

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24139

研究課題名(和文) TRPチャンネルタンパクを介した歯肉上皮細胞のバリア機能制御の解明

研究課題名(英文) Modulation of gingival epithelial barrier function by TRP channel proteins

研究代表者

原 実生 (Hara, Miki)

新潟大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60848266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉上皮バリアは生体防御の最前線で物理的バリアとして機能し、歯周炎の発症を抑制すると考えられており、TRPチャンネルタンパクを介した歯肉上皮細胞のバリア機能制御を明らかにすることを目的とした。歯肉上皮細胞にTRPV1アゴニストであるカプサイシンを添加すると経時的にバリア関連遺伝子発現の上昇を認め、透過性試験による上皮バリア機能試験では、バリア機能を強化する明らかな傾向は認められなかった。一方でカプサイシンはTNF- $\alpha$ 誘導性の炎症性サイトカインの産生を有意に低下させた。免疫学的バリア機能制御にTRPV1が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年同定されたTransient receptor potential(TRP)タンパクファミリーは、温度・機械刺激・化学刺激などによって活性化されるカルシウムイオンチャンネルで、様々な疾患との関連性が報告されている。上皮細胞に発現するTRPタンパクが皮膚や血管のバリア機能制御に関与することが知られているが、歯肉上皮のバリア機能におけるそれらの関与については報告がほとんどない。TRPチャンネルタンパクの関与とその分子メカニズムを明らかにすることで、宿主のバリア機能強化という視点から、新しい歯周病予防・治療法の確立を目指すことは社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：TRP channel protein is expressed in the gingival epithelium, but there are few reports on its physiological role in periodontal tissues. The purpose of this study was to clarify the regulation of barrier function of gingival epithelial cells via TRP channel protein. The stimulation of gingival epithelial cells with capsaicin, a TRPV1 agonist, induced the expression of barrier-related genes. However, in the epithelial permeability assay showed capsaicin had no clear tendency to enhance the barrier function. On the other hand, capsaicin significantly reduced the production of TNF- $\alpha$ -induced inflammatory cytokines. These results suggest that TRPV1 is involved in immunological regulation of barrier function.

研究分野：歯周病学

キーワード：上皮バリア TRPチャンネルタンパク TRPV1

## 1. 研究開始当初の背景

すべての生体の最外層には上皮が存在し、生体と外部環境との境界面を規定している。多細胞生物では上皮層は物理的バリアとして、すなわち外来因子に対する生体防御の最前線として、生体恒常性維持の根幹を担っている。この上皮バリアの破綻は、外来病原因子が宿主内に侵入することを意味し、感染症や炎症性疾患の発症・進行に大きく関与する。なかでも、腸管上皮バリアの破綻した状態は leaky gut と呼ばれ、腸管から漏出した病原因子が局所にとどまらず全身性に悪影響を与えることが明らかとなっている (Turner JR et al., Nat Rev Immunol. 2009)。申請者らが専門とする歯周病においても上皮バリアの破綻とそれに続く外来病原因子の流入が炎症反応のトリガーと考えられている (Ye P et al., J Pathol. 2000)。申請者もこれまでに、主要な歯周病原細菌のひとつである *Porphyromonas gingivalis* が歯肉上皮細胞のバリア機能を低下させることを報告し (Yamada M et al., Sci Rep. 2018) 歯肉上皮のバリア機能破綻が歯周炎の発症・進行と密接に関係することと示唆している。

近年同定された Transient receptor potential (TRP) タンパクファミリーはカルシウムイオンチャネルとして機能する 7 回膜貫通型の膜タンパクであり、その構造や活性様式の違いにより、現在 28 種類の TRP チャネルタンパクが同定されている (DE Clapham, Nature. 2003)。温度、機械刺激、化学刺激などによって活性化されるユニークな膜タンパクであり、カルシウムイオンをセカンドメッセンジャーとして様々な細胞機能を制御し、疾患の発症や進行に関与すると考えられる。カルシウムイオンは上皮バリア関連因子であるカドヘリンファミリーなどの接着活性を制御することから、TRP チャネルタンパクを介して活性化される細胞内カルシウムシグナリングが歯肉上皮バリア機能に影響することが示唆される。

外界とのインターフェイスである口腔は、外来性の細菌やウイルス、飲食物や異物が最初に体内に入る場所であり、他の組織・臓器に比べ、TRP チャネルタンパクが選択的に局在して高度に機能していることは想像に難くはない。申請者らもこれまでに別のプロジェクトにおいて、歯肉組織における数種類の TRP チャネルの発現を報告しているが (Takahashi N et al., J Dent Res. 2015) 歯肉上皮細胞におけるこれらの機能は未だ不明な部分が多い。

## 2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、TRP チャネルを介したカルシウムシグナリングが歯肉上皮細胞のバリア機能を制御し、歯周炎の発症・進行に関与するのかを明らかとし、バリア機能向上という新しい視点から歯周炎予防・治療法の確立を目指すことである。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯肉上皮細胞株 Ca9-22 における TRP アゴニストの至適濃度の検討

ヒト歯肉扁平上皮癌由来の歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) をコンフルエントになるまで培養したのち、TRPV1 の特異的アゴニストとして知られるカプサイシンを各種濃度で添加し培養した。細胞の生存率を MTT アッセイにて、細胞形態を顕微鏡的観察にて解析し、カプサイシンの細胞傷害性を評価し至適濃度を検討した。

### (2) TRP アゴニストによるバリア機能強化作用の検証

Ca9-22 細胞をコンフルエントになるまで培養したのち上記で決定した濃度のカプサイシンで処置し、経時的に細胞を回収し全 RNA を抽出し、バリア関連分子である Tight junction, Adherence junction の発現解析を real-time PCR 法で解析した。

次に Ca9-22 細胞をコンフルエントになるまで培養したのちカプサイシンで前処置した後、歯周病原細菌 *P. gingivalis* で刺激することで上皮バリア機能障害を誘導した。全 RNA を抽出し、バリア関連分子である Tight junction, Adherence junction の遺伝子発現解析を real-time PCR 法で解析した。Ca9-22 細胞をセルカルチャーインサートで培養し、上記と同様の手法で各種刺激物質を添加培養後、トランズウェルと FITC デキストランを用いた細胞透過性解析により歯肉上皮バリア機能を評価した。

また、SV40T 抗原を導入し不死化させた歯肉細胞株 epi4 および正常初代培養歯肉細胞を用いても同様の解析を行った。

### (3) TRP アゴニストによる抗炎症作用の検討

Ca9-22 細胞をコンフルエントになるまで培養したのちカプサイシンで前処置した後、TNF- $\alpha$  で刺激し炎症を誘導した。炎症性サイトカインの遺伝子発現を real-time PCR 法で、タンパク質発現変化を ELISA 法で解析した。

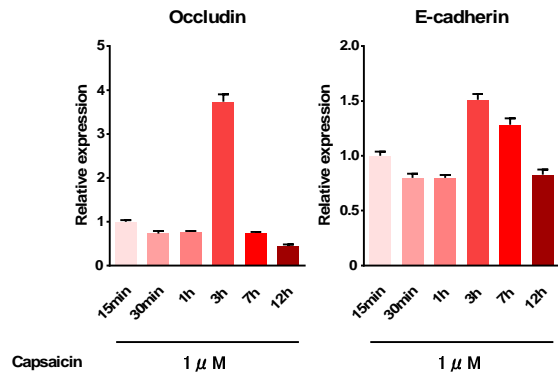
## 4. 研究成果

### (1) 歯肉上皮細胞株 Ca9-22 における TRP アゴニストの至適濃度の検討

Ca9-22 細胞にカプサイシンを各種濃度で添加し培養をした結果、0.1 $\mu$ M から 100 $\mu$ M において細胞為害性を認めず、細胞形態にも異常を認めなかったため、0.1 $\mu$ M から 100 $\mu$ M までの濃度で以後の検証を行うこととした。

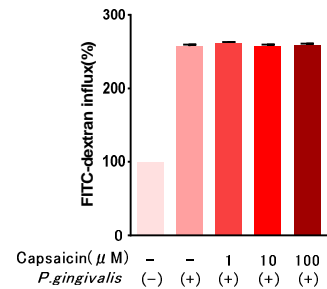
### (2) TRP アゴニストによるバリア機能強化作用の検証

カプサイシンが上皮バリア機能に影響を与えるか検証するため、Ca9-22 細胞にカプサイシンを添加し 15, 30 分、1, 3, 7, 12 時間で経時的に細胞を回収し遺伝子発現を検証した。細胞接着関連分子 (E-cadherin, ZO-2, Occludin, Claudin1) の遺伝子発現は 3 時間をピークに発現の増加を認め、バリア機能に影響を与える可能性が示唆された (図 1)。



(図1)

次に *P. gingivalis* 刺激で誘導された歯肉上皮バリア障害に対し、カプサイシン添加がバリア機能を強化するか検証するために FITC デキストランを用いた細胞透過性解析を実施した。*P. gingivalis* 刺激によりバリア機能は低下し細胞透過性が亢進したが、カプサイシン投与による透過性の改善は認められなかった (図 2)。

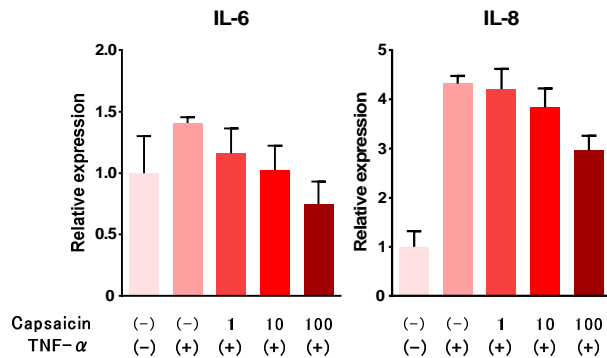


(図2)

### (3) TRP アゴニストによる抗炎症作用の検討

次に、Ca9-22 細胞においてカプサイシンの抗炎症作用の検証を行った。カプサイシン単独添加による炎症性サイトカインの産生は認められなかった。TNF- $\alpha$  刺激により誘導された炎症性サイトカインの産生は、前処置に用いられたカプサイシンの濃度依存的にその遺伝子発現が有意に抑制されることが確認された (図 3)。

歯肉上皮細胞において、TRPV1 を介した抗炎症作用が確認され、免疫学的バリア機能に TRPV1 が関与することが示唆された。今後、細胞内シグナリング経路を含めたさらなる詳細メカニズムの解析が必要である。



(図3)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahashi Naoki, Tsuzuno Takahiro, Mineo Shuhei, Yamada-Hara Miki, Aoki-Nonaka Yukari, Tabeta Koichi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Epithelial TRPV1 channels: Expression, function, and pathogenicity in the oral cavity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 該当する
1. 著者名 Takahashi Naoki, Sulijaya Benso, Yamada-Hara Miki, Tsuzuno Takahiro, Tabeta Koichi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 7
2. 論文標題 Gingival epithelial barrier: regulation by beneficial and harmful microbes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 e1651158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2019.1651158	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 該当する
1. 著者名 Sulijaya Benso, Yamada Hara Miki, Yokoji Takeuchi Mai, Matsuda Matsukawa Yumi, Yamazaki Kyoko, Matsugishi Aoi, Tsuzuno Takahiro, Sato Keisuke, Aoki Nonaka Yukari, Takahashi Naoki, Kishino Shigenobu, Ogawa Jun, Tabeta Koichi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 90
2. 論文標題 Antimicrobial function of the polyunsaturated fatty acid KetoC in an experimental model of periodontitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1470 ~ 1480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.19-0130	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 該当する
1. 著者名 Yokoji-Takeuchi Mai, Takahashi Naoki, Yamada-Hara Miki, Sulijaya Benso, Tsuzuno Takahiro, Aoki-Nonaka Yukari, Tabeta Koichi, Kishino Shigenobu, Ogawa Jun, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 110
2. 論文標題 A bacterial metabolite induces Nrf2-mediated anti-oxidative responses in gingival epithelial cells by activating the MAPK signaling pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104602 ~ 104602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.104602	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 該当する

〔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 都野隆博、高橋直紀、峯尾修平、原実生、野中由香莉、多部田康一
2. 発表標題 歯肉上皮細胞に発現するTRPV1活性化による抗炎症性作用の解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2020年度春季学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------