周病感受性に及ぼす影響を無菌マウスの実験系を用いて解明するとともに、歯周病原細菌の T 細胞責任抗原を応用した感染実験モデル動物の作製とその解析を通して歯周病病態の全貌を明らかにすることを目的として、(1) 腸内フローラが歯周病の病態と発症に及ぼす影響の解明、(2) T 細胞責任抗原を応用した歯周病感染実験モデル動物の作製とその解析

の2点から研究を進めました。

(1) 腸内フローラが歯周病の病態と発症に及ぼす影響の解明

歯周病の原因細菌の中で *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は Red Complex に分類される強力な歯周病原細菌であり、なかでも最も病原性が高く、全ゲノムシーケンスが判明している細菌株を対象として解析を進めました。歯周病原細菌をマウス腸管内に投与する際には、口腔への影響を避けるために胃ゾンデを用いました。マウスから単離した CD4⁺T 細胞に対して、骨髓細胞から分化誘導した樹状細胞を抗原提示細胞として、歯周病原細菌由来菌体成分を抗原として培養後、再刺激により IL-17A サイトカイン産生を指標としてフローサイトメトリーで解析しました。歯周病の病態は、アタッチメントレベルの計測による歯槽骨吸収の測定などで評価しました。

腸内フローラと歯周病の病態の関連性の解析では、無菌マウスと SPF マウスを比較解析しました。無菌マウスはビニールアイソレーターで管理しました。細菌叢解析には Illumina 社製 MiSeq を用いました。

(2) T 細胞責任抗原を応用した感染実験モデル動物の作製とその解析

歯周病原細菌の T 細胞責任抗原の候補となる抗原タンパク質は大腸菌によって発現させたものを精製して解析に使用しました。骨髓細胞から分化誘導した樹状細胞を抗原提示細胞として、抗原タンパク質を取り込ませた後、マウスから単離した CD4⁺T 細胞と共培養して応答を解析しました。また、抗原タンパク質をマウス腸管内に直接投与する歯周病感染実験モデル動物を構築しました。さらに、T 細胞責任抗原の候補となる抗原タンパク質は歯周病疾患モデル動物の作製に応用しました。

4. 研究成果

本研究は、動物実験にて腸内フローラが歯周病感受性に及ぼす影響を解析し、歯周病原細菌の T 細胞責任抗原を応用した感染実験モデル動物の作製とその解析を通して、腸内フローラが司る歯周病の病態を解析しました。

(1) 腸内フローラが歯周病の病態と発症に及ぼす影響の解明

歯周病原細菌を腸管内に直接投与すると、全身のリンパ節で歯周病原細菌反応性 Th17 細胞が検出されることを見出しました。このマウスの口腔に歯周病原細菌を感染させた後、歯槽骨吸収を観察すると、歯周病原細菌を投与していないコントロール群と比較して病態が進行していることを認めました。生体内での細胞遊走を解析したところ、歯周病原細菌を口腔内に感染させることで腸管から歯肉組織に Th17 細胞が移行することが分かりました。これらのことから腸管内に歯周病原細菌を投与することで全身に歯周病原細菌に反応する Th17 細胞が確認され、歯周病の病態に影響を及ぼすことが示唆されました。

腸内フローラがない無菌マウスを用いて同様の実験をしたところ、歯周病原細菌を腸管内投与に関わらず歯周病原細菌反応性 Th17 細胞の分化が障害されていることを見出しました。また、腸内フローラの状態を変化させるため SPF マウスに抗菌剤投与して腸内細菌叢を比較解析したところ、細菌叢に変化が起きることを確認できました。このマウスから単離した CD4⁺T 細胞に対して、骨髓細胞から分化誘導した樹状細胞を抗原提示細胞として、歯周病原細菌由来菌体成分を抗原として培養後、再刺激によりサイトカイン産生を指標としてフローサイトメトリーで解析したところ、Th17 細胞の分化に変化をおこす抗菌剤があることが確認されました。さらに、SPF マウスの便を無菌マウスに異食させるとこの障害が回復することから、腸内フローラが歯周病原細菌反応性 Th17 細胞の分化に影響を及ぼすことが示唆されました。

(2) 歯周病原細菌の T 細胞責任抗原を応用した感染実験モデル動物の作製とその解析

歯周病原細菌 *P. gingivalis* の細菌菌体の分画成分に対するマウスから単離した CD4⁺T 細胞の IL-17A サイトカイン産生を指標とする解析を行い、歯周病原細菌の T 細胞責任抗原の候補を複数同定しました。これらの候補となる精製タンパク質を大腸菌で作成し、Th17 細胞への分化能の解析をしたところ、3つの有望な T 細胞責任抗原を見出しました。腸管内にこれらの抗原タンパク質を投与したマウスから単離した CD4⁺T 細胞を同抗原タンパク質で再刺激すると Th17 細胞への分化能が高いものが含まれていることが分かりました。腸管内にこれらの抗原タンパク質を投与したマウスの口腔内に歯周病原細菌を感染させる新しい感染実験モデル動物を構築して歯槽骨吸収を解析したところ、歯周病の病態の進行が確認されました。このようにして、タンパク質レベルで歯周病原細菌の T 細胞責任抗原の特定をすることができました。

歯周病原細菌の細菌菌体の分画成分を抗原とする T 細胞クローンの樹立をシングルセルソーティングの技術で試みましたが、長期の継代培養が可能な T 細胞クローンを得ることは技術的に困難でした。そこでクローン技術を応用して本研究で特定した上記の歯周病原細菌由来の T 細胞責任抗原タンパク質による歯周病疾患モデル動物の作製に着手しました。この歯周病疾患モデル動物が作出されると、歯周病の研究領域において生理的な解析が可能となり、治療効果の早期評価のみならず歯周病の病態を解析することで新しい病態メカニズムの解明への道を切り開くことが期待されます。

以上のように、本研究の解析から、歯周病の病態に関連する免疫制御機構において腸内フローラが重要な役割をしている可能性が示されました。歯周病原細菌由来の T 細胞責任抗原タンパク質の解析から新しい歯周病疾患モデル動物の開発の道を作ることができました。本研究で得られた情報を手がかりとして、歯周病の病態の免疫制御機構の解析、腸内フローラと歯周病関連免疫細胞のクロストーク、歯周病の新規免疫療法の開発といった今後の重要な研究課題に取り組むことで基盤的研究成果へ発展することが期待されます。

〈引用文献〉

- 1) 厚生労働省 平成 26 年患者調査の概況
- 2) *J. Clin. Periodontol.* 41: 541-549, 2014.
- 3) 田中健藏, *学会会報* 875: 62-67, 2009.
- 4) *Microbiol. Immunol.* 53: 287-294, 2009.
- 5) 田中芳彦, *感染症* 45: 193-202, 2015.
- 6) *Cell* 140: 845-858, 2010.
- 7) *Nature* 535: 75-84, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yasumatsu, K., Nagao, J., Arita-Morioka, K., Narita, Y., Tasaki, S., Toyoda, K., Ito, S., Kido, H. and Tanaka, Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 Bacterial-induced maternal interleukin-17A pathway promotes autistic-like behaviors in mouse offspring.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp. Anim.	6. 最初と最後の頁 250-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1538/expanim.19-0156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ikezaki, S., Cho, T., Nagao, J., Tasaki, S., Yamaguchi, M., Arita-Morioka, K., Yasumatsu, K., Chibana, H., Ikebe, T. and Tanaka, Y.	4. 巻 60
2. 論文標題 Mild heat stress affects on the cell wall structure in <i>Candida albicans</i> biofilm.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Med. Mycol. J.	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3314/mmj.19-00001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Arita-Morioka, K., Yamanaka, K., Mizunoe, Y., Tanaka, Y., Ogura, T. and Sugimoto, S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Inhibitory effects of Myricetin derivatives on curli-dependent biofilm formation in <i>Escherichia coli</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 8432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26748-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tasaki Sonoko, Cho Tamaki, Nagao Jun-ichi, Ikezaki Shojiro, Narita Yuka, Arita-Morioka Ken-ichi, Yasumatsu Kanae, Toyoda Keita, Kojima Hiroshi, Tanaka Yoshihiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Th17 cells differentiated with mycelial membranes of <i>Candida albicans</i> prevent oral candidiasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Res.	6. 最初と最後の頁 foy018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsyr/foy018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Soh, Tanaka Yoshihiko, Araki Hiromitsu, Kohda Akira, Sanematsu Fumiyuki, Arasaki Tomoko, Duan Xuefeng, Miura Fumihito, Katagiri Takaharu, Shindo Ryodai, Nakano Hiroyasu, Ito Takashi, Fukui Yoshinori, Endo Shogo, Sumimoto Hideki	4. 巻 7
2. 論文標題 The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 17402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-17597-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 田中芳彦	4. 巻 27
2. 論文標題 口腔細菌がもたらす全身とのクロストーク	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 炎症と感染	6. 最初と最後の頁 447-451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nagao, J., Narita, Y., Arita-Morioka, K, Yasumatsu, K., Tasaki, S., Cho, T., Tanaka Y.
2. 発表標題 Investigation of pathological mechanism of periodontal disease via T-cell mediated immune response.
3. 学会等名 The 49th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉永泰周, 米田雅裕, 廣松亮, 田中芳彦, 廣藤卓雄, 小山昭則, 坂上竜資
2. 発表標題 AIを利用した歯周病画像判定システムの開発と実施調査
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永尾潤一、成田由香、有田(森岡)健一、安松香奈江、田崎園子、長環、田中芳彦
2. 発表標題 宿主免疫応答による歯周病の病態形成機構の解明
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田由香、永尾潤一、有田(森岡)健一、田崎園子、安松香奈江、長環、田中芳彦
2. 発表標題 歯周炎を誘発するT細胞抗原エピトープの同定
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池本梨央南、中村麻衣、永尾潤一、有田(森岡)健一、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌の増殖を抑制する口腔内細菌の同定と抗菌因子の解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梁 尚陽、永尾潤一、成田由香、有田(森岡)健一、安松香奈江、田崎園子、長環、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病の病態形成におけるプロバイオティクスの機能
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka, Y.
2. 発表標題 A novel alternatively spliced SWAP-70-like adapter of T cells in differentiated Th2 cells.
3. 学会等名 The 91th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池本梨央南、疊屋有希、永尾潤一、田中芳彦
2. 発表標題 う蝕および歯周病を標的とした口腔内細菌由来抗菌因子の探索
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永尾潤一、成田由香、豊田馨太、有田(森岡)健一、安松香奈江、池崎晶二郎、田崎園子、長環、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病発症に関わるT細胞免疫応答の制御機構の解明
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有田(森岡)健一、永尾潤一、成田由香、池崎晶二郎、安松香奈江、豊田馨太、田崎園子、長環、田中芳彦
2. 発表標題 Myricetin類縁体を用いた細胞外アミロイド線維依存的なバイオフィルム形成の制御法
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	豊田馨太、成田由香、永尾潤一、有田（森岡）健一、安松香奈江、池崎晶二郎、田崎園子、長環、城戸寛史、田中芳彦
2. 発表標題	歯周病原細菌に対するT細胞応答に關与する抗原タンパク質の同定
3. 学会等名	第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	永尾潤一、成田由香、有田（森岡）健一、安松香奈江、田崎園子、池崎晶二郎、長環、田中芳彦.
2. 発表標題	歯周病病態形成における免疫制御機構の解明
3. 学会等名	第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	成田由香、永尾潤一、有田（森岡）健一、池崎晶二郎、田崎園子、安松香奈江、長環、田中芳彦.
2. 発表標題	実験的歯周炎モデルマウスを用いた病態を惹起する菌体成分の同定
3. 学会等名	第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	安松香奈江、成田由香、長環、永尾潤一、有田（森岡）健一、田崎園子、池崎晶二郎、城戸寛史、田中芳彦.
2. 発表標題	インプラント細菌汚染モデルを用いた除染効果の検討
3. 学会等名	第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年	2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石原和幸、今井健一、小川知彦、落合邦康、落合智子、葛城啓彰、上西秀則、清浦有祐、古西清司、田中芳彦、中澤 太、浜田信城、前田伸子、高尾亞由子、玉井利代子、長 環、宮川博史	4. 発行年 2018年
2. 出版社 学建書院	5. 総ページ数 433
3. 書名 口腔微生物学 第6版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者HP http://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/teacher_info_tanaka 所属研究機関研究分野HP https://www.fdcnet.ac.jp/col/department_graduate_school/div_info/div_info_kinou#sec02</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永尾 潤一 (Nagao Jun-ichi) (30509047)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師 (37114)	
研究分担者	成田 由香 (Narita Yuka) (50758050)	福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114)	
研究分担者	長 環 (Cho Tamaki) (90131870)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	退職のため削除：2019年9月17日

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	有田 健一 (Arita Ken-ichi) (90780205)	福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114)	