

令和元年6月23日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11403

研究課題名(和文) 咽頭部への歯周病原細菌の定着とそれに対する生体応答についての解析

研究課題名(英文) Biological response to inhabiting of a periodontal pathogen in pharynx

研究代表者

林 潤一郎 (Hayashi, Jun-ichiro)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：30350937

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)：本研究では、歯周組織では炎症を引き起こす歯周病原細菌が、咽頭領域では炎症を惹起せず、生体の排除を受けずに定着している機序について、解析を行った。咽頭の上皮細胞に対して歯周病原細菌の菌体成分(培養上清)で刺激を行うと、炎症性物質を産生し、炎症応答を示した。一方、咽頭に生息する咽頭常在細菌の菌体成分で刺激を行っても、炎症性物質の産生は上昇せず、炎症応答は見られなかった。咽頭常在細菌で刺激を行ったのちに、歯周病原細菌で刺激を行ったところ、炎症応答は抑えられた。このことから、咽頭部で歯周病原細菌が炎症応答を示さないのは、咽頭の細胞が咽頭常在細菌による影響を受けているためであ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

本研究で得られた成果は、まだ十分検討されておらず、継続的な研究が必要であるが、歯周病の原因となる細菌がどのように口腔やその他の領域に定着して、時には疾患を引き起こし、時には常在菌として炎症を引き起こさずに生息するのか、そのメカニズムを解明することは、歯周病の予防や再発防止のための方策を考案する手がかりになるだけでなく、人の体とそこに生息する何千種類という細菌の相互作用の理解に、新しい知見をもたらすことになると思われる。人は、細菌と共生することで正常な生命活動が維持されるため、その相互作用の解明は、その破綻により生じる疾患を予防する上で欠かせない重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated how a periodontal pathogen inhabits in pharynx without induction of inflammation avoiding exclusion by biological defense mechanism of the host. When pharyngeal epithelial cells were stimulated by cellular components of the periodontal pathogen, production of an inflammatory cytokine from the epithelial cells was increased. It means an inflammatory reaction of the cell was observed. Otherwise, in case of components of a pharyngeal indigenous bacteria, the production of the cytokine was not increased. When the epithelial cells were stimulated by components of the periodontal pathogen after pretreatment by components of a pharyngeal bacteria, the production of the cytokine was not also increased and the inflammatory reaction was restrained. These results suggest that some influence of pharyngeal indigenous bacteria may reduce the inflammatory reaction of pharyngeal cells against the periodontal pathogen and allow the inhabitation of the pathogen in pharynx.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病原細菌 プラーク細菌 咽頭上皮細胞 咽頭常在菌

1. 研究開始当初の背景

近年、口腔細菌叢の網羅的な解析により、これまで考えられていたよりも複雑な生態系が明らかになってきた。口腔細菌は 700 種類ともいわれ、その多くは未分離の状況である。その複雑な細菌叢の中で、歯周病原細菌とされる red complex 細菌の量的な存在比率は決して高くなく、少数の細菌がどうやって病原性を示すのかについては未だ不明な点が多い。Hajishengalisらの提唱する polymicrobial synergy and dysbiosis model (PSD モデル) によれば、正常な細菌叢は本来生体に対して共生関係にあるが、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) に代表される red complex 細菌などの keystone pathogen が正常細菌叢に加わると生体に障害をあたえるようなバランスを失調した細菌叢へと変化するとされている。このような細菌叢シフトのきっかけが key pathogen の定着であれば、それらの細菌はどこからくるのかという疑問が残る。

歯周病治療の手法の一つである full mouth disinfection は、同一口腔内の未処置のポケットから処置済みのポケットへの細菌の伝播を回避するため、歯周病の治療に際し短期間でポケット内の細菌の除去を行い、歯周病原細菌を口腔内から可及的に駆除する方法である。しかし、この方法により一旦、口腔内から歯周病原細菌が駆逐されたとしても、その数は、数ヶ月後には回復することが知られている。また、歯周病患者では、歯周病原細菌などが揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compound, VSC) を産生するため、口臭が強い傾向にあるが、歯周病やその他治療すべき疾患がない者でも、強い口臭が存在する場合がある。その場合、口腔以外の領域に高濃度の VSC を産生できる量の VSC 産生菌が存在すると考えられる。

研究代表者らの研究室では、歯周病やその他の疾患のない口臭患者の咽頭部から拭い液のサンプリングし、リアルタイム PCR 法、T-RFLP 解析、16SrRNA 遺伝子クローンライブラリーシーケンズなどの手法により、細菌叢を調査した結果、咽頭部にも歯周病原細菌が存在することを確認し、咽頭領域がリザーバーとして機能し、歯周病原細菌が口腔やプラークに伝播・回帰する可能性について示した。

咽頭領域に歯周病原細菌が定着する場合、歯の表面にバイオフィームを形成し細胞密度の高い生態系を構築して定着するのは異なり、より細胞密度の低い状態で生息していると考えられる。その際に、歯周病原細菌が持つ病原因子により生体が刺激を受ければ、生体はそれらの細菌を排除するように免疫応答を示すはずである。しかし、実際には排除しないまま定着を許容していることから、そこには歯周病原細菌が常在菌として存在するための何らかのメカニズムが機能していると考えられる。本研究では、そのメカニズムについて、咽頭上皮細胞と *P. gingivalis* 及び咽頭常在菌を用いて、解析を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、代表的歯周病原細菌である *P. gingivalis* が、いかにして生体の排除機構から逃れ、咽頭に常在菌として定着しているかを解明することである。それにより、口腔以外の領域に生息する歯周病原細菌が口腔内へ伝播・回帰することで、プラークバイオフィームのシフトをもたらす、歯周病の再発や改善困難な口臭の原因となっているという仮説を検証することができると考えている。

TLR は感染に対し防御的な反応を誘導する重要な機構である。しかし、過度な反応は炎症を惹起するため、その細胞内のシグナル伝達経路は種々の仕組みにより適切にコントロールされている。研究分担者のグループでは、血管内皮細胞において、transforming growth factor- β (TGF- β) が TLR-4 の MyD88 依存性シグナル伝達経路を抑制することで、炎症を惹起するような細胞応答のコントロールを行うことを示した。咽頭上皮細胞においても同様の TLR 応答抑制機構が存在すると考えられるが、一般的な LPS の場合、宿主細胞の Toll 様受容体-4 (TLR-4) がこれを認識し、免疫応答が惹起されるのに対し、*P. gingivalis* の LPS は TLR-4 の作動性は弱く、逆にグラム陽性菌のペプチドグリカンなどを認識する TLR-2 に結合する活性があるため、異なった応答を示す可能性もある。

また、咽頭常在菌である *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*) は咽頭領域において病原性を示す細菌の増殖を抑制し、咽頭部の細菌叢のバランスを保つことが知られており、加えて、腸管上皮細胞においては、NF- κ B を抑制し炎症応答を制御していると報告されていることから、*P. gingivalis* が、生体よる排除機構から逃れ、炎症反応を引き起こさずに、咽頭に定着するためのメカニズムに関与している可能性がある。

そのため、本研究では、咽頭常在菌である *S. salivarius* と歯周病原細菌である *P. gingivalis* の菌体成分を咽頭上皮細胞に作用させ、上皮における炎症性応答にどのような変化が生じるのかを解析し、咽頭常在菌により咽頭上皮細胞が感作されることで、咽頭での歯周病原による炎症反応の抑制に繋がっていることを示すことを目的としている。

また、臨床的な細菌叢評価として、健常者、歯周病患者などから唾液サンプルと咽頭拭い液サンプルを採取し、リアルタイム PCR、T-RFLP、16SrRNA 遺伝子解析により、口腔内と咽頭における歯周病原細菌の量的な関係性や歯周病原細菌以外の細菌の動向について検討することで、細菌叢の面から、歯周病原細菌の咽頭部から口腔内への伝播・回帰という現象を解析する。

3. 研究の方法

(1) 被験者の選択及びインフォームドコンセント

健常者 25 名：愛知学院大学歯学部附属病院口臭治療科を受診し、特記すべき口臭、歯周病、咽頭部疾患を有さない健常者

歯周病患者 25 名：愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科を受診した未治療の慢性歯周炎患者で、特記すべき咽頭部疾患を有さない者

(2) サンプルング

唾液サンプル：専用ガムを咀嚼させ、刺激唾液 5 ml を漏斗にて採取する。使用まで -20 で保存する。

咽頭拭い液サンプル：咽頭部口蓋扁桃表層の粘液を滅菌コットンスワブで払拭して採取する。その際、咽頭部の炎症の有無を確認する。使用まで -20 で保存する。

(3) DNA 抽出後、歯周病原細菌 5 菌種 (*P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*) について、それぞれの菌種に特異的な遺伝子配列を対象にリアルタイム法にて定量的検出を行う。

(4) 実験に用いる咽頭上皮細胞

DS Pharma Biomedical 社ヒト咽頭上皮癌由来細胞 Detroit562 株、ないし、Promo Cell 社ヒト鼻腔上皮細胞 HNEpC を使用する。(HNEpC:鼻中隔ないし咽頭扁桃由来)

(5) 咽頭上皮細胞における TLR 応答の確認

使用するリガンド：大腸菌 LPS (TLR-4 リガンド)、Pam3Cys (TLR-2 リガンド)、*P. gingivalis* LPS (TLR-4、TLR-2 リガンド)、*P. gingivalis* 線毛タンパク (TLR-2 リガンド)、*P. gingivalis* 培養上清

咽頭上皮細胞にこれらのリガンドを加えて培養し、IL-8 産生、TNF- α 産生、NF- κ B 活性を調べる。TNF- α 産生は、まず、リアルタイム PCR にて、遺伝子発現の上昇をみる。また、培養上清を回収し、hIL-8 ELISA kit、hTNF- α ELISA kit (Roche Applied Science 社) を用いて測定する。NF- κ B 活性は、Nuclear Extract kits 及び TransAM NF- κ B p65/ NF- κ B P50 transcription factor assay kits (Active Motif 社) を用いて測定する。

(6) 咽頭常在菌による TLR 応答抑制の確認

咽頭上皮細胞に代表的な咽頭常在細菌である *S. salivarius* の培養上清ないし全菌体 (死菌) を作用させ、その上で、*P. gingivalis* LPS ないし培養上清、全菌体 (死菌) にて刺激し、(2) で示されたような TLR 応答 (IL-8 産生、TNF- α 産生、NF- κ B 活性化) がどう変化するかを確認する。

(7) 咽頭上皮細胞における TGF- β 1 等のサイトカイン産生の確認

これまでの研究で、LPS による TLR-4 の刺激は TGF- β 1 により抑制され、過剰な免疫応答がコントロールされていることが示されている。(3) で示される現象においても、この機序が関与しているのかどうかを検討するため、咽頭上皮細胞に *S. salivarius* の培養上清ないし全菌体 (死菌) を作用させ、TGF- β 1 等のサイトカイン産生をリアルタイム PCR ないし ELISA 法にて確認する。

(8) TGF- β 1 による影響の解析

咽頭上皮細胞を TGF- β 1 で前処理し、その後、*S. salivarius* の培養上清ないし全菌体 (死菌) で刺激し、(2) で示されたような TLR 応答 (IL-8 産生、TNF- α 産生、NF- κ B 活性化) がどう変化するかを確認する。

(9) シグナル伝達解析

TLR 応答の変化が確認されたら、どのアダプター分子に依存した経路に影響を与えているかを確認するため、アダプター分子の発現を確認する。TGF- β 1 で前処理した咽頭上皮細胞を *P. gingivalis* LPS で刺激後、mRNA を回収し MyD88 の発現をリアルタイム PCR にて確認する。また、タンパクレベルでの発現を確認するため、MyD88、p38MAP キナーゼ、TRAM、TRIF に対する抗体を用いたウェスタンブロットを実施する。

4. 研究成果

(1) 健常者細菌叢の解析

本研究では、健常者や歯周病患者などから唾液細菌及び咽頭細菌を採取し、リアルタイム法や T-RFLP 法等により各々の細菌叢プロファイルを調べる予定であった。健常者サンプルについて

は、別の研究で採取したサンプルと本研究で収集したサンプルで予定したサンプル数を確保したが、歯周病患者からのサンプルについては十分な数の採取ができなかった。

健康者サンプルについては、T-RFLP プロファイルによるクラスタリングで、唾液サンプル、咽頭サンプルの細菌叢をそれぞれ、3つのクラスターに分け、クラスター間で歯周病原菌の検出率と臨床パラメーターの比較を行なった。唾液においては、平均歯周ポケット深さが深いクラスターにおいて *P. gingivalis* の検出率が高かった。一方、咽頭サンプルにおいては、各クラスター間での *P. gingivalis* の検出率に有意な差は認められなかった。このことから、口腔内においては、*P. gingivalis* の存在比率は歯周病に関連するが、咽頭部においては、定常的に口腔内の状態とは関連せずに定常的に存在することが示唆された。

(2) *P. gingivalis* 刺激による咽頭上皮細胞での炎症応答

細胞応答解析では、ヒト咽頭由来の株化上皮細胞である Detroit562 細胞を用いて解析を行なった。まず、*P. gingivalis* LPS による刺激実験を行ない、IL-8 を指標にして炎症応答を調べた。*P. gingivalis* LPS は2種類の LPS を用いた。一つは、高純度精製の LPS、もう一つは標準精製の LPS である。IL-8 の発現は、リアルタイム PCR にて mRNA 発現量を比較を行った。

高純度精製の LPS を用いて刺激実験を行なったところ、咽頭上皮細胞からの IL-8 産生は優位な差を認めなかった。一方、標準純度の LPS で刺激実験を行なったところ、濃度依存的に IL-8 を産生することが確認されたが、無刺激のコントロールと比較して 1.5 から 2 倍の発現量に止まった。

また、*P. gingivalis* の培養上清を用いて同様の実験を行なったところ、培養上清の添加量に依存して IL-8 の発現量が増加した。4%の培養上清添加で約5倍の発現を認めた。継時的な変化としては、刺激1時間で最大となり、その後低下するという結果を示した。

(3) *S. salivarius* 培養上清添加による咽頭上皮細胞での炎症応答

次に、*S. salivarius* が咽頭上皮細胞に及ぼす影響を調べるため、*S. salivarius* 培養上清を咽頭上皮細胞に作用させ、IL-8 を指標にして炎症応答を調べた。何も添加していない状態と比較すると約2倍の IL-8 発現量を認めたが、培地のみを加えたコントロールと比較した場合には、コントロールと同等の発現量であった。このことから *S. salivarius* の培養上清は *P. gingivalis* の培養上清とは異なり、咽頭上皮細胞に対して炎症応答を惹起しないことが示された。

(4) *S. salivarius* 培養上清による、*P. gingivalis* 刺激咽頭上皮細胞炎症応答の抑制

次に、*P. gingivalis* 刺激によって惹起された咽頭上皮細胞の炎症応答に対して *S. salivarius* が及ぼす影響を調べるため、*S. salivarius* 培養上清にて前処理した咽頭上皮細胞に、*P. gingivalis* 培養上清による刺激を与えて、炎症応答を調べた。その結果、*S. salivarius* 培養上清にて前処理を行った咽頭上皮細胞では、前処理を行っていない細胞に比べて、IL-8 mRNA の発現を示さなかった(図1)。また、タンパクレベルでもその現象を確認するため、咽頭上皮細胞の培養上清をサンプルに ELISA を行ったところ、mRNA の場合と同様の結果を示した(図2)。

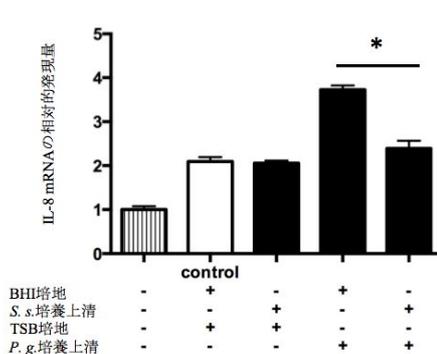


図1

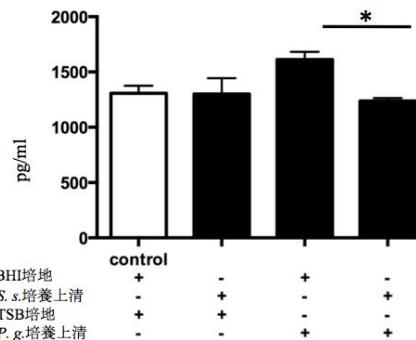


図2

このことから、*S. salivarius* の刺激により、咽頭上皮細胞が何らかの応答をした結果、その後の *P. gingivalis* 刺激に対する応答性が低下したと考えられる。

現時点での研究結果は以上であるが、当初想定していた現象は概ね確認できており、今後も検討を続けていく予定である。今後は、*S. salivarius* 刺激による咽頭上皮細胞からの TGF- β 1 の産生の確認と、それによる *P. gingivalis* 刺激由来の細胞応答の抑制の確認を行い、その際の細胞内情報伝達について検証を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

{雑誌論文}(計 4件)

1) Ohno T, Yamamoto G, Hayashi J, Nishida N, Goto H, Sasaki Y, Kikuchi T, Fukuda

- M, Hasegawa Y, Mogi M, Mitani A.: Angiotensin-like protein 2 regulates Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival epithelial cells. PLOS One. 12(9): e0184825, 2017
- 2) Sasaki Y, Hayashi J, Fujimura T, Iwamura Y, Yamamoto G, Nishida E, Ohn T, Okada K, Yamamoto H, Kikuchi T, Mitani A, Fukuda M.: New irradiation method with indocyanine green-loaded nanospheres for inactivating periodontal pathogens. 18(1): E154, 2017
- 3) Nishida E, Aino M, Kobayashi SI, Okada K, Ohno T, Kikuchi T, Hayashi J, Yamamoto G, Hasegawa Y, Mitani A.: Serum amyloid A promotes E-selectin expression via toll-like receptor 2 in human aortic endothelial cells. Mediators Inflamm. epub: 7150509, 2016
- 4) Iwamura Y, Hayashi J, Sato T, Sato S, Murakami T, Fujimura T, Sasaki Y, Okada K, Takahashi E, Kikuchi T, Aino M, Noguchi T, Shimazaki Y, Mitani A, Fukuda M.: Assessment of oral malodor and tonsillar microbiota after gargling with benzethonium chloride. J Oral Sci. 58(1): 83-91, 2016

〔学会発表〕(計 1 件)

近藤智裕, 林潤一郎, 大野祐, 佐々木 康行, 長谷川義明, 三谷 章雄: 咽頭上皮細胞における歯周病原細菌刺激による炎症性サイトカイン発現に対する咽頭常在菌の検討. 第 149 回日本歯科保存学会学術大会(京都), 2018 年 11 月.

〔図書〕(計 1 件)

林潤一郎, 野口俊英: 歯周病と関連する生活習慣との関係 「改訂版口腔ケア基礎知識」 247-250, 永末書店(東京), 2017 年 4 月.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 三谷 章雄

ローマ字氏名: Akio Mitani

所属研究機関名: 愛知学院大学

部局名: 歯学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50329611

研究分担者氏名: 福田 光男

ローマ字氏名: Mitsuo Fukuda

所属研究機関名: 愛知学院大学

部局名: 歯学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40156790

研究分担者氏名: 内記 良一

ローマ字氏名: Yoshikazu Naiki

所属研究機関名: 愛知医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 10434622

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 岩村 佑樹

ローマ字氏名: Yuki Iwamura

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。