

令和元年6月27日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20418

研究課題名(和文) 歯周病原細菌群に特異的な免疫制御機構の探索

研究課題名(英文) Investigation of immunoregulation mechanism in periodontal disease

研究代表者

成田 由香 (NARITA, Yuka)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：50758050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病はおもに歯周病原細菌の複合感染によって生じる慢性疾患である。近年、歯周病の病態形成にはTh17細胞が関与することが報告されている。Red complex細菌は、宿主内での生存戦略として共凝集により相互に有利な環境を形成することから、Red complex細菌の3菌種全てを解析対象とした。本研究において、*Tannerella forsythia*および*Treponema denticola*において細胞分画した菌体成分を用い、歯周病の進展に関与するTh17細胞を強く誘導する菌体成分を見出した。この成果を発展させT細胞抗原エピトープ同定することにより、歯周病の治療・予防へと応用可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は国民の多くが罹患する慢性疾患であるが、この口腔疾患が糖尿病などの全身疾患と相互に影響しうる。本研究では、重度の歯周病患者に特徴的に見られる歯周病原細菌に着目し、歯周病病態形成に関わる宿主のヘルパーT細胞Th17を誘導する歯周病原細菌由来の抗原を探索した。微生物と宿主の両側から歯周病発症のメカニズムを明らかにすることで、この成果を将来歯周病ワクチンなどの予防や治療分野に応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is a chronic inflammatory disease caused by oral pathogenic bacteria, and immune response contributes to their onset and progression. The red complex, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*, are most important pathogens in severe periodontitis and co-aggregate with each other for their survival effectively. The immunoreponse of Th17 cells contributes to its clinical condition in periodontitis. Therefore, we conducted a comprehensive analysis how 3 species of the red complex affected T helper cell differentiation. In this study, we identified several cell components of the red complex to induce Th17 differentiation.

研究分野：微生物学

キーワード：歯周病原細菌 獲得免疫

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

1. 研究開始当初の背景

歯周病は複合感染による疾患であり、初期段階での自覚が困難でありながら中高年を中心に罹患率の高い沈黙の疾患である。歯周病が糖尿病などの全身疾患との関わりを持つことが明らかとなり関心が高まってはいるものの、慢性感染症である歯周病罹患率が減少傾向に至らない現状は「健康日本 21」第二次中間報告においても明らかである。

Socransky らは重度歯周炎患者に特徴的に検出される 3 つの細菌を Red complex と命名した。この細胞群には、*Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. gingivalis*)、*Tannerella forsythia* (以下 *T. forsythia*) および *Treponema denticola* (以下 *T. denticola*) の偏性嫌気性細菌が該当する。これまでに細菌学的な視点から、歯周病原細菌の解析は *P. gingivalis* を中心に、強力なプロテアーゼであるジンジパインや FimA 線毛などの宿主細胞の侵入・破壊機構や特徴的な LPS による細菌の生存戦略や慢性炎症メカニズムなど、多くの報告がなされてきた。培養が困難な細菌として知られる *T. forsythia* も *P. gingivalis* 菌体あるいは産生されたベジクルと共存することで上皮細胞への侵入性を獲得することが報告されている。興味深いことに、歯周局所において Red complex 細菌群は、個々に特有の酵素を持ち、代謝産物を互いに共有し共凝集することで歯周病原性に関与することが示唆されている。複合感染である歯周病の予防や治療戦略において、Red complex 細菌群の *P. gingivalis* 単独ではなく *T. forsythia* および *T. denticola* を含めた複数の細菌へのアプローチが必要と考えられる。

これまでに、歯周病のメカニズムについては、ヘルパー T 細胞欠損マウスが歯周病抵抗性を示すこと、歯周病患者の口腔内には IL-17 を産生する Th17 が多く存在することが報告されている。Th17 による免疫応答と歯周病病態の関与が示唆されているが、詳細なメカニズムは不明な点が多い。近年、Th17 の生体内における分化が主に小腸であることが報告されたことから、歯周病は口腔局所の細菌感染のみが要因として成り立つのではなく、腸管が免疫応答の場として機能し、腸管に達した歯周病細菌による全身免疫応答を介して分化した Th17 が歯周病の病態形成に関与する仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は歯周病の発症・増悪のメカニズムを理解するために、口腔局所のみならず腸管を介した全身における免疫細胞が疾患を制御することを証明するために、本研究代表者がこれまでに病原因子の分泌機構の研究において対象としてきた Red complex に属する歯周病細菌である *Tannerella forsythia*、さらには *Treponema denticola* を含め Red complex に属する 3 つの細菌全てを研究対象とする。歯周病原細菌と宿主免疫応答の両側面からの網羅的アプローチにより、全身免疫応答による歯周病原細菌群特異的な免疫制御機構を解明することで、歯周病に対する新しい治療法やワクチン開発へ向けた分子基盤の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヘルパー T 細胞の分化を司る Red complex 細菌の T 細胞抗原エピトープの同定

重度歯周炎において特徴的に検出される Red complex 細菌のうち、*T. forsythia* ATCC43037 株および新たに入手した *T. denticola* ATCC35405 株の 2 菌種を用いた。いずれもゲノムシーケンスが終了し、遺伝子操作も可能な株である。ヘルパー T 細胞の Th17 細胞への分化にかかわる免疫原性部位の同定のため、これらの歯周病原細菌を以下の手法により細胞分画を行った。菌体を培養後、遠心・洗浄し、ビーズ破碎を行い、遠心して未破碎菌体を除去後、さらに超遠心、界面活性剤処理などにより分離し細分画した。培養上清中のタンパク質についてはフィルター処理後、超遠心により回収した。

ヘルパー T 細胞の分化は、以下の条件で行った。In vitro において Red complex 細菌由来分画成分を抗原とし、野生型マウスから採取した骨髄由来樹状細胞に提示させ、野生型マウス由来のヘルパー T 細胞の Th17 細胞への分化を IL-17A 産生を指標に Flowcytometry で評価した。

(2) 実験的歯周病モデルマウスの構築

経消化管的に *P. gingivalis* W83 株を連続投与し、歯周病原細菌感染による実験的歯周病マウスモデルの構築を行った。上顎を対象に実体顕微鏡および μ CT での 3 次元再構築を行い、歯槽骨吸収量を測定し歯周病発症の評価を行った。

(3) Red complex 細菌反応性ヘルパー T 細胞の養子移入による歯周病発症の解析系の構築

P. gingivalis 由来の分画成分により誘導された IL-17A-GFP マウス由来の Th17 細胞をセルソーターで回収する。野生型マウスに養子移入し *P. gingivalis* を口腔感作させることで、移入した Th17 の歯周組織への集積を IL-17A-GFP を指標に Flowcytometry で評価する。歯周病病態は実体顕微鏡および μ CT での 3 次元再構築を行い評価する。

4. 研究成果

(1) ヘルパー T 細胞の分化を司る Red complex 細菌の T 細胞抗原エピトープの同定

In vitro において Red complex 細菌由来の分画成分を野生型マウスから採取した骨髄由来樹状細胞に提示させ、野生型マウス由来のヘルパー T 細胞の Th17 細胞への分化を IL-17A 産生を指標に Flowcytometry で評価したところ、*T. forsythia* および *T. denticola* の 2 菌種の全菌体抽出物および分画成分を用いた比較解析の結果、高い IL-17A 産生が見られる画分を見出した。

これら 2 菌種から見出された分画成分の Th17 細胞の分化能は、先行研究において見出した *P. gingivalis* での分画成分を用いた際の分化能には及ばないものの、いずれの 3 菌種においても腸管を介した免疫応答を生じさせることで Th17 分化誘導能の上昇を認めることが明らかとなった。今後は、さらなる分画とプロテオミクス解析の手法を用い、T 細胞抗原エピトープを含むタンパク質を絞り込み、大腸菌で発現したタンパク質を用いて検証を進め、オーバーラッピングペプチドにより T 細胞抗原エピトープを同定する計画である。

また、我々の研究グループでは先行する研究において *P. gingivalis* を対象として約 20 種 T 細胞抗原エピトープ候補を見出し、現在解析を進めている。本研究課題において対象としている *T. forsythia* は *P. gingivalis* とともに *Bacteroidetes phylum* に属する極めて近縁の細菌である。この *P. gingivalis* の T 細胞抗原エピトープ候補の中には、比較解析の結果 *T. forsythia* と相溶性の高いアミノ酸配列を有する候補を認めた。相溶性の高い配列が T 細胞抗原エピトープ配列に該当する場合、2 種類の歯周病細菌が同一のエピトープ配列を保有し歯周病病態形成に関与する可能性も示唆される。

(2) 実験歯周病モデルマウスの構築

腸管を主体とした免疫応答による歯周病病態の評価を目的とし、経消化管的に *P. gingivalis* を投与した歯周病原細菌感染による実験的歯周病マウスモデルにおいて、Red complex 細菌感受群の歯槽骨吸収量が優位に高い結果を得た。病態形成は口腔に限局したものはなく、腸管における Th17 の分化による全身免疫応答により歯周病病態が成立することが示唆された。

(3) Red complex 細菌反応性ヘルパー T 細胞の養子移入による歯周病発症の解析系の構築

Red complex 細菌反応性 Th17 の養子移入による歯周病発症の解析のため、*P. gingivalis* 由来の分画成分により誘導された IL-17A-GFP 陽性細胞をセルソーターで回収した。今後は適切なスケールで細胞を回収し、野生型マウスに移入後、*P. gingivalis* の口腔感染を行うことで、歯周組織への移入細胞の集積による病態への影響を評価する。

以上の解析により、複合感染症である歯周病において、*P. gingivalis* と同じく重度歯周炎から特徴的に検出される細菌でありながらも未知な点が多い *T. forsythia* さらには *T. denticola* について細胞分画を行い、Th17 分化能を有する免疫原性部位を含む画分を見出した。さらに分画を進め、プロテオミクス解析による詳細な解析を行い、タンパク質レベルさらにはペプチドレベルでの抗原の探索を行う予定である。複数の Red complex 細菌群の解析から得られた T 細胞抗原エピトープ情報は、複合感染による歯周病に対する新たな歯周病ワクチン開発へと応用可能である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Tasaki S, Cho T, Nagao J, Ikezaki S, Narita Y, Arita-Morioka K, Yasumatsu K, Toyoda K, Kojima H, Tanaka Y. Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. *FEMS Yeast Res.* 18: foy018, 2018 (査読あり). doi:10.1093/femsyr/foy018.

Sato K, Kakuda S, Yukitake H, Kondo Y, Shoji M, Takebe K, Narita Y, Naito M, Nakane D, Abiko Y, Hiratsuka K, Suzuki M, Nakayama K. Immunoglobulin-like domains of the cargo proteins are essential for protein stability dualing secretion by the type IX secretion system. *Mol. Microbiol.* 110:64-81, 2018

Imamura K, Sato K, Narita Y, Kondo Y, Nakane D, Naito M, Fujiwara T, Nakayama K. Identification of a major glucose transporter in *Flavobacterium johnsoniae*: Inhibition of *F. johnsoniae* colony spreading by glucose uptake. *Microbiol. Immunol.* 62:507-516, 2018 8 査読あり). doi:10.1111/1348-0421.12633.

Hashimoto M, Nagao J, Ikezaki S, Tasaki S, Arita-Morioka K, Narita Y, Cho T, Yuasa K, Altman A, Tanaka Y. Identification of a novel alternatively spliced form of inflammatory regulator SWAP-70-like adapter T cells. *Int. J. inflam.* Article ID 13247355, 10 pages, 2017 (査読あり). doi:10.1155/2017/1324735.

[学会発表](計 20 件)

豊田馨大, 成田由香, 永尾潤一, 有田(森岡)健一, 池崎晶二郎, 安松香奈江, 田崎園子, 長環, 田中芳彦. 歯周病原細菌に対する T 細胞応答に関する抗原タンパク質の同定. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2018

永尾潤一, 成田由香, 豊田馨大, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 池崎晶二郎, 田崎園子, 長環, 田中芳彦. 歯周病発症に関わる T 細胞免疫応答の制御機構の解明. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2018

安松香奈江, 永尾潤一, 豊田馨大, 成田由香, 有田(森岡)健一, 池崎晶二郎, 田崎園子, 長環, 城戸寛史, 田中芳彦. 細菌感染がもたらす母体免疫活性化が胎児脳システムへ与える影響について. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2018

田崎園子, 長環, 永尾潤一, 池崎晶二郎, 成田由香, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 豊田

馨大,小島 寛, 田中芳彦.*Candida albicans* 成分特異的 T 細胞の病態抑制効果の検討. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2018

長 環, 田崎園子, 池崎晶二郎, 成田由香, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 豊田馨大, 田中芳彦. *Candida albicans* 菌糸形細胞由来画分からの T 細胞エピトープ候補探索. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2018

Tasaki S, Cho T, Nagao J, Narita Y, Ikezaki S, Yasumatsu K, Toyoda K, Arita-Morioka K, Kojima H, Tanaka Y. Exploration of a novel T cell antigen of *Candida albicans* against oral candidiasis. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2018

Yasumatsu K, Nagao J, Narita Y, Arita-Morioka K, Ikezaki S, Tasaki S, Toyoda K, Cho T, Kido H, Tanaka Y. The influence of maternal inflammation by bacterial infection on fetal brain development. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2018

成田由香, 永尾潤一, 有田(森岡)健一, 池崎晶二郎, 田崎園子, 安松香奈江, 長 環, 田中芳彦. 実験的歯周病モデルマウスを用いた病態を惹起する菌体成分の同定. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2017

永尾潤一, 成田由香, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 田崎園子, 池崎晶二郎, 長 環, 田中芳彦. 歯周病病態形成における免疫制御機構の解明. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2017

池本梨央奈, 豊屋有希, 永尾潤一, 成田由香, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 田崎園子, 池崎晶二郎, 長 環, 田中芳彦. う蝕ならびに歯周病を抑制する口腔内細菌の探索. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2017

田崎園子, 長 環, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 小島 寛, 田中芳彦. 口腔カンジダ症に対して T 細胞応答を誘導する抗原探索. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2017

安松香奈江, 大多和昌人, 成田由香, 長 環, 加倉加恵, 山本勝己, 田中芳彦, 城戸寛史. インプラント周囲炎治療に関する基礎的研究. 第 34 回日本口腔インプラント学会・九州支部学会大会. 2017

Tasaki S, Cho T, Nagao J, Narita Y, Hashimoto M, Ikezaki S, Yasumatsu K, Toyoda K, Arita-Morioka K, Kojima H, Tanaka Y. Investigation of mechanisms underlying the T cell response in oral candidiasis. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

成田由香, 永尾潤一, 田崎園子, 有田(森岡)健一, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 長 環, 田中芳彦. 歯周病をひきおこす病原微生物の菌体成分の同定. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2016

永尾潤一, 成田由香, 田崎園子, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 長 環, 田中芳彦. 病原微生物による歯周病の免疫学的解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2016

田崎園子, 長 環, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 小島寛, 田中芳彦. 口腔カンジダ症を制御する T 細胞応答の誘導. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2016

大多和昌人, 成田由香, 安松香奈江, 長 環, 加倉加恵, 山本勝己, 田中芳彦, 城戸寛史. インプラント表面の除染に関する基礎的研究—インプラント表面汚染モデルの作成—. 第 46 回日本口腔インプラント学会大会. 2016

田崎園子, 長 環, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 小島寛, 田中芳彦. 口腔カンジダ症を制御する免疫機構の解明. 第 23 回日本歯科医学総会, 2016

Tasaki S, Cho T, Nagao J, Narita Y, Hashimoto M, Ikezaki S, Yasumatsu K, Toyoda K, Arita-Morioka K, Kojima H, Tanaka Y. Investigation of mechanisms of T cell response in oral candidiasis. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2016

長 環, 田崎園子, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田(森岡)健一, 小島寛, 田中芳彦. *Candida albicans* 由来 CD4⁺T 細胞分化誘導画分の解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2016

〔その他〕

ホームページ等

https://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/teacher_basic_medical_dentistry

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。