

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22702

研究課題名（和文）新規ヒトフローラマウスでの口腔と全身のクロストーク解析 細菌叢と免疫に注目してー

研究課題名（英文）Crosstalk between oral and systemic responses

研究代表者

東 みゆき（Azuma, Miyuki）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90255654

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：健常人と重篤歯周病患者間では、頻出歯周ブランク細菌のクラスターが異なりディスバイオーシスが生じていた。同定したFrequently-detectable Severe Periodontitis Bacteria (FSPB) 10種の嫌気性培養に成功した。ヒト潰瘍性大腸炎のマウスモデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導腸炎に、FSPB 10種細菌を培養後混合し経口投与することで、FSPB細菌群が腸管免疫を介して、全身疾患に与える影響を検討することとしたが、DSS 腸炎誘導過程で、ブリーダー会社により腸炎発症が異なり、腸内細菌叢および腸管免疫に違いが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

残念ながら、最終結果の獲得には至らなかったが、樹立したマウス実験モデルで、歯周病細菌と全身疾患との関連を模倣することができれば、今後の口腔と全身とのクロストーク解析に新規のアプローチを生み出すことになる。

研究成果の概要（英文）： We found the dysbiosis occurred in periodontal plaques between healthy donors and patients with severe periodontitis by microbiome analyses. We successfully performed anaerobic 10 Frequently-detectable severe periodontitis bacteria (FSPB) culture. Development of dextran sulfate sodium-induced colitis, which mimic human ulcerative colitis, were differ in three mouse breeder companies. This differences were related to intestinal microbiome and immune responses. We will plan to analyze the effects of 10FSPB treatment by oral feeding or gingival application.

研究分野：免疫学、口腔科学（歯学）

キーワード：腸内細菌 歯周細菌 腸管免疫 口腔免疫

1. 研究開始当初の背景

近年の急速な腸内細菌叢（マイクロバイーム）研究の進展により、炎症性腸疾患・自己免疫疾患・代謝性疾患・がん・認知症・精神疾患などの種々の非感染性慢性疾患で、腸内細菌叢の構成バランスの異常（ディスバイオーシス）が認められることが明らかになってきた。ヒトは自らが産生できない多くの産物を細菌の代謝産物に依存しているために細菌と宿主（免疫）細胞とのクロストーク解析は生命科学研究においてこれから非常に重要な意義をもつと思われる。共生細菌叢のディスバイオーシスは、免疫系、自律神経系、脳機能に影響を与え、これらが全身疾患の発症に関連すると考えられる。特に、腸内細菌叢変化は腸管免疫系に多大な影響を与え、全身免疫を攪乱させる。腸内細菌叢バランス異常の一因として、唾液として飲み込まれる口腔内細菌の影響が考えられる。特に、歯周病は、糖尿病・心血管疾患・早産などの全身疾患との関連が、疫学研究から示唆されているが、口腔細菌が腸内細菌のディスバイオーシスを誘導し全身疾患の発症に影響を与えることの科学的な実証には至っていない。

2. 研究の目的

(1) 当初の研究目的

口腔疾患と全身疾患の連関について共生細菌叢を加味しての実験的研究を可能とするために、当初は、ヒト細菌叢を保持したマウスモデルを作出することを目的としていた。具体的には、(i)無菌マウスにヒト腸内細菌を定着させたヒトフローラ (HF)マウスの口腔細菌叢および口腔免疫系を評価して基盤データを取得する、(ii)HFマウスに歯周フローラのディスバイオーシスが生じている細菌叢を移入し、全身疾患を発症させることで、口腔細菌の腸内細菌叢および免疫系への影響を明らかにすることの2項目を主な研究目的としていた。このモデル確立により、口腔細菌叢と腸内細菌叢間のクロストーク、さらには細菌叢と口腔・腸管・全身免疫とのクロストーク機序が明確にできると考えた。残念ながら、本研究採択後に進行させていた当該大学動物飼育施設における無菌マウス飼育ピニールアイソレーター下での感染実験施設の設置や規則策定などの進行が当初の計画より遅延したのに加えて、Covid-19感染拡大による新規動物実験の禁止および制限が生じ、さらに共同研究を計画していた他施設間の往来も制限されたために、上記(i)(ii)のHFマウスに関連した実験遂行が不可能となった。従って、研究目的を下記のように変更した。

(2) 実際の研究目的

重篤歯周病患者の歯周プラーク細菌叢におけるディスバイオーシスを証明すると共に、ディスバイオーシス細菌叢（細菌群）の腸管への直接投与あるいは歯周組織への投与により、口腔局所免疫、全身免疫、および腸管免疫がどのように影響を受けるかをヒト潰瘍性大腸炎のマウスモデルとして利用されているデキストラン硫酸ナトリウム (DSS)誘発腸炎モデルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯周病患者歯周プラーク細菌叢におけるディスバイオーシスの同定

健常口腔内保持者の歯肉縁下プラークの 16S rRNA 解析：6箇所の異なる部位から採取した 10名の健常口腔内保持者歯肉縁下プラークについて 16S rRNA 解析を実施した。

重篤歯周炎患者歯肉縁下プラークにおけるディスバイオーシス細菌叢の同定：口腔健常者 10名および歯周ポケット 6 mm 以上の重度歯周炎患者 10名の上顎第 1 大臼歯近心歯肉縁下プラークをペーパーポイントで採取した。細菌 DNA を抽出し、V1-V2 領域の 16S rRNA を PCR 増幅して、次世代シーケンズ解析を実施した。OUT クラスタ解析および UniFrac 解析を実施した。

(2) 歯周炎マウスモデルの樹立と歯肉上皮 PD-L1 発現の歯周炎発症への関与

慢性に経過する歯周炎の適切なマウスモデルが存在しないと思われたので、細い 9-0 絹糸を使用することで、時間をかけて発症する歯周炎の誘導を試みた。上顎第 1 大臼歯結紮 7 日後の歯周組織の H&E 染色、TRAP 染色、炎症性サイトカインおよび骨代謝関連遺伝子の定量 RT-PCR 解析を実施するとともに、7 週後の歯槽骨吸収を調べるために、上顎骨のマイクロ CT 解析を実施した。野生型マウスと歯肉上皮細胞に PD-L1 を過剰発現させた PD-L1 トランスジェニック (K14/PD-L1tg) マウスで比較した。

(3) 腸炎マウスモデル樹立と基盤データ獲得

飲料水に 4% DSS を添加し、DSS 腸炎を誘導した。体重変化と疾患スコアを連日、7-10 日目の大腸の長さを測定し、大腸粘膜固有層リンパ級 (Colon LPL) を単離しフローサイトメトリー解析を実施した。

(4) 培養歯周プラーク細菌群投与による腸炎発症への影響

上記の研究結果で得られた重度歯周炎患者で頻出する Frequently-detected severe

periodontitis bacteria (FSPB)11種の細菌を ATCC あるいは理研バンクより購入し、嫌気性培養を実施した。単独培養後に 11 種を混和してゾンデで経口投与あるいは歯牙結紮歯周組織に投与することで、ディスバイオーシス歯周プラーク細菌叢の模倣を試みる。

4. 研究成果

(1) 歯周病患者歯周プラーク細菌叢におけるディスバイオーシスの同定

同一人の検体では、採取部位が異なっても門レベルではほぼ同様の細菌叢構成が得られた。同一個体での採取部位の違いより、個体による細菌種の違いの方が明確であった。(論文業績 1) 13 門/109 属/385 種の解析が可能であった。健常人と重度歯周炎患者では、属・種レベルにおける多様性が異なっていた。健常人で豊富な 16 種および歯周炎患者で豊富な 9 種が同定でき、重度歯周炎患者では歯周プラーク細菌叢のディスバイオーシスが生じていることが確認できた。(論文業績 2)

(2) 歯周炎マウスモデルの樹立と歯肉上皮 PD-L1 発現の歯周炎発症への関与

K14/PD-L1tg マウスの歯肉基底細胞に PD-L1 が過剰発現していることを確認した。組織学的変化、炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF)の上昇、歯根膜変性、Rank1 /Opg 発現と TRAP 陽性細胞による破骨細胞分化促進から示される早期の歯周組織の炎症性変化は、K14/PD-L1tg マウスで明らかに軽減されていた。また、後期の歯槽骨吸収も顕著に抑制されていた。K14/PD-L1tg マウスにおける歯肉基底細胞の PD-L1 過剰発現は、結紮誘導歯周炎モデルで歯周組織炎症と歯槽骨吸収を軽減させることが示された。明確な歯槽骨吸収が検出できない早期の 7 日後でも急性の炎症性変化に加えて、すでに破骨細胞分化の違いが認められることが明らかになった。(論文業績 3)

(3) 腸炎マウスモデル樹立と基盤データ獲得

DSS 誘導性腸炎を当初 A 社ブリーダーマウスを使用して試みていたが、BALB/c 系統から C57BL/6 系統に変更しても明確な疾患が誘導できなかったため、BALB/c 系統マウスで A, B, C 社マウスで DSS 腸炎誘導を試みたところ、会社により疾患スコアが異なり、C 社マウスが腸炎発症の感受性が高いことが明らかになった。3 社マウスの腸内細菌のマイクロバイオーム解析を実施したところ、細菌叢の違いが認められた。また、大腸 LPL の解析でも、CD45+CD11b+ ミエロイド系免疫細胞の集積の違いが認められた。C 社マウスで今後の検討を進めていくことに決定した。

(4) 培養歯周プラーク細菌群投与による腸炎発症への影響の検討

Fusobacterium nucleatum, *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micra*, *Prevotella denticola*, *Prevotella intermedia*, *Eubacterium brachy*, *Prevotella tannerae* の 10 種の嫌気性培養に成功したが、*Eubacterium saphenum* は継続培養できなかった。そこで、培養可能であった 10FSPB Mix を使用して、腸炎発症への影響を検討することにした。また、9-0 絹糸歯牙結紮誘導歯周炎モデルの歯周組織に、10FSPB Mix を apply して、所属リンパ節および全身免疫を代表できる脾臓、腸管免疫を代表できる colon LPL の解析を実施していく方針を決定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda E, Shiba T, Ikeda Y, Suda W, Nakasato A, Takeuchi Y, Azuma M, Hattori M, Izumi Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Deep sequencing reveals specific bacterial signatures in the subgingival microbiota of healthy subjects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 1489 ~ 1493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-019-02805-3	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 -

1. 著者名 Ikeda Eri, Shiba Takahiko, Ikeda Yuichi, Suda Wataru, Nakasato Akinori, Takeuchi Yasuo, Azuma Miyuki, Hattori Masahira, Izumi Yuichi	4. 巻 108
2. 論文標題 Japanese subgingival microbiota in health vs disease and their roles in predicted functions associated with periodontitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 280 ~ 291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-019-00452-4	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 Wongtim Keeratika, Ikeda Eri, Ohno Tatsukuni, Nagai Shigenori, Okuhara Shigeru, Kure Keitetsu, Azuma Miyuki	4. 巻 93
2. 論文標題 Overexpression of PD L1 in gingival basal keratinocytes reduces periodontal inflammation in a ligature induced periodontitis model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 146 ~ 155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.21-0017	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wongtim Keeratika, 池田 恵莉、大野 建州、永井 重徳、奥原 滋、呉 圭哲、東 みゆき。
2. 発表標題 免疫チェックポイント分子PD-L1の歯肉過剰発現は、早期および慢性の歯肉炎症を抑制する。
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wongtim Keeratika, 永井 重徳、奥原 滋, 東 みゆき
2. 発表標題 免疫チェックポイント分子PD-L1の歯肉過剰発現は、早期および慢性の歯肉炎症を抑制する。
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wongtim Keeratika, Pornpan Piboonratanaka, Eri Ikeda, Shigeru Okuhara, Shigenori Nagai, Miyuki Azuma
2. 発表標題 Overexpression of immune checkpoint molecule PD-L1 in gingival keratinocytes regulates periodontal inflammation.
3. 学会等名 2022 IADR (International Association for Dental Research) /APR (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 服部 正平 監修	4. 発行年 2020年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 350
3. 書名 ヒトマイクロバイーム Vol.2	

〔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	平山 和宏 (Hirayama Kazuhiro) (60208858)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授 (12601)	

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 分 担 者	竹内 康雄 (Takeuchi Yasuo) (60396968)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	

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