

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09546

研究課題名(和文) 口腔-腸管の免疫ネットワークによる歯周病の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of periodontitis by immunological network between oral cavity and intestinal tract

研究代表者

永尾 潤一 (Nagao, Jun-ichi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：30509047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は口腔内に常在する歯周病原細菌による感染症で、歯周組織の炎症と歯槽骨の吸収により歯の喪失の最も大きな原因となる。歯周病病態形成にはサイトカインIL-17産生を特徴とするTh17細胞による宿主の免疫応答が関与し、病態を増悪化させることが分かっている。しかしながら、歯周病の病態を制御するTh17細胞の制御機構は不明な点が多く残されている。本研究により、歯周病の病態形成には、口腔と腸管の免疫ネットワークが重要な働きをすることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の歯周病の治療・予防は、口腔内の歯垢や歯石の除去を主体としたのもであった。本研究で得られた成果により、歯周病発症を制御する腸内細菌や歯周病の病態形成に関わるTh17細胞を標的とした治療法や予防法が可能になる。このように歯周病に対する新しい治療法や予防法の開発への基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a leading cause of tooth loss that is associated with a periodontal pathogenic bacterium. It has been reported that the pathogenesis of periodontitis is mediated by host immune response, especially IL-17A-producing helper T cells, Th17 cells. However, the regulatory mechanism to induce the immune response via Th17 cells by periodontal pathogens remains to be elucidated. In this study, we found that immunological network between oral cavity and intestinal tract is important for the development of periodontitis.

研究分野：病態系口腔科学

キーワード：歯周病 Porphyromonas gingivalis Th17細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周病は口腔内に常在する歯周病原細菌による感染症で、歯周組織の炎症と歯槽骨の吸収により歯の喪失の最も大きな原因となる。近年、歯周病が糖尿病などの全身疾患と関連することが明らかになり、社会的関心が高くなっている。歯周病病態形成にはサイトカイン IL-17 産生を特徴とする Th17 細胞による宿主の免疫応答が関与し、病態を増悪化させることが分かっている¹⁾。しかしながら、生体内のどこで免疫応答が誘導されるのか、どのようにして制御されるのか、など歯周病の病態を制御する Th17 細胞の制御機構は不明な点が多く残されている。

既存の歯科領域の概念として、歯周病病態に関与する Th17 細胞の分化をはじめとする免疫応答は口腔局所に限局して考えられてきた。近年、腸管特に小腸において常在する腸内細菌により Th17 細胞が分化誘導されることが明らかとなり、Th17 細胞の分化の場が小腸であることが報告された²⁾。さらに腸内細菌が制御する免疫応答が様々な全身疾患に関連することが報告され始めている³⁾。以上のような研究背景から、申請者は、本研究課題の核心的な問いとして、歯周病原細菌に対する Th17 細胞による免疫応答の場は、口腔局所だけでなく腸管粘膜免疫において誘導されるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病を実効組織である口腔と免疫応答の誘導組織である腸管粘膜の免疫ネットワークによる疾患として捉え、腸管粘膜免疫を制御する腸内細菌叢と歯周病原細菌応答性の Th17 細胞の生体内での遊走に着目し、歯周病病態の制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Porphyromonas gingivalis* 応答性 Th17 細胞の解析

P. gingivalis W83 株を胃ゾンデによりマウスの腸管に投与し感作させた。感作させたマウスの腸管および末梢リンパ節由来の CD4⁺T 細胞を単離し、*P. gingivalis* の菌体成分と抗原提示細胞である骨髄由来樹状細胞により 6 日間刺激することで T 細胞を分化させた。Th17 細胞への分化は、サイトカイン IL-17 産生を指標に Flowcytometry により評価した。

(2) *P. gingivalis* 感染によるマウス歯周病モデル

P. gingivalis の腸管投与による感作後に *P. gingivalis* を口腔に感染させることで、歯周病マウスモデルを構築した。上顎臼歯部のアタッチメントレベルを測定することで歯槽骨吸収を評価した。

(3) 歯周組織における Th17 細胞の解析

IL-17-GFP レポーターマウスを用いて、*P. gingivalis* を腸管投与による感作後に口腔に感染させ、歯周組織に集積した Th17 細胞を CD4 および GFP 発現を指標に Flowcytometry により評価した。

(4) 腸管由来の Th17 細胞の遊走解析

光照射により細胞の色が変化する遺伝子改変マウスを用いた。*P. gingivalis* を腸管に投与することで、腸管において *P. gingivalis* 応答性 Th17 細胞を分化させた。次に腸管に光照射し *P. gingivalis* 応答性 Th17 細胞を含む腸管の細胞を赤に変化させた。その後、口腔内に *P. gingivalis* を感染させ、歯周組織に集積した腸管由来の Th17 細胞を赤蛍光と IL-17 産生を指標に Flowcytometry により評価した。

(5) 無菌マウスによる解析

腸内細菌が存在しない無菌マウスはビニールアイソレーター内で飼育した。無菌マウスに *P. gingivalis* を腸管投与による感作後に口腔に感染させ、*P. gingivalis* 応答性 Th17 細胞および歯周病の病態を解析した。また、無菌マウスに通常環境で飼育したマウス (SPF マウス) の糞便中の腸内細菌を移植して腸に定着させ、同様の解析を行った。

(4) 抗生物質投与による腸内細菌叢の改変と腸内細菌叢解析

抗菌スペクトルが異なる抗生物質を飲料水としてマウスに 4 週間投与することで腸内細菌叢を改変した。その後、抗生物質投与を止め、*P. gingivalis* を腸管投与による感作後に口腔に感染させ、*P. gingivalis* 応答性 Th17 細胞および歯周病の病態を解析した。また、抗生物質投与による腸内細菌叢の変化を解析するために、各マウスの糞便をサンプリングし、細菌ゲノムを抽出後に 16SrRNA 遺伝子を標的として、次世代シーケンサー (MiSeq) を用いて細菌叢解析を行った。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* 応答性 Th17 細胞は、腸管を介して全身性に応答する。

代表的な歯周病原細菌である *P. gingivalis* を口腔を介さずに胃ゾンデにより腸管に直接投与した結果、腸管粘膜免疫系において *P. gingivalis* 応答性の Th17 細胞の分化が誘導され、また全身の末梢リンパ節においても *P. gingivalis* 応答性の Th17 細胞が増加することが明らかとなった。

(2) *P. gingivalis* の腸管投与は歯周病の病態を増悪化する。

P. gingivalis の腸管投与による感作後に *P. gingivalis* を口腔に感染させるマウス歯周病モデルを構築した。構築したマウス歯周病モデルを用いて、歯周病の病態形成を解析した。その結果、*P. gingivalis* の腸管投与により、歯周組織における Th17 細胞の集積の増加、さらに歯周病の病態が増悪化することを見出した。

(3) 腸管由来の Th17 細胞は歯周組織に遊走する。

光照射により細胞の色が変化する遺伝子改変マウスを用いて、腸管由来の Th17 細胞の生体内での動態をモニターした。その結果、腸管由来の Th17 細胞が *P. gingivalis* の口腔感染により歯周組織に遊走することを見出した。

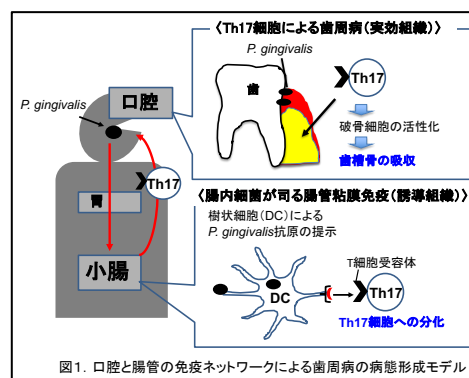
(4) 歯周病の病態形成には腸内細菌叢が関与する。

腸内細菌が存在しない無菌マウスに *P. gingivalis* を腸管に投与し、末梢リンパ節における *P. gingivalis* 応答性 Th17 細胞を解析した結果、Th17 細胞の増加は認められず、また歯周病は発症しなかった。そこで、SPF マウスの腸内細菌を腸内細菌が存在しない無菌マウスに移植し、*P. gingivalis* 感染による *P. gingivalis* 応答性 Th17 細胞の誘導および歯周病の病態を評価した。その結果、末梢リンパ節における *P. gingivalis* 応答性 Th17 細胞の増加および歯周病の病態の増悪化が認められた。

(5) 抗生物質投与による腸内細菌叢の改変は歯周病の病態に影響を及ぼす。

SPF マウスに抗菌スペクトルが異なる抗生物質を飲料水としてマウスに投与することで腸内細菌叢を改変し、*P. gingivalis* 感染による歯周病の病態形成への影響を解析した。その結果、抗生物質の種類により、*P. gingivalis* 感染に対する Th17 細胞応答と歯周病の病態形成に影響を与えることを見出した。抗生物質による腸内細菌叢への影響を次世代シーケンサーにより解析した結果、抗生物質の種類により腸内細菌叢が変化することが明らかになり、歯周病の病態形成に関わると推定される細菌を絞り込むことができた。

以上の得られた結果から、歯周病の病態形成には、Th17 細胞による口腔と腸管の免疫ネットワークが関与することが示唆された (図 1)。本研究成果は、従来の歯科領域で考えられていた歯周病の概念にパラダイムシフトを起こす独自性の高いものである。従来の歯周病の治療・予防は、口腔内の歯垢や歯石の除去を主体としたのもであった。本研究をさらに発展させることにより、歯周病発症を制御する腸内細菌が同定できれば、その細菌を標的とした新しい治療法や予防法が可能になる。また、歯周病原細菌応答性 Th17 細胞の生体内遊走のメカニズムを分子レベルで解明することで、Th17 細胞の口腔への遊走をブロックする新しい治療法の開発に繋がる可能性がある。本研究により得られた成果は、歯周病に対する新しい治療法や予防法の開発への基盤を構築すると期待される。



引用文献

- 1) *Microbiol. Immunol.* 53:287-294, 2009.
- 2) *Cell* 140:845-858, 2010.
- 3) *Nature* 535:75-84, 2016.

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 Yasumatsu K, Nagao J, Arita-Morioka K, Narita Y, Tasaki S, Toyoda K, Ito S, Kido H, Tanaka Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 Bacterial-induced maternal interleukin-17A pathway promotes autistic-like behaviors in mouse offspring.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp. Anim.	6. 最初と最後の頁 250-260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.19-0156	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 Ikezaki S, Cho T, Nagao J, Tasaki S, Yamaguchi M, Arita-Morioka K, Yasumatsu K, Chibana H, Ikebe T, Tanaka Y.	4. 巻 60
2. 論文標題 Mild heat stress affects on the cell wall structure in Candida albicans biofilm.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Med. Mycol. J.	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.19-00001	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 Tasaki S, Cho T, Nagao J, Ikezaki S, Narita Y, Arita-Morioka KI, Yasumatsu K, Toyoda K, Kojima H, Tanaka Y	4. 巻 18
2. 論文標題 Th17 cells differentiated with mycelial membranes of Candida albicans prevent oral candidiasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsyr/foy018.	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永尾潤一、成田由香、有田（森岡）健一、安松香奈江、田崎園子、長環、田中芳彦
2. 発表標題 宿主免疫応答による歯周病の病態形成機構の解明
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 成田由香、永尾潤一、有田（森岡）健一、田崎園子、安松香奈江、長環、田中芳彦
2. 発表標題 歯周炎を誘発する T 細胞抗原エピトープの同定
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 梁尚陽、永尾潤一、成田由香、有田（森岡）健一、安松香奈江、田崎園子、長環、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病の病態形成におけるプロバイオティクスの機能
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 池本梨央南、中村麻衣、永尾潤一、有田（森岡）健一、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌の増殖を抑制する口腔内細菌の同定と抗菌因子の解析
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 安松香奈江、永尾潤一、有田（森岡）健一、成田由香、長環、城戸寛史、田中芳彦
2. 発表標題 母体の病原性細菌感染が仔の行動異常に与える影響について
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 有田（森岡）健一、永尾潤一、成田由香、安松香奈江、田崎園子、長環、田中芳彦
2. 発表標題 バイオフィルム形成阻害に着目した新しい予防法の開発
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 田崎園子、長環、永尾潤一、有田（森岡）健一、成田由香、安松香奈江、小島寛、田中芳彦
2. 発表標題 口腔カンジダ症を制御する Th17 細胞応答を誘導する T 細胞抗原探索
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 Nagao Jun-ichi, Narita Yuka, Arita-Morioka Ken-ichi, Yasumatsu Kanae, Tasaki Sonoko, Cho Tamaki, Tanaka Yoshihiko
2. 発表標題 Investigation of pathological mechanism of periodontal disease via T-cell mediated immune response
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tasaki Sonoko, Cho Tamaki, Nagao Jun-ichi, Arita-Morioka Ken-ichi, Narita Yuka, Yasumatsu Kanae, Tanaka Yoshihiko
2. 発表標題 Exploration of the major T cell antigen in oral candidiasis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 歯周病発症に関わるT細胞免疫応答の制御機構の解明
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 豊田馨大、成田由香、永尾潤一、有田（森岡）健一、安松香奈江、池崎晶二郎、田崎園子、長環、城戸寛史、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌に対するT細胞応答に関与する抗原タンパク質の同定
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 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
2. 発表標題 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
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 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
2. 発表標題 Candida albicans構成タンパク質を特異的に認識するTh17細胞による口腔カンジダ症抑制効果の検討
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 池崎晶二郎、長環、永尾潤一、田崎園子、安松香奈江、豊田馨大、成田由香、有田（森岡）健一、池邊哲郎、田中芳彦
2. 発表標題 Candida albicansのバイオフィルム形成におけるmild heat stress応答機構の解明
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 池本梨央南、疊屋有希、永尾潤一、田中芳彦
2. 発表標題 う蝕および歯周病を標的とした口腔内細菌由来抗菌因子の探索
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 Yasumatsu K, Nagao J, Narita Y, Arita(Morioka) K, Ikezaki S, Tasaki S, Toyoda K, Cho T, Kido H, Tanaka Y
2. 発表標題 The influence of maternal inflammation by bacterial infection on fetal brain development
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tasaki S, Cho T, Nagao J, Narita Y, Ikezaki S, Yasumatsu K, Toyoda K, Arita(Morioka) K, Kojima H, Tanaka Y
2. 発表標題 Exploration of a novel T cell antigen of Candida albicans against oral candidiasis
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属機関HP
https://www.fdcnet.ac.jp/col/departement_graduate_school/div_info/div_info_kinou#sec02

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	田中 芳彦 (Tanaka Yoshihiko) (00398083)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	
研究分担者	成田 由香 (Narita Yuka) (50758050)	福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114)	

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
---------	---------