

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09913

研究課題名（和文）ヒト歯肉オルガノイドを用いた歯肉炎症および自己免疫疾患誘導メカニズムの探索

研究課題名（英文）Development of human gingival organoid systems and investigation for the induction mechanisms of gingival inflammation and autoimmune diseases.

研究代表者

津田 啓方 (TSUDA, Hiromasa)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：60325470

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、初代ヒト歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞を用いた三次元歯肉組織に毛細血管等の存在する三次元歯肉組織を作製し、口腔内細菌の産生する短鎖脂肪酸の影響を検討した。初代歯肉上皮細胞の単離・保存、他の細胞との条件合わせ、上皮層の剥離等の問題の克服が困難だったため、ヒト歯肉上皮細胞が歯周病原細菌の産生する短鎖脂肪酸により誘導される細胞死誘導メカニズムを探ることを並行して行った結果、短鎖脂肪酸による歯肉上皮細胞のヒストンアセチル化の亢進、活性酸素産生によるオートファジーの亢進が細胞死誘導に関与していることが示唆された。また、LPS誘導M1マクロファージの活性化を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯と歯肉の境目に蓄積した歯垢は大量の口腔内細菌を含み、これらの細菌は代謝産物として、高濃度の短鎖脂肪酸を産生する。歯肉上皮細胞への短鎖脂肪酸の作用は細胞死を誘導し、damage-associated molecular patternsと呼ばれる炎症を引き起こす因子を放出することから、歯肉炎の原因の一つとして口腔内細菌の産生する短鎖脂肪酸が考えられる。本研究では、短鎖脂肪酸誘導の細胞死メカニズムの一端としてヒストンのアセチル化の関与および活性酸素産生によるオートファジーの亢進が細胞死に重要であることを発見した。これらの知見は歯肉炎予防法開発に役に立つと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to prepare three-dimensional gingival tissues using primary human gingival epithelial cells and fibroblasts with capillaries and examined the effects of short-chain fatty acids produced by oral bacteria on epithelial cells. Because it was difficult to overcome the problems of primary epithelial cell isolation and cryopreservation of primary gingival epithelial cells, matching conditions with other cells, and detachment of the epithelial layer from lamina propria, we conducted parallelly explore the mechanism of cell death induced by short-chain fatty acids produced by periodontal pathogenic bacteria in human gingival epithelial cells. The results suggest that increased histone acetylation of gingival epithelial cells by short-chain fatty acids and increased autophagy by ROS production are involved in the induction of cell death. It was also suggested that LPS-induced M1 macrophage activation may be inhibited.

研究分野：口腔生化学

キーワード：短鎖脂肪酸 歯肉上皮 細胞死 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患発症の細胞生物学的・分子的メカニズムを考察する上で、これまでは二次元培養や動物実験を用いた研究がなされてきたが、ヒト生体と違う結果となる可能性が高い。その上、実際の歯周組織は様々な由来の細胞からなっており、歯肉上皮細胞、固有層線維芽細胞、血管内皮細胞、および多形核白血球やマクロファージなどの遊走細胞などが互いに作用しあっていることから、これまで行われてきた二次元培養系の様な単純すぎる系では細胞や分子の挙動について本当の事がわからない。また、歯周疾患などの慢性疾患については動物実験での評価が難しいことや動物実験を可能な限り減らそうという近年の研究を取り囲む環境から、より生体に近い挙動を示す三次元培養系や初代幹細胞を用いたオルガノイドを用いた研究が求められている。一方、我々は二次元の培養細胞を用いた系で、ヒト歯肉上皮細胞が短鎖脂肪酸の作用により細胞死を引き起こし、それに伴い HMGB1 などの damage-associated molecular patterns を放出することを発見してきたが、短鎖脂肪酸の作用がより生体に近いと考えられる三次元オルガノイド組織に及ぼす影響について調べ、そのメカニズムが二次元培養系の研究から得られたメカニズムと共通する点および相違点について検討する必要性があった。

2. 研究の目的

本研究では、実際の生体歯肉結合組織には存在する毛細血管や白血球等の遊走細胞を導入した歯肉組織と極めて類似性が高いヒト歯肉オルガノイド組織の作成を試み、これまでの申請者等の研究結果と三次元オルガノイド組織での違いを検討することを目的とした。また、二次元培養系において短鎖脂肪酸誘導細胞死メカニズムの詳細について検討し、そのオルガノイド組織を用いた結果との比較も併せて行うことも目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではヒト由来の歯肉組織を用いることから、日本大学歯学部倫理委員会の承認を得た後に研究を始めた。書面によるインフォームドコンセントをとった後に、抜歯等の外科処置によって発生する歯肉片を得た。この歯肉片をディスペーゼに作用させた後、上皮と固有層を分離し、それぞれの層を細かく刻んだ後に、6穴プレートにカバースリップを用いて固定した。外生してきた歯肉上皮細胞(HGEC)と線維芽細胞(HGFB)が混ざっていないことを顕微鏡下で確認し、問題なければ細胞を増やして凍結保存を行った。上皮と固有層がなかなかきれいに剥がれず、上皮細胞に線維芽細胞がたくさん混じることが多かった。

これらの細胞およびヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、それぞれ対数増殖期の細胞を三次元培養系に用いた。まずはHGFBとHUVECを様々な混合比で炭酸水素ナトリウム含有濃縮培地中に懸濁し、豚コラーゲン酸性溶液と混和したものをトランスウェルインサートに流し込んだ。30分程度インキュベーターで37℃に温めるとコラーゲンがゲル化して固まるが、硬化確認後にウシ胎児血清中に懸濁したHGECを載せてコラーゲンゲル上に歯肉上皮細胞の層を作製した。その後、上皮の重層化のため上皮上に存在する培地をアスピレートし、上皮層を空気に晒した。この状況で上皮層が固有層から剥がれ、固有層が露出することが多々あった。上皮層が厚くなる上でテンションが強くなり、そのようになったものと考えられた。上皮細胞の細胞数を変えるなど、様々な対処法を考えて改善を試みたが、良い方法が見つからなかった。

そのような中、保存しておいた上皮細胞の在庫がなくなり、追加の実験に時間を要するなど、順調に研究が進まなかったため、初代歯肉上皮細胞の代わりに歯肉上皮株化細胞を用いた系は過去に確立していたので、この系を用いて酪酸がこの三次元培養系の歯肉上皮株化細胞に及ぼす影響について調べた。また、歯肉上皮株化細胞を用いた二次元培養系を用いて、短鎖脂肪酸誘導細胞死メカニズムについて調べることにした。短鎖脂肪酸のうち酪酸はヒストンデアセチラーゼ(HDAC)を阻害することが知られていることから、口腔内細菌が産生する短鎖脂肪酸にHDAC阻害作用があるかどうかについて調べ、それらが細胞死に及ぼす影響について調べた。さらに、これまで、活性酸素の産生およびオートファジー亢進が細胞死に関わることを示してきたが、それらがどの様に関連しているかについて検討した。また、細胞死後の damage-associated molecular patterns (DAMPs) の放出についても調べた。加えて、短鎖脂肪酸がLPS誘導M1マクロファージの活性化に及ぼす影響についても調べた。

4. 研究成果

血管を有し初代歯肉上皮細胞および初代歯肉線維芽細胞を用いた三次元培養系の構築が難しかったため、ヒト歯肉上皮細胞株とヒト初代歯肉線維芽細胞を用いた単純な三次元培養系を作製し(図1)短鎖脂肪酸のうち酪酸が三次元培養歯肉上皮に及ぼす影響について調べたところ、酪酸はコントロールと比較して有意に多く

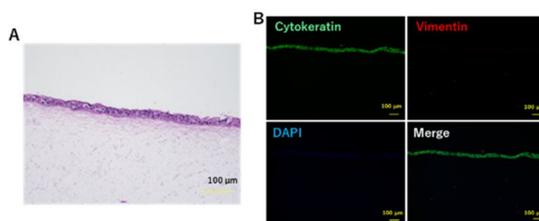


図1 ヒト歯肉上皮細胞株とヒト初代歯肉線維芽細胞を用いた三次元培養系。(A)HE染色(B)免疫染色像(サイトケラチン(緑)、ビメンチン(赤))

の細胞死を誘導し、DAMPs の一つである SAP130 の放出を亢進した (図 2)。

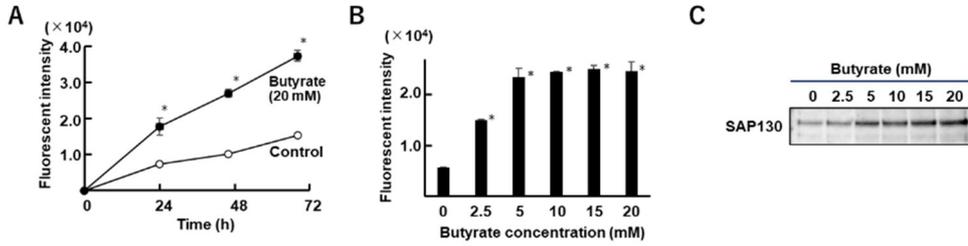


図2 ヒト歯肉上皮細胞株とヒト初代歯肉線維芽細胞を用いた3次元培養系への酪酸の作用 (A) 経時的、(B)濃度依存的に細胞死が誘導された。(C)SAP130の培地中への放出も認められた。

短鎖脂肪酸である酪酸およびプロピオン酸はヒト歯肉上皮の細胞死を引き起こすが (図 3)、酪酸だけでなくプロピオン酸においても HDAC 阻害作用を持つことがわかった (図 4)。次に、同じく HDAC 阻害因子である SAHA や Valproic acid を作用させると、酪酸やプロピオン酸を作用させたときと同様に細胞死を引き起こすことが解った (図 5)。

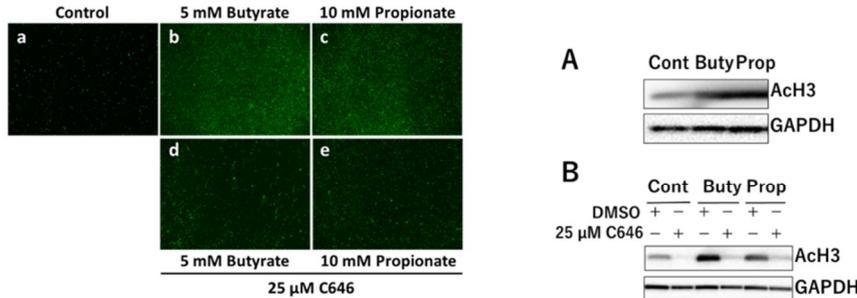


図3 酪酸およびプロピオン酸は細胞死 (緑色) を誘導し、C646の 前処理で細胞死は抑制された。

ヒストンはヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) によってアセチル化され、HDAC により脱アセチル化されることから、ヒト歯肉上皮細胞を HAT の阻害作用を持つ C646 で前処理することで、HAT によるアセチル化作用を減弱させ、そこで短鎖脂肪酸を作用させるとヒストンのアセチル化は減弱し、それに伴い短鎖脂肪酸誘導細胞死も減弱した (図 3)。短鎖脂肪酸の代わりに SAHA や Valproic acid などの HDAC 阻害剤で同様な実験を行ってみると、ヒストン H3 のアセチル化が亢進しそれに伴い細胞死が誘導された (図 5)。また、C646 の前処理は酪酸およびプロピオン酸誘導ヒストン H3 のアセチル化および細胞死を抑制した。

これらの事から、短鎖脂肪酸の HDAC 阻害作用がヒト歯肉上皮細胞の細胞死誘導に関与していることが解った。ヒストンのアセチル化によりヌクレオソームを構成するヒストンと DNA のアフィニティーが弱まることから、転写 (調節) 因子が DNA にアクセスしやすくなることで、

たくさんの遺伝子発現が増強されることが考えられることから (図 6)、酪酸の作用で発現が上昇し、C646 の前処理で発現が抑制される遺伝子を抽出したところ、その中にはオートファジーおよび活性酸素という Gene ontology がエンリッチされていることが解った (Odontology 2023, doi: 10.1007/s10266-022-00775-9)。これまでに、酪酸誘導細胞死にはオートファジーと活性酸素の産生が必要である事が解っていたが、これらがどの様に関係しているかについては不明であったので、調べてみたところ、酪酸およびプロピオン酸はオートファジーおよび細胞死を誘導したものの、ATG5 の siRNA 導入に

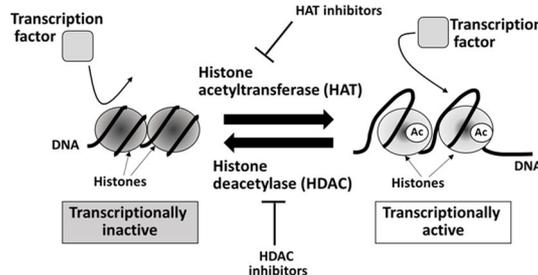


図6 ヒストンのアセチル化はDNA とヒストンの引き合う力を減弱させ、転写 (調節) 因子がDNAへ作用しやすくなることから、転写が活性化すると考えられる。HDACの阻害はヒストンアセチル化を亢進することから転写が活性化し、C646によるHAT阻害はアセチル化ヒストンを少なくすることで転写活性を抑制していると考えられる。

伝子を抽出したところ、その中にはオートファジーおよび活性酸素という Gene ontology がエンリッチされていることが解った (Odontology 2023, doi: 10.1007/s10266-022-00775-9)。

これまでに、酪酸誘導細胞死にはオートファジーと活性酸素の産生が必要である事が解っていたが、これらがどの様に関係しているかについては不明であったので、調べてみたところ、酪酸およびプロピオン酸はオートファジーおよび細胞死を誘導したものの、ATG5 の siRNA 導入に

よるオートファジーの抑制で細胞死は抑制された(図7)。次に活性酸素の産生が酪酸およびプロピオン酸によって誘導され、還元剤による活性酸素の消去でオートファジー(LC3B- から LC3B- のシフトを指標とした)および細胞死は減弱した(図8)。これらの事から、酪酸およびプロピオン酸により活性酸素の誘導が起こり、それによりオートファジーが誘導され、その結果細胞死が誘導されることが示唆された。

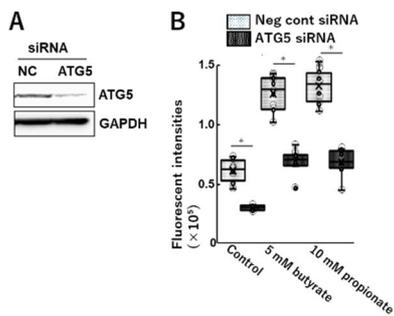


図7 (A)Atg 5 のsiRNAによるATG5のノックダウン (B) siRNAによるオートファジーの抑制は酪酸およびプロピオン酸誘導細胞死を抑制した。

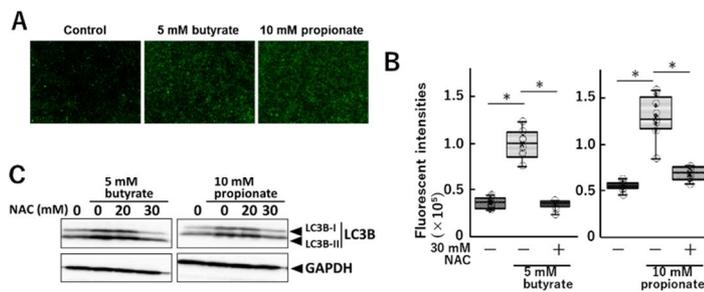


図8 (A)酪酸およびプロピオン酸による活性酸素種産生の誘導 (B) 活性酸素のNACによる消去は酪酸およびプロピオン酸誘導細胞死を抑制した。(C)NACによる活性酸素の消去は短鎖脂肪酸誘導オートファジーを抑制した。

加えて、短鎖脂肪酸がLPS誘導M1マクロファージの活性化に及ぼす影響についても調べた。LPSのマクロファージへの作用はマクロファージを炎症誘導性のM1マクロファージへと誘導する。M1マクロファージのマーカであるiNOSの産生を調べたところ、LPSで誘導されたiNOS産生が短鎖脂肪酸の作用により抑制された(図9)。

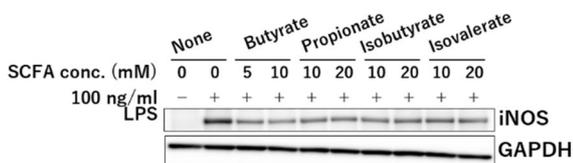


図9 短鎖脂肪酸のうち酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸はLPS誘導iNOS産生を抑制する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yusuke Kurosawa, Hirofumi Yamaguchi, Kazuki Uemichi, Keiji Shinozuka, Yuki Kirihara, Hiromasa Tsuda | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Butyrate-treatment induces gingival epithelial cell death in a three-dimensional gingival-connective tissue hybrid co-culture system | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences | 6. 最初と最後の頁 893-897 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jds.2022.08.034 | 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 - |
| 1. 著者名 Uemichi Kazuki, Mikami Yoshikazu, Watanabe Takayasu, Shinozuka Keiji, Tonogi Morio, Tsuda Hiromasa | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Histone-deacetylase-inhibitory effects of periodontopathic-bacterial metabolites induce human gingival epithelial Ca9-22 cell death | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Odontology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-022-00775-9 | 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 - |
| 1. 著者名 Fujiwara Yui, Murofushi Takahisa, Koshi Ryosuke, Mikami Yoshikazu, Tsuda Hiromasa | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 Reactive oxygen species-dependent release of damage-associated molecular patterns from human gingival epithelial Ca9-22 cells during butyrate or propionate exposure | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Science | 6. 最初と最後の頁 195 ~ 197 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnugd.20-0411 | 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 - |
| 1. 著者名 Masaoka Tadashi, Shinozuka Keiji, Ohara Kenshin, Tsuda Hiromasa, Imai Kenichi, Tonogi Morio | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 Bioinformatics analysis of dysregulated exosomal microRNAs derived from oral squamous cell carcinoma cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Science | 6. 最初と最後の頁 174 ~ 178 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnugd.20-0662 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Matsumura Sachie, Yamamoto Kiyofumi, Nakaya Yuka, O'Hashi Kazunori, Kaneko Keisuke, Takei Hiroki, Tsuda Hiromasa, Shirakawa Tetsuo, Kobayashi Masayuki | 4. 巻 455 |
| 2. 論文標題 Presynaptic NK1 Receptor Activation by Substance P Suppresses EPSCs via Nitric Oxide Synthesis in the Rat Insular Cortex | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 151 ~ 164 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.12.012 | 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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 朝山 雄之, 津田 啓方 |
| 2. 発表標題 口腔内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸がRANKL誘導破骨細胞形成に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第64回 歯科基礎医学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 三宅希和, 津田啓方, 篠塚啓二, 鈴木直人, 外木守雄 |
| 2. 発表標題 歯肉上皮細胞の短鎖脂肪酸誘導細胞死には活性酸素によるオートファジー誘導が必要である |
| 3. 学会等名 第74回日本大学歯学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 朝山雄之, 津田啓方, 生木俊輔, 鈴木直人, 米原啓之 |
| 2. 発表標題 口腔内細菌代謝産物が破骨細胞分化に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第74回日本大学歯学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 津田啓方 |
| 2. 発表標題 歯周組織で誘導される細胞死が歯周疾患および全身疾患に及ぼしうる影響 |
| 3. 学会等名 歯科基礎医学会 |
| 4. 発表年 2021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 | 三上 剛和 (Mikami Yoshikazu) (80434075) | 新潟大学・医歯学系・准教授 (13101) | |
| 研究分担者 | 鳥海 拓 (Toriumi Taku) (40610308) | 日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授 (32667) | |
| 研究分担者 | 篠塚 啓二 (Shinozuka Keiji) (30431745) | 日本大学・歯学部・講師 (32665) | |

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 |
|---------|---------|