

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17002

研究課題名(和文) 歯周病におけるSARS-CoV-2感染リスクの検討

研究課題名(英文) Examination of SARS-CoV-2 infection risk in periodontal disease

研究代表者

清水 智子 (Shimizu, Tomoko)

神奈川歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80782854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はSARS-CoV-2の感染において歯周病がリスク因子となるかを分子生物学的探索により明らかにしようとするものである。COVID-19では様々なサイトカインが病態の進展に関与しており、歯周炎の病態とCOVID-19で共通するサイトカインが認められる。そこで、ヒト歯肉上皮培養細胞を用いてサイトカインを添加することでSARS-CoV-2感染関連因子が変動するか検討した。サイトカイン添加によりヒト歯肉上皮培養細胞は、ACE2およびTMPRSS2で明らかな増加が認められた。感染局所でのサイトカインの産生増加による環境変化が上皮細胞の感染リスクを増加させ重症化に関与するかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サイトカイン添加によりヒト歯肉上皮培養細胞は、ACE2およびTMPRSS2で明らかな増加が認められた。過去の疫学報告においてCOVID-19の重症化に歯周炎がリスク因子であることが示されているので、感染局所でのサイトカインの産生増加による環境変化が上皮細胞の感染リスクを増加させ重症化に関与する可能性が示唆されるという学術的意義を認める。さらに歯周病の予防はCOVID-19の病態制御に貢献する可能性を示しており、歯科医療における新たな社会的意義を認める研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate whether periodontal disease is a risk factor in COVID-19 infection. Various cytokines are involved in the pathogenesis of COVID-19, and some cytokines are shared by COVID-19 and the pathogenesis of periodontitis. Therefore, we investigated whether the addition of various cytokines to cultured human gingival epithelial cells alters the factors associated with SARS-CoV-2 infection. The addition of cytokines (IL-1b, IL-17A, TNF- $\alpha$ ) to cultured human gingival epithelial cells resulted in a clear increase in ACE2 and TMPRSS2. Modification due to increased production of cytokines at the site of infection may increase the risk of infection of gingival epithelial cells and contribute to the severity of the disease.

研究分野：歯周病

キーワード：SARS-CoV-2 IL-1 TNF- IL-17 ACE2 TMPRSS2 FURIN

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は電子顕微鏡観察においてヒト舌上皮細胞に、SARS-CoV-2 のウイルス粒子の発現を確認し報告した。(Acta Histochem Cytochem. 2023Apr 25 ; 56 ( 2 ): 29-37 .)。また、COVID-19 患者の歯肉内縁上皮において、免疫組織化学的に SARS-CoV-2 感染に必要な生体側のレセプターである angiotensin converting enzyme2 (ACE2) や 型膜貫通型セリンプロテアーゼである (TMPRSS2) や S 蛋白の開裂に必要な Furin の発現増加を認めている (Int J Mol Sci . 2020 Aug 20;21(17):6000. )。さらに、歯周病が COVID-19 のリスク因子になる可能性が示唆されているがそのメカニズムは不明である。

### 2. 研究の目的

COVID-19 では様々なサイトカインが病態の進展に関与しており、歯周炎の病態と COVID-19 で共通するサイトカインが認められる。そこで、ヒト歯肉上皮培養細胞を用いてこれらのサイトカインを添加することで SARS-CoV-2 感染関連因子が変動するか検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養とリコンビナントの添加

正常ヒト口腔表皮角化細胞(凍結NHOK g)は正常ヒト表皮角化細胞増殖用培地(HuMedia-KG2)に、増殖添加剤を加え 37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。培養後、IL-1β、TNF-α リコンビナント ((HumanKine® recombinant human TNF alpha protein、HumanKine® recombinant human IL-1 beta protein) を 1 μg/mL、10 μg/mL、100 μg/mL ずつ培養細胞に添加、また IL-17A リコンビナント(HumanKine® recombinant human IL-17 (IL-17A) protein) を 0.05 μg/mL、0.5 μg/mL、5.0 μg/mL 後 2 時間培養し PCR で mRNA を解析した。

#### (2) mRNA の解析

total RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて、全細胞溶解液から RNA を抽出した。RNA の質と量は、DS-11 Series Spectrophotometer(DeNovix)を用いて OD<sub>260/280</sub> および OD<sub>260/230</sub> 比で測定した。100ng の全 RNA を RT-qPCR に使用した。

RT-qPCR 解析は、RNA-direct SYBR Green Realtime PCR Master Mix (東洋紡)を用いて行った。β-アクチン(標準化用)、ACE2、TMPRSS2、FURIN および NRP1 に対する特異的なプライマー設計は Primer3plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)を用いた。最終的な RT-qPCR 混合液は、10 μL の RNA-direct SYBR Green Realtime PCR Master Mix、2.5mM Mn(OAc)<sub>2</sub>、75nM のフォワードプライマーとリバースプライマー(β-アクチン)または 300nM のフォワードプライマーとリバースプライマー(ACE2、TMPRSS2)または 200nM のフォワードプライマーとリバースプライマー(FURIN、NRP1) 100ng の全 RNA、および 20 μL の蒸留水を含んでいた。StepOnePlus(アプライドバイオシステムズ社製)を用いた RT-qPCR サイクリングプロトコールは以下の通りであった: 逆転写反応の変性は 90°C で 30 秒、逆転写反応は 61°C で 20 分、最初の変性は 95°C で 1 分、その後 95°C で 15 秒、61°C で 15 秒、74°C で 45 サイクルとした。

#### (3) 免疫組織化学染色

2018-2020 年に神奈川歯科大学附属病院にて採取された歯肉上皮を含む病理診断サンプル

のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用いた。神奈川歯科大学研究倫理審査委員会（承認番号 第 610 番）の承認を得ている。免疫組織化学染色は酵素抗体法により行った。一次抗体は抗 ACE2 抗体、抗 TMPRSS 抗体、抗 Furin 抗体（Abcam 社製）を文献（Int J Mol Sci . 2020 Aug 20;21(17):6000. ）に従い用いて染色した。

#### 4 . 研究成果

IL-1 リコンビナント抗体 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加で ACE2 は 2 倍、TMPRSS2 は 4.4 倍に増加した。Furin にはほとんど変化がなかった。TNF- $\alpha$  リコンビナント抗体は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加で ACE2 および TMPRSS2 は 2 倍に増加した。Furin はほとんど変化がなかった。IL-17A リコンビナント抗体は 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加で ACE2 は 2 倍、TMPRSS2 は 7.3 倍、Furin は 1.9 倍に増加した。免疫組織化学染色の結果、外縁上皮より内縁上皮において ACE2・TMPRSS2 の発現を強く認めた。

以上の結果により、サイトカイン添加によりヒト歯肉上皮培養細胞は、ACE2 および TMPRSS2 で明らかな増加が認められた。過去の疫学報告において COVID-19 の重症化に歯周炎がリスク因子であることが示されている。感染局所でのサイトカインの産生増加による環境変化が上皮細胞の感染リスクを増加させ重症化に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomoko Shimizu, Keiichi Tsukinoki
2. 発表標題 Does BNT162b2 inoculation enhance in the oral mucosal immunity?
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水智子, 鎌田要平, 佐藤五月, 山本裕子, 槻木恵一, 小牧基浩
2. 発表標題 ヒト歯肉上皮細胞におけるSARS-Cov-2感染促進因子のサイトカインによる影響についての研究
3. 学会等名 第66回秋季日本歯周病学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------