

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11686

研究課題名(和文) 三次元培養系を用いた歯周病由来関節リウマチ予防法の開発

研究課題名(英文) Development of prevention methods against periodontal-disease derived rheumatoid-arthritis using 3-demensional culture model of human gingival tissue.

研究代表者

津田 啓方 (TSUDA, Hiromasa)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：60325470

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)：関節リウマチ(RA)と歯周病との関連がいられている。これまで、歯周病原細菌の産生する酪酸の作用が歯肉上皮の細胞死を引き起こし、それに伴い、炎症促進およびRA発症に重要である因子の放出が認められている。本研究では、その細胞死誘導メカニズムを探る事を目的としている。酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸がヒト歯肉細胞の細胞死を誘導し、その誘導にはオートファジー、活性酸素種の産生、およびヒストンアセチル化酵素の活性化が必要であることが解った。また、ヒト歯肉の三次元培養系を作成し、株化細胞を用いた二次元培養系より生体に近いと考えられている実験系を用いて、これまでの結果を確認できる状況作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、歯垢が蓄積している状況下での歯肉上皮細胞の細胞死の誘導メカニズムの一端を解明した。これらの細胞死に伴って関節リウマチ発症関連因子や炎症促進因子の放出が起こることから、細胞死誘導情報伝達経路の阻害による関節リウマチ予防法および、歯肉における炎症惹起の予防法を開発できる可能性が大きく高まった。今後の研究の進展により、これまでわかっていなかった歯周病が関与する関節リウマチメカニズムの解明およびその予防法開発が期待できる状況を作ることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is thought to be associated with periodontal disease. We previously demonstrated that butyrate, a short-chain fatty acid, which is produced by periodontopathic bacteria, induces death of human gingival epithelial cells, resulting in release of molecules that are important for RA onset. The aim of this study is to prove the death-inducing mechanisms by butyrate and other short-chain fatty acids. Not only butyrate, propionate, isobutyrate, and isovalerate also induced death of human gingival epithelial cells. The induction of the death induced by short chain fatty acid treatment required reactive oxygen species generation, autophagy induction, and acetylation activity of histone acetyltransferases. In addition, we have constructed 3-demensional culture model which is similar to original gingival tissue.

研究分野：口腔生化学

キーワード：細胞死 関節リウマチ 歯肉上皮 三次元培養系 短鎖脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) における骨破壊の進行は速く、早期に適切な治療を行わなければ患者の QOL を極度に下げることから RA 予防法の開発が強く求められているが、発症メカニズムは未解明である。現在、自己抗体である抗シトルリン化タンパク抗体 (ACPA) が RA 発症前から増加してくること等から、ACPA が RA 発症に関わると疑われている。

歯周病と RA は両者間に疫学的相関があるだけでなく、遺伝的要素やリスクファクターなど共通点が多い。近年、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が口腔内で唯一タンパク質シトルリン化酵素を持つことが報告されたこと等から、*P. gingivalis* が RA の発症に関与している可能性が話題となっているが、初診時に歯周病の患者は RA にて治療対象となるリスクが歯周病的健常者より約 2.7 倍高かったものの *P. gingivalis* と RA の間には相関は認められないというコホート研究もあり、両疾患の関連については未だわからないことが多い。

我々の研究から、歯垢が蓄積して歯肉上皮に接したと同様の条件下、つまり、歯周病原細菌の代謝産物である酪酸が歯垢中細菌との栄養競合による低血清作用状態にある歯肉上皮に作用する条件下では、酪酸は歯肉上皮細胞の非アポトーシス細胞死を起し、低栄養条件はそれをさらに増強することが解っていた。また、細胞死の過程で炎症を促進する分子とともに、RA 発症に重要な自己抗体産生への関与がいわれている peptidyl-arginine deiminase 4 (PAD4) およびシトルリン化ヒストンが培養上清中に放出していたことが予備実験的にわかっていた。これらの結果から、歯垢が上皮細胞に接する事により、RA の自己抗体誘導因子が生成されるのではないかと着想し、調べることにした。また、上述の研究は株化細胞を用いたものであるため、よりヒト生体に近いとされている初代培養細胞を用いた三次元培養系でこれまでの実験結果を確かめる必要があった。

## 2. 研究の目的

### (1) 細胞死誘導メカニズムを明らかにする。

活性酸素種 (ROS) のスカベンジャーの作用や、オートファジーの抑制が誘導された細胞死が顕著に抑制することが予備実験的にわかっていた。そこで、低 FBS 条件下での酪酸および他の歯周病原細菌の産生する短鎖脂肪酸刺激にて歯肉上皮細胞株の細胞死が誘導されるかどうかを調べた上で、ROS やオートファジーが短鎖脂肪酸刺激による細胞死誘導メカニズムにどのように関与しているかについて調べることにした。また、酪酸はヒストンデアセチラーゼ (HDAC) の阻害としても有名なもので、HDAC 抑制活性の関与についても調べることにした。これらにより、短鎖脂肪酸誘導細胞死の誘導メカニズムの解明を目指すことを目的とした。

### (2) 上皮 結合組織三次元培養実験系の作成し、それを用いた短鎖脂肪酸の影響を調べる。

まずは、患者由来の歯肉片より上皮細胞と結合組織を分離し、これらの細胞を用いて上皮-結合組織三次元培養実験系の作成を行うことにした。ついで、低 FBS 条件下での酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸の作用が細胞死や PAD4 およびシトルリン化タンパクの放出を誘導するかどうかを明らかにすることとした。マウス実験では無く、ヒト細胞を用いるところに意義があること

の重要性を意識した系で行うことが望まれていた。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞死誘導メカニズムの探索にはヒト歯肉上皮 Ca9-22 株細胞を用いた実験を行った。非アポトーシス細胞死量は、酪酸などの歯周病原細菌が産生する短鎖脂肪酸を Ca9-22 細胞に作用させ、2 本鎖 DNA インターカラーである SYTOX-green 色素を用いて定量した。まず、ROS スカベンジャー、ATG5 に対する siRNA を用いたオートファジー抑制が短鎖脂肪酸誘導細胞死に及ぼす影響を調べた。また、短鎖脂肪酸誘導オートファジーの誘導が ROS-dependent かどうかを調べるために、ROS スカベンジャー作用下で短鎖脂肪酸を Ca9-22 細胞に作用させ、microtubule-associated protein 1 light chain-I (LC3-) の LC3- へのコンバージョンを指標にオートファジーの誘導を確認した。さらに、ヒストンアセチル化に關与する Histone acetyltransferase (HAT) を C646 P300 阻害剤であらかじめ抑制した条件下で短鎖脂肪酸を作用させ、SYTOX-green 色素を用いて細胞死量を調べた。

(2) 日本大学歯学部付属病院にて抜歯や歯肉切除を伴う処置により発生した歯肉片を用いて三次元培養系の作成を試みた。この研究は日本大学倫理委員会の承認を得、承認を得た手順通りに行った。外来より得た歯肉片をディスパーゼ処理し、顕微鏡下にて上皮と結合組織部分を分離した。それぞれをさらに細かく切断し、カバーストリップでそれぞれの断片を培養ディッシュの底面に固定し、外生してきた細胞を集めた。それらを増やして三次元培養系の構築に用いた。酸溶解コラーゲンを炭酸水素ナトリウム塩で中和しながら線維芽細胞の懸濁液と混和し、0.4  $\mu\text{m}$ -pore size のトランスウェルインサート上に流し、37 で 30 分 ~ 1 時間コラーゲンを硬化させた。次に歯肉上皮細胞の懸濁液を載せ、37 で 1 overnight 程温めることにより上皮細胞を線維芽細胞含有コラーゲンに定着させた。その後、トランスウェルインサートの下のチャンパーに培地を作用させ、5 日程度静置した後、上のチャンパー内の培地をアスピレートし、上皮の重層化を促した。そこから数日培養したものを実験に使用した。トランスウェルインサートから円錐台形をした 3 次元培養体を取り出し、その矢状断の切片を幾つか作成し、HE 染色および、cytokeratin/vimentin/DAPI を用いて免疫染色を行った。

### 4. 研究成果

(1) 歯周病原細菌が産生する短鎖脂肪酸のうち、酪酸のみならずプロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸も細胞死を引き起こすことが解った (図 1)。また、歯周病原細菌の培養上清中の短鎖脂肪酸を測定し、その中に含まれる短鎖脂肪酸と同じ組成の混合物を作成し、それらを歯肉上皮細胞株に作用させると、*P. gingivalis* 及び *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) の培養上清様短鎖脂肪酸混合物は細胞死を引き起こしたが、*Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) および *Aggregatibacter*

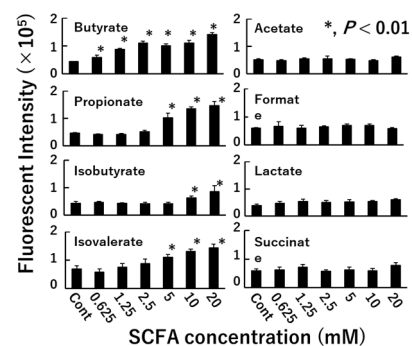


図 1. 低FBS濃度における短鎖脂肪酸誘導細胞死の測定

*actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)の培養上清短鎖脂肪酸混合物は細胞死を引き起こさなかった(図2)。これは、細菌培養上清そのものを歯肉上皮細胞に作用させた時もおおむね同様の結果が得られた(未掲載)。これらの事から、低栄養条件下では、歯周病原細胞のうち *P. gingivalis* 及び *F. nucleatum* の培養上清は歯肉上皮細胞の細胞死を引き起こし、その原因が培養上清に含まれる短鎖脂肪酸である可能性が示唆された。

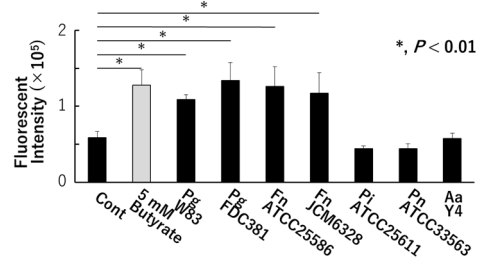


図2. 細菌培養上清に含まれる短鎖脂肪酸混合物による誘導される細胞死

(2) 上記(1)で細胞死を誘導した短鎖脂肪酸について、ROSの発生を調べたところ、酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸の作用時にROS産生が誘導することが解ったが、低FBS条件のみでもかなりのROSが産生されていた(未掲載)。また、酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸によって誘導される細胞死はROSのスキャベンジャーであるアスコルビン酸およびN-アセチルシステインによって濃度依存的に抑制された(図3)。これらの事から、短鎖脂肪酸のうち、酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸はROS産生を誘導する因子であり、ROSの産生が細胞死に必要であることが解った。しかしながら、上記以外の短鎖脂肪酸では細胞死が起きないことから(図1)、細胞死の誘導にはROSが必要だが、十分ではないことが解った。

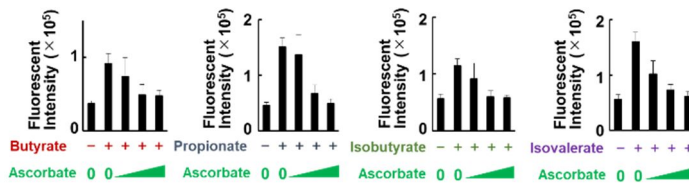


図3. ROSスキャベンジャーによって短鎖脂肪酸誘導細胞死は抑制される。

酸のうち、酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸はROS産生を誘導する因子であり、ROSの産生が細胞死に必要であることが解った。しかしながら、上記以外の短鎖脂肪酸では細胞死が起きない

ことから(図1)、細胞死の誘導にはROSが必要だが、十分ではないことが解った。

(3) 短鎖脂肪酸誘導の細胞死にオートファジーが関与しているかどうかを調べるために、ATG5のsiRNAを作用させたところ、短鎖脂肪酸誘導の細胞死は抑制された(図4)。ROSの

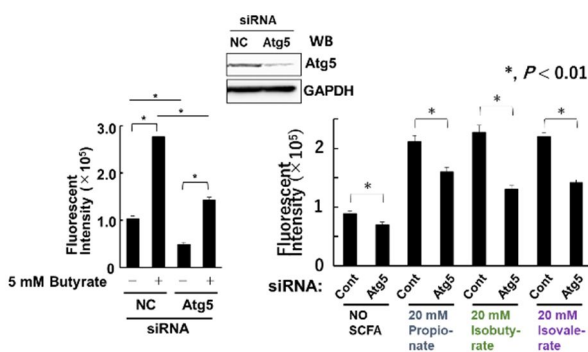


図4. 短鎖脂肪酸誘導細胞死にはオートファジーが関与している。

産生は刺激後すぐから始まる一方、オートファジーは数時間後頃に誘導されることから、オートファジーの誘導にROSが必要である可能性を調べたところ、ROSスキャベンジャーは酪酸誘導のオートファジーを抑制した。これらの事から、酪酸によるオートファジー誘導にはROSの産生が必要であることが解った(未掲載)。

(4) 酪酸は有名な HDAC 阻害剤であることから、まず、短鎖脂肪酸を作用させた細胞中のアセチル化ヒストンについて調べてみたところ、細胞死を引き起こす酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸の作用ではヒストンのアセチル化が亢進していた(図5)。HAT 阻害剤である C646 で前処理した細胞に短鎖脂肪酸を作用させると、濃度依存的に短鎖脂肪酸誘導細胞死が抑制された(図6)。これらの事から、細胞死誘導には P300 HAT によるヒストンをはじめとする P300 のターゲットのアセチル化が必要であることが示唆された。

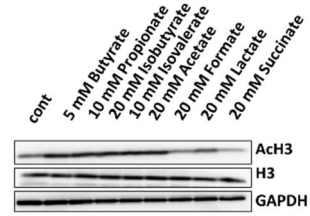


図5. ヒストンH3のアセチル化を誘導する短鎖脂肪酸

(5) 以上の実験結果から、短鎖脂肪酸誘導の歯肉上皮細胞死には P300 のアセチル化作用、ROS の産生、およびオートファジーが必要であることが示唆された。また、オートファジー誘導には ROS が関与していることが示唆された。これらの事から、短鎖脂肪酸誘導細胞死による関節リウマチ発症関連因子である PAD4 等の因子が放出されることを押さえるにはこれらをターゲットにすることが良いと考えられた。

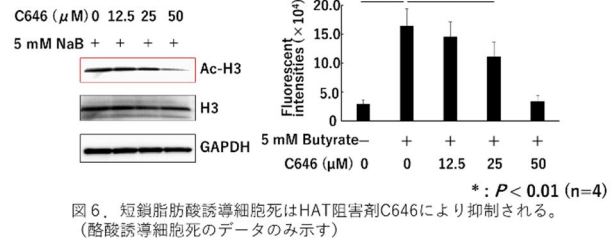
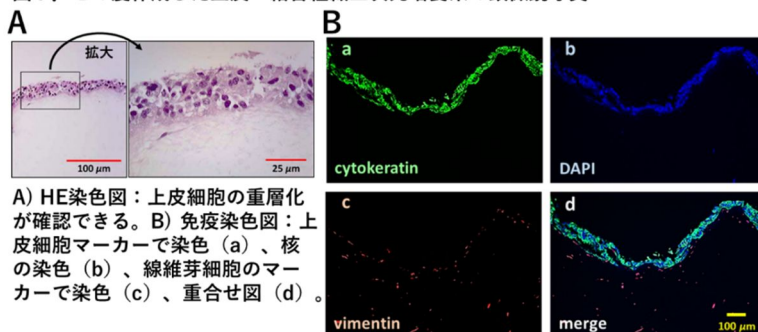


図6. 短鎖脂肪酸誘導細胞死はHAT阻害剤C646により抑制される。(酪酸誘導細胞死のデータのみ示す)

(6) 三次元培養系のために初代の歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞を得た。しかしながら、線維芽細胞は問題なく初代培養できるが、歯肉上皮細胞においては、なかなか採取および保存が難しく、安定して得ることができなかった。このことから、まず、線維芽細胞は初代細胞を用い、上皮細胞はヒト歯肉上皮 Ca9-22 細胞株を用いたところ、上皮 - 結合組織三次元培養体を比較的安定的に作成することに成功した。そのようにして得られた三次元培養体の切片を作成し、cytokeratin で上皮細胞を vimentin で線維芽細胞を免疫染色し、DAPI で細胞核を染色した多重染色を行ったところ、通常の歯肉同様の構造を示した(図7)。今後は初代培養上皮細胞を用いた安定的な三次元培養系作成条件を調べていき、それを使って三次元培養系を用いた歯周病および歯周病由来関節リウマチ発症メカニズムの探索を行っていく。

図7. この度作成した上皮-結合組織三次元培養系の顕微鏡写真



A) HE染色図：上皮細胞の重層化が確認できる。B) 免疫染色図：上皮細胞マーカーで染色 (a)、核の染色 (b)、線維芽細胞のマーカーで染色 (c)、重合図 (d)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Mikami Y, Omagari D, Mizutani Y, Hayatsu M, Ushiki T, Tsuda H	4. 巻 138
2. 論文標題 Dual effect of polyphosphate on mineralization of rat osteoblast ROS17/2.8 cells in a dose-dependent manner.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 209-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jphs.2018.10.002	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 Hayata M, Watanabe N, Kamio N, Tamura M, Nodomi K, Tanaka K, Iddamalgoda A, Tsuda H, Ogata Y, Sato S, Ueda K, Imai K.	4. 巻 73
2. 論文標題 Cynaropicrin from <i>Cynara scolymus</i> L. suppresses <i>Porphyromonas gingivalis</i> LPS-induced production of inflammatory cytokines in human gingival fibroblasts and RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Nat Med	6. 最初と最後の頁 114-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s11418-018-1250-6	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 津田啓方	4. 巻 43
2. 論文標題 歯周病と関節リウマチの新たな橋渡し	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 メディカルサイエンスダイジェスト	6. 最初と最後の頁 15-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 室伏貴久、津田啓方、鈴木直人
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析による短鎖脂肪酸誘導細胞死の誘導メカニズムの探索
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田啓方、室伏貴久、鈴木直人
2. 発表標題 短鎖脂肪酸誘導歯肉上皮細胞死にはヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性優位の状況が必要である
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田啓方、室伏貴久、鈴木直人
2. 発表標題 歯周病細菌の産生する短鎖脂肪酸はヒト歯肉上皮細胞の細胞死を誘導 し関節リウマチ関連因子を放出する
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

1. 発表者名 津田啓方、室伏貴久、鈴木直人
2. 発表標題 短鎖脂肪酸誘導オートファジー依存性細胞死による歯肉炎症発症の可能性
3. 学会等名 第26回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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	三上 剛和  (MIKAMI Yoshikazu)  (80434075)	新潟大学・医歯学系・准教授    (13101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	好士 亮介  (KOSHI Ryosuke)  (80453877)	日本大学・歯学部・専修研究員     (32665)	