

令和元年6月13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：2017～2018

課題番号：17H06701

研究課題名(和文)新規機能性脂肪酸の上皮バリア機能強化による歯周病予防・治療法の確立

研究課題名(英文)The establishment of periodontal treatment by strengthening gingival epithelial barrier using a functional metabolite

研究代表者

松川 由実(松田由実)(Matsukawa, Yumi)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：30804554

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文): 乳酸菌が脂質の代謝過程で産生する不飽和脂肪酸であるHYAは、腸管上皮バリア機能を制御し、腸炎発症を抑制する機能性脂肪酸として知られている。本研究は、HYAの歯肉上皮バリア機能に対する影響の解明を目的とした。

結果から、HYAが歯肉上皮細胞において、歯周病原細菌*P. gingivalis*刺激に誘導される上皮バリア傷害を抑制すること、さらに、実験的歯周炎モデルマウスに対するHYA投与が、歯肉組織における細胞間接着分子の分解および炎症性サイトカイン発現、歯槽骨吸収を抑制することが示された。

以上より、HYAが歯肉上皮バリア機能強化による歯周炎抑制効果を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のメタボローム解析技術の発展により、宿主に対して生理活性を有する機能性代謝産物の存在が相次いで明らかとなっているが、歯科分野における機能解析および臨床応用に関する報告は本研究が初めてであり、学術的意義が大きい。

また、本研究は、機能性脂肪酸を用いた歯肉上皮バリア機能強化をターゲットとした新たな歯周病予防法の可能性を示した。最近の抗菌薬耐性菌の問題を鑑みると、細菌側に働きかけるのではなく、細菌に強い組織にする、すなわち上皮バリア機能を強化することによる歯周病予防法開発の社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文): 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA), a bioactive metabolite generated by probiotic microorganisms during the process of fatty acid metabolism, has been studied for its protective effects against epithelial barrier impairment in the intestines.

We found that HYA significantly inhibited barrier impairment induced by *Porphyromonas gingivalis*, a representative periodontopathic bacterium. The degradation of E-cadherin and beta-catenin, basic components of the epithelial barrier, was prevented in vitro. Oral inoculation of HYA in a mouse experimental periodontitis model suppressed the bacteria-induced degradation of E-cadherin and subsequent inflammatory cytokine production in the gingival tissue.

Collectively, these results suggest that HYA exerts a protective function against periodontopathic bacteria-induced gingival epithelial barrier impairment and contributes to the suppression of inflammatory responses in periodontal diseases.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 機能性脂肪酸 上皮バリア 歯周炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯肉上皮は、細胞同士が緊密に接着することで生体防御の第一線として、外来の病原因子の侵入を防ぐ物理的バリアとして機能している。歯周病原細菌が産生する酵素による歯肉上皮バリアの破壊とそれに続く細菌の生体内への侵入が、歯周組織局所における持続的な炎症を誘導する結果、歯周病の病態形成に繋がると考えられる。実際に、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担う細胞間接着分子の発現を低下させることや、歯周病患者の歯肉組織では細胞間接着分子の発現が低下していることが報告されており、歯周病の発症・進行と上皮バリア機能は密接に関係していることが強く示唆されている。

その一方で、歯周病予防・治療法の主体は、歯周病原細菌をいかに減らすか、炎症をいかに抑えるかをターゲットとしたものであり、炎症誘発因子である細菌性プラークの除去を目的とした歯磨きやスクレーピング等の機械的方法あるいは抗菌薬を用いた化学的方法によるプラークコントロール以外に決定的予防・治療法がないのが現状である。超高齢化社会を迎えた本邦において、自ら口腔管理できない歯周病患者の増加や抗菌薬耐性菌の問題を鑑みると、細菌側に働きかけるのではなく、細菌に強い組織にする、すなわち上皮バリア機能を保護・修復することによる新たな歯周病予防・治療法の開発は社会的に重要な課題である。

近年、乳酸菌 *Lactobacillus* が脂質を代謝する過程で産生する不飽和脂肪酸 HYA (10-hydroxy-cis-12-octadecenic acid) が、腸上皮バリア機能保護、炎症抑制などの多彩な生理活性を有することが報告され、この代謝経路では他に HYB, HYC などの機能性脂肪酸が生成される。我々はこれらの機能性脂肪酸が歯肉上皮バリア機能に関与するという仮説のもと予備実験を行い、歯肉上皮細胞において、脂肪酸受容体である GPR40 が発現すること、各種機能性脂肪酸によりバリア機能の修復を促進するサイトカインの発現が誘導されることを確認した。これらのデータは仮説を支持するとともに、機能性脂肪酸が歯周病の予防・治療に応用できる可能性を示唆するものである。

### 2. 研究の目的

本研究では、機能性脂肪酸による歯肉上皮のバリア機能保護作用を *in vitro* と *in vivo* の双方より解明することで、歯周組織強化をターゲットとした新たな歯周病予防・治療法を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) *In vitro* 実験

##### 機能性脂肪酸による歯肉上皮バリア機能保護作用の解明

株化したヒト歯肉上皮細胞 (Epi 4) をコンフルエントになるまで培養し、各種機能性脂肪酸で前処置後、歯周病原細菌 *P. gingivalis* を添加培養することで上皮バリア傷害を誘導した。継続的に細胞を回収し、全 RNA およびタンパク質を抽出、上皮バリア機能関連タンパク質である E-cadherin,  $\beta$ -catenin について遺伝子発現を real-time PCR 法で、タンパク質発現をウェスタンブロッティング法で解析した。また、細胞間接着構造を透過型電子顕微鏡にて観察した。

Epi 4 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。

##### 脂肪酸受容体 GPR40 を介した反応であるかの検証

ここまでの実験で明らかとなった機能性脂肪酸の作用が脂肪酸受容体 GPR40 に認識され生じる反応かを検証するために、GPR40 阻害剤である GW1100 を添加し、上皮バリア機能保護作用を上記と同様の手法で評価した。

#### (2) *In vivo* 実験

##### 実験的歯周炎モデルマウスにおける機能性脂肪酸による歯周病予防効果の解明

*In vitro* 実験より、歯肉上皮バリア機能保護作用を認めた HYA について、歯周病予防効果を検討する目的で、実験的歯周炎モデルマウスに対する HYA 投与実験を行った。具体的には、10 週齢の C57BL/6 マウスを HYA 添加飲水で飼育し、7 日目に上顎第二臼歯を 5-0 絹糸にて結紮、同日から歯周病原細菌 *P. gingivalis* を毎日経口投与することで歯周炎を発症させ、14 日目に歯肉組織および歯槽骨を回収、各種解析を行った。

解析事項は、通法に従って作成した歯肉組織のパラフィン切片を H-E 染色し、上皮構造の破壊および炎症の程度を評価した。また、タイトジャンクションタンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行った。一部の個体からは、歯肉組織サンプルを採取し、RNA およびタンパク質を抽出しタイトジャンクション関連分子の発現を解析した。その後、余剰な軟組織を可及的に除去し、実体顕微鏡を用いてソフトウェア上で第二臼歯のセメント - エナメル境から歯槽骨頂までの距離を計測し歯槽骨吸収レベルを評価することで、歯周病の重症度を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *In vitro* 実験

##### 歯肉上皮細胞における上皮バリア機能への影響

Epi 4 において、*P. gingivalis* 刺激に誘導された上皮バリア傷害に対する機能性脂肪酸添加の影響を、FITC デキストランを用いた細胞透過性解析により評価した。結果から、*P. gingivalis* 刺激によって上皮バリア機能が傷害され、細胞透過性が亢進したが、HYA の前処置によって有意に抑制されることが示された (図 1)。

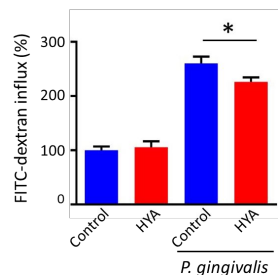


図1 歯肉上皮バリア傷害抑制効果

##### 細胞間接着構造への影響

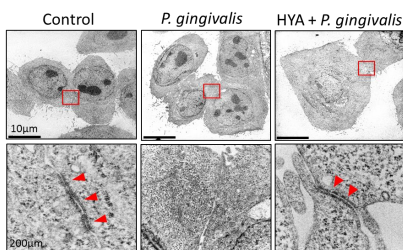


図2 HYAの細胞間接着構造への影響

続いて、透過型電子顕微鏡を用いて、形態学的解析を行った。図 2 は上段が弱拡大像、下段が赤枠で囲まれた細胞近接部位の拡大像、矢頭は細胞間接着構造を示す。画像より、*P. gingivalis* 刺激により細胞間接着構造が大きく損なわれるが、HYA の前処置によってそれらが抑制されることが確認された。

さらに、主要な細胞間接着分子である E-cadherin および  $\beta$ -catenin タンパク発現をウェスタンブロッティング法にて解析したところ、*P. gingivalis* 刺激によって細胞間接着タンパク質が分解され、HYA の前処置がその分解を抑制することが示された。

これらの結果より、HYA は *P. gingivalis* による細胞間接着タンパク質の分解を抑制することでバリア機能を強化していることが示唆された。

##### 脂肪酸受容体 GPR40 を介した反応であるかの検証

我々は予備実験から歯肉上皮細胞において、脂肪酸受容体である GPR40 が発現することを確認している。

図 3 より、GPR40 阻害剤である GW1100 の添加によって HYA による細胞透過性亢進の抑制効果が阻害されていることから、HYA は GPR40 を介して歯肉上皮バリア機能保護作用を持つことが示唆された。

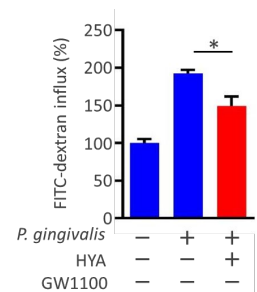


図3 脂肪酸受容体GPR40の関与

##### (2) *In vivo* 実験

##### 実験的歯周炎モデルマウスに対する HYA 投与による歯周病予防効果の検証

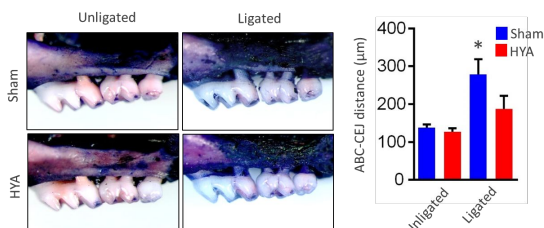


図4 HYA投与による歯槽骨吸収の抑制

HYA が歯周炎の病態形成に及ぼす影響を、結紮誘導歯周炎モデルマウスに対する HYA 投与実験にて検証した。

歯周炎の惹起により歯肉組織における炎症性サイトカインの産生が増加したが HYA の投与によって有意に抑制された。

また、歯周炎により生じる歯槽骨吸収が HYA 投与によって抑制される傾向を認めた (図 4)。

##### 実験的歯周炎モデルマウスに対する HYA 投与による歯肉上皮細胞間接着構造への影響

さらに、歯周炎組織における細胞間接着タンパク質 E-cadherin の発現を蛍光免疫染色により解析したところ、図 5 に示す通り、HYA 投与群において歯肉上皮層の E-cadherin の発現が有意に高いことが明らかとなり、*in vitro* 実験の結果同様、HYA が歯周炎に伴う細胞間接着タンパク質の分解を抑制し、上皮バリア機能を強化することが示唆された。

以上の結果から、機能性脂肪酸 HYA は歯肉上皮細胞において GPR40 を介して上皮バリア機能を強化することで、歯周炎の発症・進行を抑制することが示唆された。本研究の成果は、HYA を用いた新たな歯周病治療薬の開発や、歯磨剤・洗口剤への配合などに応用できるだけでなく、歯周病との関連が示されている多くの全身疾患の予防に繋がることが期待される。

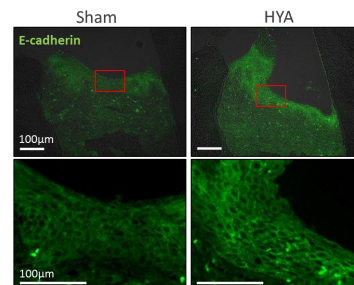


図5 歯肉上皮におけるE-cadherin発現

##### < 引用文献 >

Yamada *et al.* 『A bacterial metabolite ameliorates periodontal pathogen-induced gingival epithelial barrier disruption via GPR40 signaling』 Scientific Reports, 2018.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

1. Yamada Miki, Takahashi Naoki, Matsuda Yumi, Sato Keisuke, Yokoji Mai, Sulijaya Benso, Maekawa Tomoki, Ushiki Tatsuo, Mikami Yoshikazu, Hayatsu Manabu, Mizutani Yusuke, Kishino Shigenobu, Ogawa Jun, Arita Makoto, Tabeta Koichi, Maeda Takeyasu, Yamazaki Kazuhisa  
『A bacterial metabolite ameliorates periodontal pathogen-induced gingival epithelial barrier disruption via GPR40 signaling』  
Scientific Reports, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27408-y  
(査読あり、オープンアクセスとしている)
2. Matsuda Yumi, Minagawa T, Okui T, Yamazaki Kazuhisa  
『Resveratrol suppresses the alveolar bone resorption induced by artificial trauma from occlusion in mice』  
Oral Diseases, 2017. DOI: 10.1111/odi.12785  
(査読あり、オープンアクセスとしている)
3. Sato Keisuke, Takahashi Naoki, Kato Tamotsu, Matsuda Yumi, Yokoji Mai, Yamada Miki, Nakajima Takako, Kondo Naoki, Endo Naoto, Yamamoto Reiko, Noiri Yuichiro, Ohno Hiroshi, Yamazaki Kazuhisa  
『Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered Porphyromonas gingivalis through modulation of the gut microbiota and gut immune system』  
Scientific Reports, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-07196-7  
(査読あり、オープンアクセスとしている)
4. Tabeta Koichi, Du Xin, Arimatsu Kei, Yokoji Mai, Takahashi Naoki, Amizuka Norio, Hasegawa Tomoka, Crozat Karine, Maekawa Tomoki, Miyauchi Sayuri, Matsuda Yumi, Ida Takako, Kaku Masaru, Hoebe Kasper, Ohno Kinji, Yoshie Hiromasa, Yamazaki Kazuhisa, Moresco Eva Marie Y., Beutler Bruce  
『An ENU-induced splice site mutation of mouse Col1a1 causing recessive osteogenesis imperfecta and revealing a novel splicing rescue』  
Scientific Reports, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-10343-9  
(査読あり、オープンアクセスとしている)

### 〔学会発表〕(計5件)

1. Yamada-Hara M, Takahashi N, Matsuda-Matsukawa Y, Sato K, Yokoji-Takeuchi M, Sulijaya B, Tabeta K, Yamazaki K  
『A Bioactive Metabolite Prevents P. gingivalis-Induced Gingival Epithelial Barrier Disruption』  
International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, Phuket, Thailand (国際学会), 2019
2. Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Yokoji M, Sulijaya B, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K  
『Preventive Effect of Microbial Metabolite on Periodontitis in Mice』  
96th General session of the IADR, London (国際学会), 2018
3. 横地麻衣、高橋直紀、松田由実、山田実生、Benso Sulijaya、多部田康一、中島貴子、山崎和久  
『新規機能性脂肪酸の歯肉上皮細胞における酸化ストレス作用の検討』  
第61回春季日本歯周病学会学術大会、2018
4. Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Yokoji M, Sulijaya B, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K  
『Beneficial role of a microbial metabolite on gingival epithelial barrier』  
The 65th Annual Meeting of the JADR (国際学会), 2017
5. Yamazaki K, Sato K, Takahashi N, Kato T, Matsuda Y, Yokoji M, Yamada M, Yamazaki K, Nakajima T, Ohno H  
『Periodontopathic bacteria increases the severity of collagen-induced arthritis by affecting gut microbiota』  
Pg Melbourne, Melbourne (国際学会), 2017

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。