

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10085

研究課題名(和文) 歯周病の発症につながる歯肉上皮バリア責任遺伝子の解析

研究課題名(英文) Analysis of genes responsible for the gingival epithelial barrier leading to the development of periodontal disease

研究代表者

竹内 洋輝 (Takeuchi, Hiroki)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40572186

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)：歯の周囲に存在する上皮細胞は、ヒトと歯周病菌との共生状態を維持する重要なバリアであると考えられる。しかし、歯周組織における歯肉上皮のバリア機能およびその破壊機序には不明な点が多い。歯肉上皮バリアに関連する歯周病の遺伝子要因を明らかにすることは、歯周病の宿主要因および環境要因に対する新しい解析法につながる可能性がある。一方、歯周病を随伴する症候群の責任遺伝子と歯肉上皮のバリア機能の関連については、不明な点が多い。本研究では、歯周病を随伴する症候群の内、糖原病Ib型の責任遺伝子をノックダウンした歯肉上皮細胞を用い、歯肉上皮の3次元培養法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

平成28年の歯科疾患実態調査によると、日本国における歯周病患者の割合は増加している。そのため、歯周病の宿主要因を明らかにすることは、重要な課題である。歯肉上皮組織の作成法を確立することは、歯周病発症の関連遺伝子の形態学的解析を可能にする。さらに、歯周病の環境要因を形態学的、遺伝学的、および分子生物学的に調べることを可能とする。本研究により、歯周病を随伴する症候群の疾患モデル組織を研究対象とすることが可能になった。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells around the teeth are thought to be an important barrier, which maintains the symbiotic state between humans and periodontal bacteria. However, the barrier function of the gingival epithelium in periodontal tissues and the mechanisms of its destruction remain unclear. The identification of genetic factors of periodontal disease related to the gingival epithelial barrier may lead to new analytical methods for host and environmental factors of periodontal disease. On the other hand, the relationship between the genes responsible for syndromes associated with periodontal disease and the gingival epithelial barrier function remains unclear. In this study, we established a three-dimensional culture method of gingival epithelium using gingival epithelial cells with knockdown of the genes responsible for glycogen storage disease type Ib.

研究分野：予防歯科学

キーワード：分子生物学 組織工学 歯周病

1. 研究開始当初の背景

我々の身体を感染から守る免疫機構の初期のバリアは、上皮バリアである。歯の周囲に存在する上皮細胞も、ヒトと歯周病菌との共生状態を維持する重要なバリアであると考えられる。歯肉上皮バリアが機能している段階では、歯周病菌と歯周組織との拮抗状態は維持され、歯周病の発症には至らない。何らかの原因で上皮バリアが破壊された時、歯周病菌は浸出する血液を栄養とし増殖し慢性歯周炎が発症すると考えられる。しかし、歯周組織における歯肉上皮のバリア機能およびその破壊機序には不明な点が多い。歯肉上皮バリアを制御する歯周病の遺伝子要因を明らかにすることは、歯周病の宿主要因および環境要因に対する新しい解析法につながる可能性がある。

2. 研究の目的

疫学では、病因・環境要因・宿主要因の3つのバランスが崩れた時に疾病が発生すると考えられている。本研究では、人類で最も患者数の多い感染症の1つである歯周病発症に係る宿主要因の探索を行う。

3. 研究の方法

歯肉上皮の3次元モデルの作成: 歯周病を随伴する症候群の責任遺伝子に対する細胞生物学的アプローチ

歯肉上皮モデルの作成

ヒト歯肉上皮細胞は、不死化歯肉上皮細胞(*epi 4*; Murakami *et al.*, 2002, Journal of Dental Research) を Humedia KG2 (Kurabo) を用い培養した。歯肉上皮モデルは、細胞集積法(Nishiguchi *et al.*, 2011, Advanced Materials) により作成した。上記の組織作成に、gelatin (Nacalai Tesque) および fibronectin (Sigma) を用いた。細胞核の染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probe) を、細胞骨格であるアクチンの染色には Phalloidin-Alexa Fluor 568 (Molecular Probe) を用いた。歯肉上皮モデルの形態学的解析は、共焦点顕微鏡 SP8 (Leica Microsystems) を用いた。

歯肉上皮細胞への遺伝子導入

歯肉上皮細胞への導入プラスミドとして、標的遺伝子のノックダウンに pSIREN-RetroQ (Clontech) を用いた。トランスフェクション試薬は、FuGENE6 (Promega) を用いた。標的遺伝子に対する short hairpin RNA (shRNA) を安定発現する細胞の選別には、puromycin (InvivoGen) を用いた。小胞体のマーカータンパク質として、enhanced green fluorescent protein (EGFP)-SEC61 β (Takeuchi *et al.*, 2019, PLoS Pathogens) を歯肉上皮細胞に形質導入した。また、ミトコンドリアの局在は、anti-TOMM20 (Abcam) で歯肉上皮細胞を免疫染色し観察した。

4. 研究成果

1. 歯肉上皮の3次元モデルの作成

糖原病 Ib 型の疾患モデル細胞の作成

これまで我々は、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* が歯肉上皮細胞のタイト・ジャンクション関連タンパク質を特異的に分解しバリア機能を低下することで、細菌の膜成分である lipopolysaccharide および peptidoglycan を上皮へ透過させることを報告した (Takeuchi *et al.*, 2019, Cellular microbiology)。一方、歯周病を随伴する症候群の責任遺伝子と歯肉上皮のバリア機能の関連については、不明な点が多い。

本研究では、日本歯周病学会の歯周治療のガイドライン(2022)の内、特に歯周病を随伴する症候群である糖原病 Ib 型の責任遺伝子 *SLC37A4* (Salapata *et al.*, 1995, Journal of Oral Pathology&Medicine) に対する shRNA を安定発現する歯肉上皮細胞を作成した(図1)。この結果、歯肉上皮細胞において *SLC37A4* のノックダウンにより、小胞体とミトコンドリアの局在に差異がみられた。これらの生理学的な意義は、今後の検討課題となった。

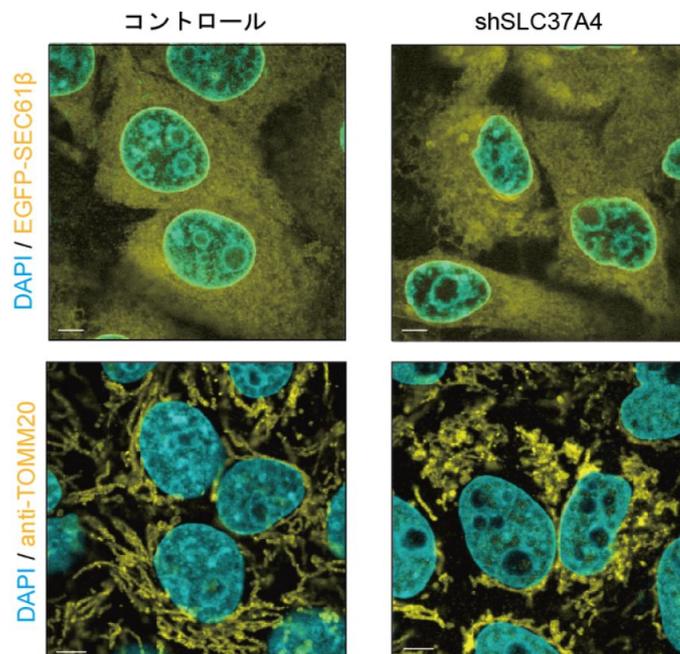


図1：糖原病Ib型の責任遺伝子 *SLC37A4* をノックダウンした歯肉上皮細胞の共焦点顕微鏡像。DAPI（シアン）は細胞核、EGFP-SEC61β（黄色）は小胞体、また anti-TOMM20（黄色）はミトコンドリアを示す。Bar = 5 μm。

SLC37A4 をノックダウンした歯肉上皮モデル作成の最適化

糖原病Ib型の有病率は10万人に1人程度と推測され、肝型糖原病の中でも有病率が高い。糖原病Ib型では、肝臓、腎臓、および腸管に多量のグリコーゲンが蓄積し、低血糖と肝腫大が出現する。細胞内においては、グルコースが細胞に浸透し代謝経路に入るため、グルコース-6-リン酸とよばれる代謝中間体に変換される。このグルコース-6-リン酸からグルコースを生成する過程で、*SLC37A4* がグルコース-6-リン酸を細胞質から小胞体に輸送する。そのため、*SLC37A4* をノックダウンした歯肉上皮細胞においても、上記代謝異常が起こることが想定された。

そこで、*SLC37A4* をノックダウンした歯肉上皮細胞から歯肉上皮モデルを作成するため、培養培地のグルコース濃度およびグルコースの細胞内取込みに係るホルモンであるインスリン濃度等を含め、3次元培養法の最適化を行った（図2）。

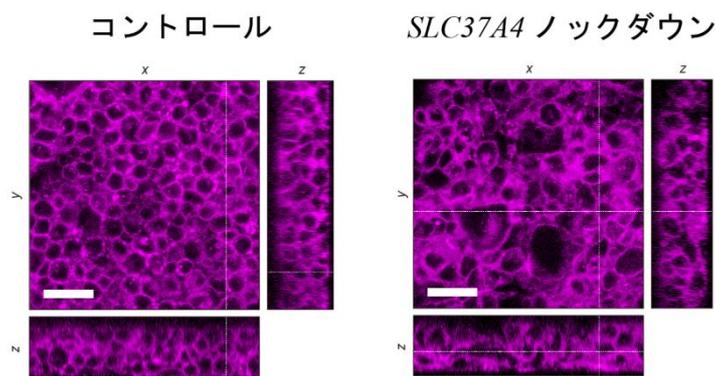


図2：*SLC37A4* をノックダウンした歯肉上皮の共焦点顕微鏡像。歯肉上皮の細胞骨格であるアクチンは、Phalloidin-Alexa Fluor 568（マゼンタ）で染色した。Bars = 30 μm。

この技術により、糖原病Ib型を模した疾患モデル組織を研究対象とすることが可能になった。今後は、他の歯周病を随伴する症候群の責任遺伝子についても検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeuchi Hiroki, Amano Atsuo	4. 巻 2210
2. 論文標題 Invasion of Gingival Epithelial Cells by Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 215 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0939-2_21	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 Amano Atsuo, Choi Youn-Hee, Takeuchi Hiroki	4. 巻 2210
2. 論文標題 Genotyping of Porphyromonas gingivalis in Relationship to Virulence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 53 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0939-2_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 該当する
1. 著者名 Takeuchi Hiroki, Sasaki Naoko, Yamaga Shunsuke, Kuboniwa Masae, Matsusaki Michiya, Amano Atsuo	4. 巻 15
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1008124	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 Sasaki Naoko, Takeuchi Hiroki, Kitano Shiro, Irie Shinji, Amano Atsuo, Matsusaki Michiya	4. 巻 9
2. 論文標題 Dynamic analysis of Porphyromonas gingivalis invasion into blood capillaries during the infection process in host tissues using a vascularized three-dimensional human gingival model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 6574 ~ 6583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1bm00831e	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 Takeuchi Hiroki, Yamaga Shunsuke, Sasaki Naoko, Kuboniwa Masae, Matsusaki Michiya, Amano Atsuo	4. 巻 23
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of coxsackievirus and adenovirus receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13388	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 Takeuchi Hiroki, Nakamura Eriko, Yamaga Shunsuke, Amano Atsuo	4. 巻 3
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Infection Induces Lipopolysaccharide and Peptidoglycan Penetration Through Gingival Epithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oral Health	6. 最初と最後の頁 845002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/froh.2022.845002	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takeuchi H, Amano A.
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through gingival epithelial cell monolayer via degradation of junctional adhesion molecule 1.
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research, Asia Pacific Region (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山賀俊介, 竹内洋輝, 天野敦雄
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisに感染した歯肉上皮細胞における CXADR タンパク質の分解
3. 学会等名 近畿・中国・四国口腔衛生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木尚子, 竹内洋輝, 北野史朗, 入江新司, 天野敦雄, 松崎典弥
2. 発表標題 毛細血管網を有する歯周病菌感染組織モデル構築と感染防御機構の解明
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山賀俊介, 竹内洋輝, 天野敦雄
2. 発表標題 タバコ抽出液が歯肉上皮細胞のバリア機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷垣慶太, 加藤祐太, 山賀俊介, 竹内洋輝, 天野敦雄
2. 発表標題 歯肉上皮細胞におけるタンパク質の糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 第32回近畿・中国・四国口腔衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯島由羅, 久保庭雅恵, 坂中哲人, 竹内洋輝, 眞弓昌大, 天野敦雄
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisが産生するポリアミンのヒト歯肉上皮細胞のメタボロームと増殖への影響
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞構造体及びその製造方法	発明者 松崎典弥、佐々木尚子、天野敦雄、竹内洋輝、北野史朗、入	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/032446	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	久保庭 雅恵 (Kuboniwa Masae) (00303983)	大阪大学・歯学研究科・准教授 (14401)	
研究 分 担 者	天野 敦雄 (Amano Atsuo) (50193024)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	

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