

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11824

研究課題名(和文) 歯周病原細菌によるマスト細胞のIL-31を基軸とした歯肉上皮バリア破綻機序の解明

研究課題名(英文) Porphyromonas gingivalis induces the production of IL-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier

研究代表者

多田 浩之(Tada, Hiroyuki)

東北大学・歯学研究科・講師

研究者番号：70431632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性歯周炎は歯周病関連細菌であるPorphyromonas gingivalisによる感染症であり、歯周病関連細菌により誘導される慢性炎症が歯周組織破壊の主体となる。慢性歯周炎において、マスト細胞は炎症歯肉組織に集積することが示されているが、慢性歯周炎の病態形成におけるマスト細胞の機能的役割については十分に明らかにされていない。本研究では、P. gingivalis感染によりヒトマスト細胞からinterleukin-31(IL-31)が産生されることを発見した。さらに、IL-31はclaudin-1発現を抑制し、歯肉粘膜バリア破綻を誘導することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は、歯周病原細菌による慢性炎症を特徴とする感染症です。慢性炎症が長く続くと歯の周りの組織は破壊され、歯の喪失に至ります。本研究は、歯周病原細菌の感染によりヒトマスト細胞からインターロイキン-31という炎症物質が産生されることを発見しました。インターロイキン-31は歯ぐきの粘膜を維持する粘膜バリアを破壊し、歯周病原細菌の感染を悪化させることを発見しました。歯肉粘膜バリアの破綻は、歯周炎の慢性化に関わる可能性が想定されます。今後、歯周病における慢性炎症のコントロールを目的とした予防・治療への展開が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Interleukin (IL)-31 participates in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases. We investigated the contribution of mast cells to the induction of IL-31 production following infection with the periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis. We found that oral infection with P. gingivalis increased IL-31 expression in the gingival tissues of mice. The P. gingivalis-induced IL-31 production by human mast cells was dependent on the P. gingivalis lysine-specific protease gingipain-K. Notably, the P. gingivalis-induced IL-31 production by mast cells led to the downregulation of claudin-1, a tight junction molecule, in gingival epithelial cells, resulting in an IL-31-dependent increase in the paracellular permeability of the gingival epithelial barrier. These findings suggest that IL-31 produced by mast cells in response to P. gingivalis infection causes gingival epithelial barrier dysfunction, which may contribute to the chronic inflammation observed in periodontitis.

研究分野：口腔微生物学・免疫学

キーワード：慢性歯周炎 Porphyromonas gingivalis Interleukin-31 歯肉上皮細胞 歯肉上皮バリア破綻

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2004年に発見された IL-6 ファミリーサイトカインである IL-31 は、主として活性化 CD4⁺ Th2 細胞、マスト細胞、単球/マクロファージや樹状細胞から産生され、組織では皮膚、肺、神経系や腸管に高レベルで発現する。それに対して、骨髄、胸腺、脾臓、腎臓、精巣や骨格筋などの IL-31 発現レベルは低い。IL-31 は IL-31 receptor α (IL-31RA) と oncostatin M receptor β (OSMR β) の二量体で構成される IL-31 受容体を発現する上皮細胞や血管内皮細胞に作用すると、CCL2 (MCP-1)、CCL4 (MIP-1 β) や CCL17 (TARC) など多様なケモカインが産生され炎症が誘導される。IL-31 はアトピー性皮膚炎、気管支喘息や炎症性腸疾患において発現が亢進し、アトピー性皮膚炎マウスモデルである NC/Nga マウスでは炎症皮膚組織の IL-31 発現が亢進することが明らかにされている。また、IL-31 は掻痒を伴うアトピー性皮膚炎の皮膚組織において発現亢進がみられる。IL-31 は炎症性サイトカインならびにケモカイン産生の誘導を介して慢性炎症を特徴とする疾患の病態形成に関与する。

2. 研究の目的

慢性歯周炎において、マスト細胞は炎症歯肉組織に集積することが示されているが、慢性歯周炎の病態形成におけるマスト細胞の機能的役割については十分に明らかにされていない。本研究では、*P. gingivalis* によるジンジパイン依存的なマスト細胞からの IL-31 産生とマスト細胞由来 IL-31 による歯肉上皮細胞のバリア破綻機構について研究を実施した。

3. 研究の方法

歯周炎マウスモデルは、マウス口腔に *P. gingivalis* を感染後、臼歯辺縁歯肉における IL-31 mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で測定した。また、ヒト肥満細胞株である HMC-1 ならびにヒト歯肉扁平上皮癌細胞株である Ca9-22 を供試した。*P. gingivalis* は生菌ならびに凍結乾燥処理後の全菌体にて細胞に刺激した。野生型株として W83 株ならびに ATCC33277 株、ジンジパイン欠損株として KDP136 株等 (*rgpA rgpB kgp* 変異) を供試した。菌体成分として、*P. gingivalis* 精製 fimbriae、*P. gingivalis* 合成リポペプチドおよび *P. gingivalis* 由来 LPS を供試した。HMC-1 を *P. gingivalis* で刺激した際の IL-31 産生 (ELISA 法) を測定した。

4. 研究成果

P. gingivalis によるヒトマスト細胞からの IL-31 産生誘導

始めに、*P. gingivalis* 口腔感染による歯周炎マウスモデルを用いて、歯肉の IL-31 mRNA 発現を解析した。WBB6F1-+/+ 野生型マウスの口腔に *P. gingivalis* を感染させると、辺縁歯肉の IL-31 mRNA 発現が著明に亢進した。それに対して、c-kit レセプター欠損により結合組織マスト細胞と粘膜マスト細胞が存在しない WBB6F1-W/W^v マウスでは、*P. gingivalis* 感染による辺縁歯肉の IL-31 mRNA 発現に変化はみられなかったことから、マスト細胞は *P. gingivalis* による歯肉の IL-31 産生に直接的ないし間接的に関わる可能性が示唆された。

次に *P. gingivalis* によりマスト細胞から IL-31 が産生される可能性について検討した。ヒトマスト細胞株 HMC-1 細胞に *P. gingivalis* W83 株を感染させると、感染 3 時間後より IL-31 産生が認められ、24 時間後には著明な IL-31 が産生された。*P. gingivalis* によるマスト細胞からの IL-31 産生は MAP キナーゼ JNK ならびに NF- κ B 依存性であり、微小管阻害剤 nocodazole やアクチン重合阻害剤 cytochalasin D を前処理したマスト細胞では、*P. gingivalis* による IL-

31 産生が抑制されなかったことから、同菌のマスト細胞への侵入は IL-31 産生誘導に必要ないことが示された。他方、*P. gingivalis* による IL-31 産生誘導は、*P. gingivalis* 細胞壁成分である線毛、LPS や *P. gingivalis* 型合成リポペプチドでは認められなかった。そこで、*P. gingivalis* を多孔性メンブレンフィルターによりマスト細胞と接触せずに培養したところ、同様に IL-31 産生誘導は認められたことから、IL-31 誘導活性は *P. gingivalis* から産生される液性成分により担われる可能性が示唆された。*P. gingivalis* はシステインプロテアーゼであるジンジパインを産生し、宿主細胞に多様な病原性を示すことが明らかにされている。そこで、*P. gingivalis* による IL-31 産生誘導がジンジパインを介する可能性について、ジンジパイン欠損株である *P. gingivalis* KDP136 を用いて検討した結果、マスト細胞からの IL-31 産生は完全に消失した。また、*P. gingivalis* 野生型株をジンジパイン阻害剤で前処理すると、マスト細胞からの IL-31 産生が抑制されたことから、同菌の IL-31 誘導活性はジンジパインにより担われることが明らかとなった。

P. gingivalis によるマスト細胞からの IL-31 産生と歯肉上皮細胞のバリア破綻

アトピー性皮膚炎、気管支喘息や炎症性腸疾患のように皮膚や粘膜の慢性炎症を特徴とする疾患は、上皮細胞で構築されるバリア機能の低下により病原性微生物、アレルゲンや抗原の透過性および反応性が亢進することが、病態を増悪させる一因となる。上皮細胞によるバリア機能は角質層とタイトジャンクションの二つのバリアにより担われている。細胞間接着装置の一つであるタイトジャンクションは、細胞間隙における物質の選択的透過によりバリア機能を担う。タイトジャンクションは claudin、occludin、junctional adhesion molecule、zonula occludens protein-1 や tricellulin などの細胞間接着分子から構成され、claudin ファミリーはタイトジャンクションのベルト状構造物であるストランドを構成するタンパク質として重要な役割を担う。アレルギー皮膚炎マウスモデルでは、IL-31 投与により炎症皮膚組織の claudin-1 発現が低下し、IL-31 は角質層を構成する分子である filaggrin 発現を抑制させることで上皮バリア機能を破綻させることが示されている。本研究結果から、ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 細胞は構成的に IL-31 受容体を発現し、*P. gingivalis* 感染により IL-31RA 発現が亢進した。そこで、*P. gingivalis* によりマスト細胞から産生された IL-31 が歯肉上皮バリア機能を低下させる可能性について、claudin-1 発現に着目した。ヒト歯肉上皮細胞を *P. gingivalis* 単独の培養上清で刺激すると claudin-1 発現は亢進したのに対して、同細胞をマスト細胞と *P. gingivalis* を共培養した上清で刺激すると、claudin-1 発現は抑制された。この claudin-1 発現抑制作用は、マスト細胞と *P. gingivalis* を共培養した上清に IL-31 中和抗体を添加すると回復したことから、*P. gingivalis* 刺激によりマスト細胞から産生された IL-31 は、歯肉上皮細胞の claudin-1 をダウンレギュレーションさせることが示唆された。そこで、マスト細胞由来 IL-31 により歯肉上皮バリア機能が低下する可能性について検討した。多孔性メンブレンフィルター上に歯肉上皮細胞を培養し、マスト細胞と *P. gingivalis* を共培養した上清で処理後、歯肉上皮細胞に蛍光標識デキストランを添加し、細胞透過性実験を行った。歯肉上皮細胞を *P. gingivalis* 単独の培養上清で処理してもデキストラン透過量は変化しなかったのに対して、同細胞をマスト細胞と *P. gingivalis* の培養上清で処理すると、デキストラン透過量が増加した。マスト細胞と *P. gingivalis* の培養上清に IL-31 中和抗体を添加すると、デキストラン透過量の亢進は抑制された。以上の結果から、*P. gingivalis* によりマスト細胞から産生された IL-31 は、歯肉上皮細胞のバリア機能を破綻させることが示唆された。本研究より *P. gingivalis* によるマスト細胞からの IL-31 産生は、歯肉上皮細胞の claudin-1 発現を負に制御し、タイトジャンクションによるバリア構築を阻害することを明らかにした。

IL-31 を介したマスト細胞と歯肉上皮細胞間のクロストークによる歯肉上皮バリア破綻は、歯周炎の慢性化に関わる可能性が想定され、今後の検討課題といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tada H, Nishioka T, Takase A, Numazaki K, Bando K, Matsushita K.	4. 巻 21(3)
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis induces the production of IL-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e12972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/cmi.12972	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 Nishioka T, Tada H, Ibaragi S, Chen CY, Sasano T.	4. 巻 509(2)
2. 論文標題 Nicotine exposure induces the proliferation of oral cancer cells through the 7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 514-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.154.	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 該当する
1. 著者名 Murakami T, Suzuki K, Niyonsaba F, Tada H, Reich J, Tamura H, Nagaoka I.	4. 巻 18(6)
2. 論文標題 MrgX2-mediated internalization of LL-37 and degranulation of human LAD2 mast cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Med. Rep.	6. 最初と最後の頁 4951-4959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9532	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 該当する
1. 著者名 Miura T, Kawakami K, Tada H (5番目), Tachi M. (員数19).	4. 巻 139(3)
2. 論文標題 Dectin-2-mediated signaling leads to delayed skin wound healing through enhanced neutrophilic inflammatory response and neutrophil extracellular traps formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Invest. Dermatol.	6. 最初と最後の頁 702-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.015	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 Maruyama K, Sakisaka Y, Suto M, Tada H, Nakamura T, Yamada S, Nemoto E.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cyclic Stretch Negatively Regulates IL-1 Secretion Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation by Attenuating the AMP Kinase Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Physiol.	6. 最初と最後の頁 802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00802	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 Tada H, Shimizu T, Matsushita K, Takada H.	4. 巻 38(3)
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis-induced IL-33 down-regulates hCAP-18/LL-37 production in human gingival epithelial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed. Res.	6. 最初と最後の頁 167-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.2220/biomedres.38.167.	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 Tada H, Suzuki R, Nemoto E, Shimauchi H, Matsushita K, Takada H.	4. 巻 38(3)
2. 論文標題 Increases in IL-33 production by fimbriae and lipopeptide from Porphyromonas gingivalis in mouse bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 2	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed. Res.	6. 最初と最後の頁 189-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.2220/biomedres.38.189.	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 Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Funaki-Kato Y, Hagiwara M, Ferdous T, Abdullah M, Mitani A, Michikawa M, Matsushita K.	4. 巻 3
2. 論文標題 Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 NPJ Aging Mech. Dis.	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41514-017-0015-x	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 該当する

1. 著者名 Hiroyuki Tada, Takamitsu Shimizu, Isao Nagaoka, Haruhiko Takada	4. 巻 37
2. 論文標題 Vitamin D3 analog maxacalcitol (OCT) induces hCAP-18/LL-37 production in human oral epithelial cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biomed. Res.	6. 最初と最後の頁 199-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.2220/biomedres.37.199.	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 Hiroyuki Tada, Takashi Matsuyama, Takashi Nishioka, Makoto Hagiwara, Yusuke Kiyoura, Hidetoshi Shimauchi, Kenji Matsushita	4. 巻 11(4)
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis gingipain-dependently enhances IL-33 production in human gingival epithelial cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0152794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pone.0152794.	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9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hiroyuki Tada, Kenji Matsushita, Shunji Sugawara.
2. 発表標題 Cysteine proteinases from Porphyromonas gingivalis induces the production of IL-31 by mast cells, resulting in downregulation of claudin-1 in gingival epithelial cells.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田浩之
2. 発表標題 歯周病原細菌に対する自然免疫応答がもたらす慢性炎症と生体バリア破綻
3. 学会等名 第25回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田浩之、西岡貴志、松下健二、菅原俊二
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatum感染によりマスト細胞が産生する細胞外トラップは、MIF依存的に炎症を誘導する
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田浩之、西岡貴志、沼崎研人、根本英二、松下健二、菅原俊二
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisジンジバインによりマスト細胞が産生するIL-31は、歯肉上皮細胞のclaudin-1発現を抑制しバリア破綻を誘導する
3. 学会等名 第73回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田浩之
2. 発表標題 口腔細菌叢から全身の健康を科学する
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田浩之、西岡貴志、松下健二
2. 発表標題 歯周病原細菌によるヒトマスト細胞からの細胞外トラップ産生と炎症誘導
3. 学会等名 第24回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田浩之、沼崎研人、西岡貴志、根本英二、松下健二、菅原俊二
2. 発表標題 P. gingivalis感染によりマスト細胞から産生されたIL-31はclaudin-1発現抑制を介して歯肉上皮バリア破綻を誘導する
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田浩之、西岡貴志、根本英二、松下健二
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisによるマスト細胞由来interleukin-31を介した歯肉上皮細胞のclaudin-1ダウンレギュレーション作用
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田浩之、西岡貴志、松下健二、菅原俊二
2. 発表標題 Neutrophil extracellular trapsによるヒト血管内皮細胞のDel-1ダウンレギュレーション作用
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 多田浩之、高瀬彩、松下健二、高田春比古	4. 発行年 2016年
2. 出版社 医学図書出版株式会社	5. 総ページ数 62
3. 書名 エンドトキシン・自然免疫研究19	

1. 著者名 多田浩之、西岡貴志、松下健二、尾之上さくら、川原一芳	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学図書出版株式会社	5. 総ページ数 82
3. 書名 エンドトキシン・自然免疫研究22	

〔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	西岡 貴志 (Nishioka Takashi) (50641875)	東北大学・歯学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	松下 健二 (Matsushita Kenji) (90253898)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・部長 (83903)	