

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09566

研究課題名(和文) 歯周病発症におけるTRPチャンネルを介した口腔上皮バリア機能破綻の関与

研究課題名(英文) Involvement of TRP channels in the development of periodontitis

研究代表者

内田 邦敏(Uchida, Kunitoshi)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：20581135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はTRPチャンネルと上皮バリア機能形成との関係に焦点を当て、歯周病感染に伴うバリア機能破綻メカニズムを明らかにすることを目的とした。ヒト口腔上皮細胞株を用いた3次元培養モデルを構築し、歯周病原菌の死菌と共培養することで新たなin vitro歯周病モデルを作製した。このモデルの上皮細胞において、上皮層の厚みの増大、細胞増殖の亢進、及びバリア機能の低下が観察された。また、TRPV3及びTRPV4の発現が認められ、非選択的TRPチャンネル阻害剤の処置は本モデルで観察される上皮層の厚みの増大を抑制した。本歯周病モデルは歯周病発症機構の理解及び治療法開発に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト口腔上皮細胞株をin vitroにおいて角化させることに成功し、三次元に再構成するモデルを作製したこと、ヒト口腔上皮細胞株を用いた新たなin vitro歯周病モデルを作製したことで、口腔上皮の生理機能並びに歯周病発症メカニズムの更なる解明に繋がることが期待される。また、本歯周病モデルは歯周病治療薬開発のためのスクリーニング試験としての応用や治療法開発にも繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis (P.g.) is thought to be closely related to the development of periodontitis. However, the precise mechanism of how P.g. affects the barrier functions of epithelial cells is still unknown. In this study, we constructed a three-dimensional construct model composed of human oral epithelial cells and rat fibroblasts, and investigated the effect of P.g. on the epithelium by incubated with ground P.g.. The expression of genes related to cell cycle was changed and the number of Ki67 positive cells was significantly increased in epithelium with ground P.g.. The protein expression of E-cadherin was reduced in epithelium with ground P.g.. The barrier formation of epithelium was significantly impaired in the epithelium with ground P.g.. These data revealed that the increases in cell proliferation and the reduction in cell adhesion in human oral epithelium exposed to P.g. exhibit the impairment of barrier functions and could cause the development of periodontal pathology.

研究分野：細胞生理学

キーワード：口腔上皮 細胞増殖 バリア機能 歯周病菌

## 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、歯と歯肉の境界に形成されるプラークの中の *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) 菌などの歯周病菌が原因の慢性炎症によって歯を支持している歯周組織が破壊される疾患であり、炎症に伴う歯と歯肉との接着面である付着歯肉の脱落を主症状とする。その患者数は 332 万人、その原因菌感染者の割合は成人の 80%にもなると考えられている国民病である(1,2)。近年、歯周病が糖尿病、がん、脳卒中、心血管系疾患など様々な全身性疾患の誘因となる可能性が報告されてきており、全身の健康管理においても歯周病の治療並びに予防が重要と考えられるようになりつつある(2,3)。歯周病発症の一つのメカニズムとして、歯周病菌の上皮への浸潤によって炎症が惹起されることが挙げられる。口腔上皮も皮膚と同様に扁平の細胞が何層にも重なった重層扁平上皮であり、その表層は強固なバリアである角化層で覆われているが、皮膚と異なり角化の程度は弱く粘膜層を持っている。歯周病菌の浸潤は、これら上皮バリア機能の破綻に伴って起こると考えられるが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。

TRP チャンネルは非選択的陽イオンチャンネルであり、温度、機械刺激などの物理刺激、辛み物質、ステロイド、酸化ストレス、細胞膜脂質など多くの外因性及び内因性の刺激に応答する多刺激受容体という性質を持つ。その生理的役割は細胞内外の環境変化を感知する“センサー”としての役割のみならず、イオン輸送、シグナル伝達分子としての役割など多岐に渡ることが明らかになりつつある。また、TRPV4 の遺伝子多型がシャルコーマリートゥース病との関係などが報告されるなど TRP チャンネルの機能異常と疾患に深い関連があると考えられるようになってきた(4,5)。TRP チャンネルの生理機能の一つとして、皮膚ケラチノサイトにおいてタイトジャンクション形成に TRPV4 が関与していること(6)や TRPM7 を欠損すると膀胱上皮間の細胞接着が弱くなること(7)など、上皮バリア機能形成への関与がいくつか報告されている。一方で、口腔上皮においてはラット口腔上皮細胞株において TRPV1、2、3 並びに 4 チャンネルが発現しており、特に TRPV3 が上皮細胞の増殖に関与するという報告(8)はあるが、TRP チャンネルの口腔上皮バリア機能維持並びに歯周病発症への関与は未だ明らかにされていない。本研究の学術的問いは、歯周病菌感染に伴う口腔上皮バリア機能破綻が歯周病菌の上皮組織への浸潤をどのように引き起こし歯周病発症へと繋がるのか?である。

引用文献 1)平成 26 年 厚生労働省患者調査、2)廣畑 直子ら . 日大医誌 73, 211-218 (2014)、3) Hajishengallis G. Nat Rev Immunol 15, 30-44 (2015)、4) Nilius B and Owsianik G. Pflugers Arch 460, 437-450 (2010)、5) Kaneko Y and Szallasi A. Br J Pharmacol. 171, 2474-2507 (2014)、6) Sokabe T et al. J Biol Chem. 285, 18749-18758 (2010)、7) Watanabe M et al. J Biol Chem. 290, 29882-29892 (2015)、8) Wang B et al. J Dent Res. 90, 163-167 (2011)

### 2. 研究の目的

本研究は TRP チャンネルと上皮バリア機能形成との関係に焦点を当て、歯周病感染に伴うバリア機能破綻メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 細胞

ヒト口腔粘膜上皮細胞株 OKF6/TERT-2 細胞 (Rheinwald 博士の許可を得て大阪大学の西田・笹本両博士より供与) を keratinocyte-SFM 培地にて培養した。ラット繊維芽細胞は 7 日齢ラットより単離し、DMEM 培地にて培養したものを使用した。

#### 3-2. 組織学的解析

ヒト 3 次元口腔粘膜上皮モデルをパラフィン包埋し、厚さ 3  $\mu$ m の切片を作製した。蛍光染色には、抗サイトケラチン 14 抗体、抗サイトケラチン 13 抗体、及び Alexa 488-抗 IgG 抗体を用いた。DAB 染色には、抗 Ki67 抗体、抗 E-カドヘリン抗体、及び EnVision+ System- HRP Labelled Polymer を用いた。蛍光顕微鏡もしくは共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察した。

#### 3-3. 遺伝子発現解析

ヒト 3 次元口腔粘膜上皮モデルの上皮を単離して total RNA を得た。網羅的発現解析は Amp Labeling kit 及び SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray 8x60K v3 を用いた。TRP チャンネル遺伝子発現の解析は、ヒト口腔粘膜上皮細胞から得られた total RNA を用いた RT-PCR 法によって行った。定量的 RT-PCR 法には、ヒト口腔粘膜上皮モデル上皮の total RNA を逆転写することで得た cDNA を用いた。

#### 3-4. カルシウムイメージング法

カバーガラス状に培養したヒト口腔粘膜上皮細胞にカルシウム指示薬として Fluo-4 AM を導入した。カルシウム指示薬の確認にはイオノマイシンを用いた。

#### 3-5. 経上皮電気抵抗値の測定

経上皮電気抵抗 (TER) の測定には Epithelial volt-ohm meter を使用した。

#### 3-6. 細胞間透過性の測定

ヒト 3 次元口腔粘膜上皮モデルの上皮表面に 1 mg/mL FITC-dextran (4kDa) を 5  $\mu$ L 滴下し、10、20、30 分後に上皮を透過し培地に移行した FITC-dextran の蛍光強度を測定した。

### 3-7. 統計解析

2 群間の比較には unpaired t-test を多重検定には一元配置分散分析に続いて post-hoc Bonferroni 検定を行い、 $p < 0.05$  を統計的に有意であるとした。

## 4. 研究成果

### 4-1. ヒト口腔粘膜上皮細胞を用いた 3 次元上皮モデルの作製

いくつかの検討を行った結果、ラットの線維芽細胞を用いることで 3 次元上皮モデルの作製が可能となった。Wistar ラットを麻酔して口蓋粘膜を摘出した。ディスパーゼ処理により粘膜固有層を単離し、組織片から遊離した線維芽細胞を新しい培地で 2~3 日間培養した後に 3 回継代培養を行うことで線維芽細胞を得た。セルカルチャーインサート (10.5mm) を用いて線維芽細胞を I 型コラーゲンゲル 5 mL に包埋して培養した。24 時間後に、OKF6 細胞をコラーゲンゲル上に播種して培養を行った。ゲル上の細胞がコンフルエントになった後、気相液相境界面培養 (Air-Lift) にて分化誘導することで 3 次元上皮モデルを作製した。

### 4-2. P.g. 菌に感染したヒト口腔粘膜上皮モデルの構築

口腔粘膜上皮に対する P.g. 感染の影響を調べるため、ヒト口腔粘膜上皮モデルの Air-lift 直後に P.g. 菌粉砕物 (100  $\mu$ m で 15 分間熱処理してホモジナイザーで粉砕した菌体粉砕物を PBS に懸濁したもの) を滴下して培養することで P.g. 菌に感染したヒト口腔粘膜上皮モデル (P.g. 菌上皮モデル) を構築した。上皮モデルでは air-lift 4~8 日目に上皮細胞の重層化が認められ、免疫蛍光染色法により上皮モデルの基底層及び基底上層にそれぞれ未分化上皮マーカー CK14 及び非角化重層扁平上皮の分化マーカー CK13 の発現を確認した。P.g. 菌上皮モデルでは上皮モデルと比べて上皮層が厚く、細胞間に間隙を認めた。

### 4-3. ヒト口腔粘膜上皮細胞の細胞周期に対する P.g. 菌の作用

上皮に対する P.g. 菌の作用を明らかにするため、全 49177 遺伝子の発現プロファイルを DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、上皮モデルと比較して P.g. 菌上皮モデルにおいて 831 遺伝子の発現が低下しており、398 遺伝子の発現が上昇していた。次に、発現が変動した全遺伝子群について解析した結果、細胞周期に関連する遺伝子が多かった。特に、細胞周期の進行に中心的な役割を果たす CyclinA、CyclinB、及び Cyclin 依存性キナーゼ 1 遺伝子の発現が P.g. 菌上皮モデルにおいて上昇しており、この傾向は定量的 RT-PCR 法でも確認した。また、Cyclin を負に調節する因子である Cdkn1a mRNA 発現は有意に低下していた。そこで細胞周期進行のマーカーである Ki67 について免疫染色により検討した結果、Ki67 陽性細胞数は P.g. 菌上皮モデルの基底層で有意に増加していた。

### 4-4. ヒト口腔粘膜上皮細胞のバリア機能に対する P.g. 菌の作用

上皮バリア形成において重要な役割を担っている細胞間接着に関連する遺伝子発現を検討した結果、Tight junction に関与する Occludin および Claudin1 の mRNA 発現量は、P.g. 菌上皮モデルと上皮モデルの間で有意な差は認められなかった。Adherens junction に関与する E-cadherin の mRNA 発現量は、P.g. 菌上皮モデルにおいて低下傾向であった。さらに、E-cadherin タンパク質発現は P.g. の感染により低下した。P.g. 菌感染が上皮のバリア機能に及ぼす影響を検討するために TER を測定した結果、P.g. 菌上皮モデルにおいて有意に低下していた。また、FITC-dextran を用いて上皮細胞間隙の透過性を測定した結果、P.g. 菌上皮モデルで透過性が有意に増加した。

### 4-5. ヒト口腔粘膜上皮における TRP チャネル発現

ヒト口腔上皮細胞株に RT-PCR 法並びにカルシウムイメージング法を用いて TRP チャネルの発現を解析した結果、TRPV3 並びに TRPV4 の発現を認めた。また、カルシウムイメージング法を用いて TRP チャネルの発現を解析した結果、TRPV3 及び TRPV4 の発現を認めた。Pg 菌を共培養した 3 次元モデルに対する非選択的 TRP チャネル阻害剤の作用を検討した結果、Pg 菌群でみられた上皮層の厚みの増大が阻害剤によって抑制された。

本研究により、ヒト口腔上皮細胞を用いた 3 次元再構成モデルから新規歯周病モデルを構築し、歯周病発症に TRP チャネルの関与する可能性を明らかにした。本モデルを用いた解析により、歯周病発症メカニズムの更なる理解に繋がることが期待される。また、TRPV3 チャネルもしくは TRPV4 チャネルを介した歯周病発症メカニズムを明らかにすることで、TRP チャネルを標的とした治療法の確立に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 笠 孝成, 内田 邦敏, 岡村 和彦, 八田 光世, 山崎 純, 坂上 竜資	4. 巻 63
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalisがヒト口腔粘膜上皮細胞に与える影響の3次元構築モデルによる解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 144-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11471/shikahozon.63.144	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠孝成, 内田邦敏, 有田晴一, 有田陽一, 河原ゆり, 高瀬稔, 吉永泰周, 八田光世, 山純純
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisがヒト口腔粘膜上皮細胞機能に与える影響
3. 学会等名 第62回日本歯周病学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	山崎 純 (Yamazaki Jun) (50230397)	日本大学・生物資源科学部・教授  (32665)	
研究分担者	吉住 潤子 (Yoshizumi Junko) (40596376)	福岡歯科大学・口腔歯学部・助教  (37114)	
研究分担者	八田 光世 (Hatta Mitsutoki) (30344518)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授  (37114)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	坂上 竜資  (Sakagami Ryuji)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関