

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10126

研究課題名(和文) 口腔-腸管連関の新展開：嚥下された歯周病原細菌は腸炎を悪化させるか？

研究課題名(英文) Next step in the oral-gut connection: Do swallowed periodontopathogenic bacteria exacerbate colitis?

研究代表者

高橋 直紀 (Takahashi, Naoki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80722842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病と全身疾患の関連メカニズムのひとつとして、嚥下されて腸管に達する歯周病原細菌の関与が示唆されている。本研究の目的は、実験的腸炎モデルマウスを用いて、腸管局所における歯周病原細菌の直接的な影響を解析し、炎症性腸疾患におよぼす影響を明らかにすることである。実験的腸炎モデルマウスにおいて、歯周病原細菌の経口投与が腸炎を重症化させることを確認した。またin vitroにおいて、腸管上皮バリアの透過性亢進およびバリア関連因子の発現低下をが確認された。また、*P. gingivalis*の病原因子のひとつであるgingipainが腸炎の重症化に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の薬剤誘導性実験的腸炎モデルマウスを用いた一連の研究において、経口投与された*P. gingivalis*が腸管上皮バリア機能の破綻を介して腸炎重症化に関与することが確認されたことから、歯周炎が炎症性腸疾患に悪影響を与えることが示唆された。そのメカニズムのひとつとして、*P. gingivalis*由来のプロテアーゼgingipainの関与が示唆されたことから、炎症性腸疾患の重症化予防や治療におけるプロテアーゼ阻害薬を用いた創薬が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate the effects of ingested periodontal pathogens on experimental colitis in mice and to elucidate its underlying mechanisms. We found that the oral administration of *P. gingivalis* significantly increased the severity of colitis when compared to other pathogens in the DSS-induced colitis model. The ingested *P. gingivalis* disrupted the colonic epithelial barrier by decreasing the expression of tight junction proteins in vivo. In vitro permeability assays using the intestinal epithelial cell line suggested the *P. gingivalis*-specific epithelial barrier disruption. The possible involvement of gingipains in the exacerbation of colitis was implied by using *P. gingivalis* lacking gingipains.

研究分野：歯周病学

キーワード：ペリオドンタルメディシン 歯周病 実験的腸炎モデルマウス 上皮バリア *P. gingivalis*

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎が全身性に悪影響をおよぼすメカニズムのひとつとして、嚥下された歯周病原細菌による腸内細菌叢の変化や腸管免疫誘導が報告されており、腸管局所における歯周病原細菌の様々な影響が示唆される。クローン病と潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患は腸管局所に生じる難治性疾患に指定され、近年罹患率の増加が問題となっている。その原因や根本的な治療体系ははまだ確立されていないが、抗生物質による臨床症状の改善が報告されていることから、本疾患の病態形成における細菌因子の関与も示唆されている。

### 2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、薬剤誘導性実験的腸炎モデルマウスを用いて、歯周病原細菌による炎症性腸疾患におよぼす影響とそのメカニズムの解析を行うことである。

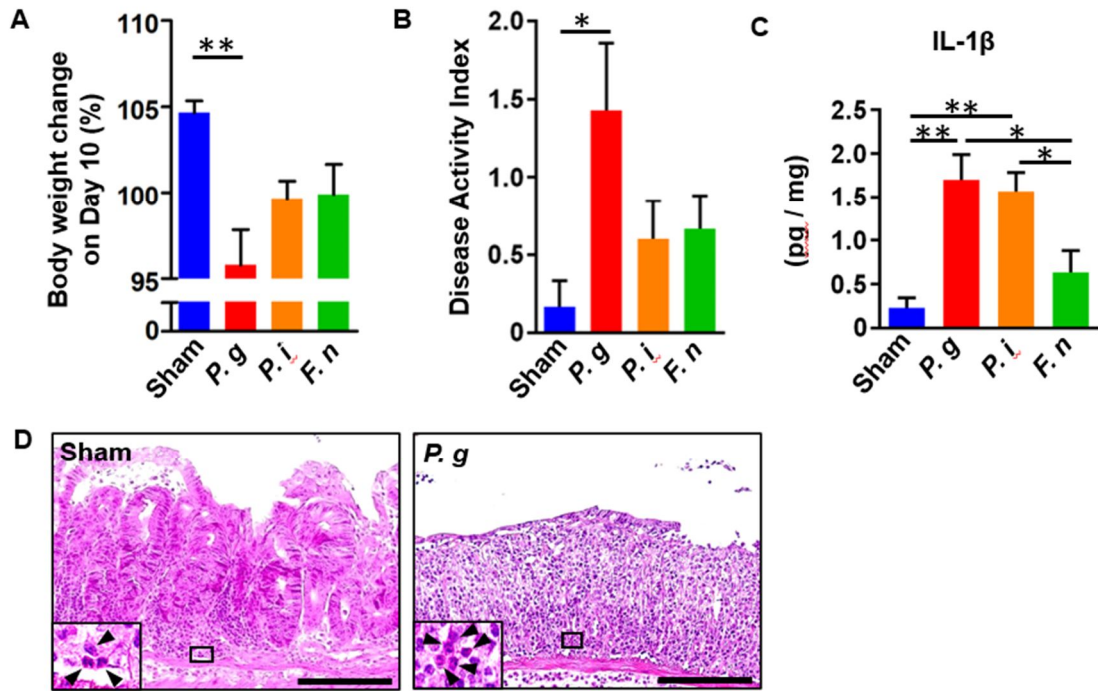
### 3. 研究の方法

8週齢の C57BL/6 雄マウスに 2.5%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 溶液を 7 日間飲水投与し、軽度の実験的腸炎を誘導した。実験群は、主要な歯周病原細菌である *P. gingivalis*、*P. intermedia*、*F. nucleatum* および基材のみの 4 群とし、2%カルボキシメチルセルロース基材に混和した各細菌を 100 $\mu$ l (1 $\times$ 10<sup>9</sup>CFU/ml) ずつ、フィーディングニードルを用いて実験期間にわたり毎日経口投与した。DSS 飲水投与開始から 10 日後に安楽死を行い、サンプリングを実施した。体重変化量と便の硬さ、腸管出血の有無をスコア化した疾患重症度 Disease Activity Index (DAI) の測定、大腸組織の H-E 染色による組織学的観察を行った。また大腸組織中の炎症性サイトカイン産生を ELISA にて解析し、群間での比較検討を実施した。*in vitro* における腸管上皮バリア機能解析においては、ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を播種培養後、*P. gingivalis* (MOI:100,1000) で刺激を行い、FITC 標識 dextran を用いた透過性試験を実施した。また上皮バリア関連分子 ZO-1 の発現を Western Blot、蛍光免疫染色を用いて解析した。さらに、*P. gingivalis* が特異的に産生するプロテアーゼである gingipain の影響を解析する目的で、gingipain 欠損株である *P. gingivalis* KDP136 株を用いて同様の解析を行い、*P. gingivalis* 野生株との比較検討を行った。

### 4. 研究成果

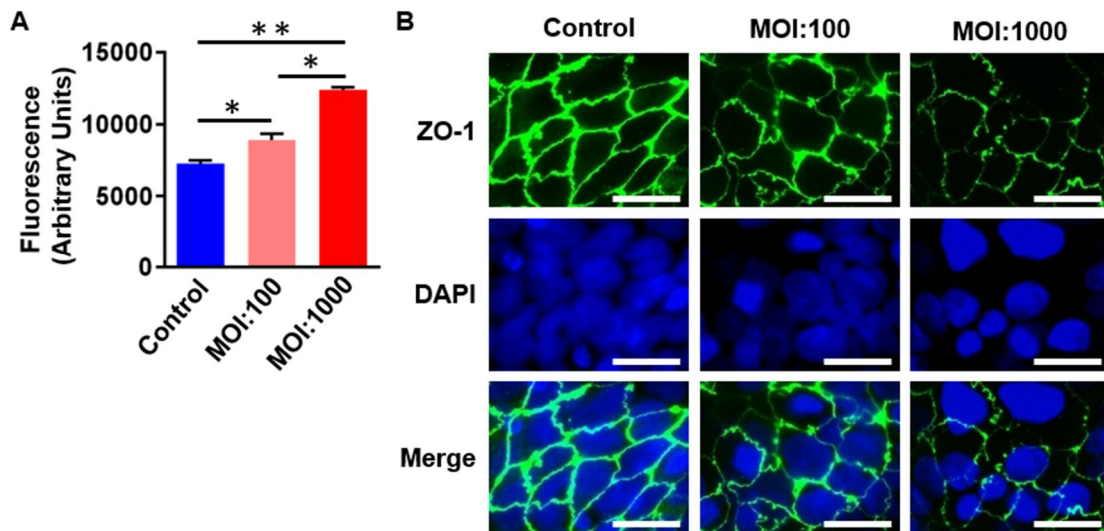
*In vivo* において、*P. gingivalis* 投与群は他の群と比較して、有意な体重減少や DAI 増加および炎症性サイトカイン産生の増加が認められた。また組織学的に、顕著な腸管上皮構造の破壊や好中球の浸潤が認められた(結果 1 A,B,C,D)。

## 結果 1



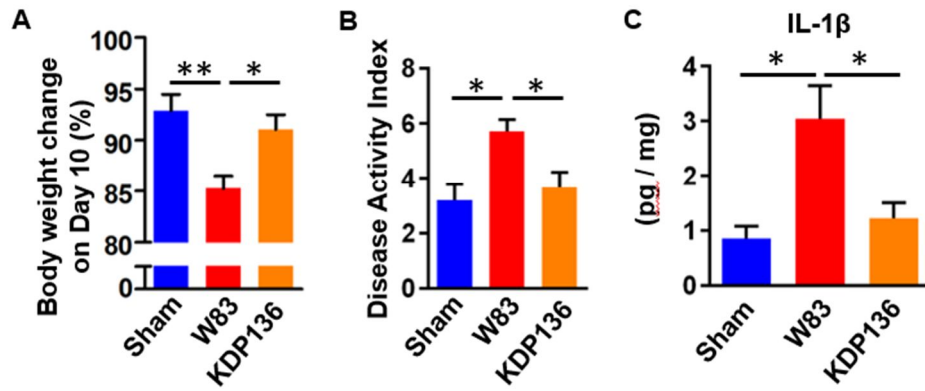
In vitro においても *P. gingivalis* 投与による腸管透過性の亢進が確認され、細胞間接着に主要な働きをする ZO-1 発現の減少がタンパクレベルで認められた (結果 2 A, B)。

## 結果 2



さらに in vivo において、KDP136 株投与群では野生株投与群と比較し、有意な体重減少や DAI 増加は認めず、炎症性サイトカインの発現量も有意に低かった。in vitro での KDP136 刺激においては、野生株刺激で認められた ZO-1 の発現減少は確認されなかった (結果 3 A,B,C)。

### 結果 3



これらの結果より、*P. gingivalis* の経口投与が実験的腸炎を悪化させることが確認され、そのメカニズムとして特定の病原因子が腸管バリア機能を低下させることが示唆された。

これらのことから *P. gingivalis* が腸管上皮バリア機能の破綻を介して腸炎重症化に関与することが示唆された。そのメカニズムのひとつとして、*P. gingivalis* 由来のプロテアーゼ gingipain の関与が示唆されたがその詳細な分子メカニズムは不明であり、今後更なる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sulijaya Benso, Takahashi Naoki, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 25
2. 論文標題 Lactobacillus-Derived Bioactive Metabolites for the Regulation of Periodontal Health: Evidences to Clinical Setting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2088 ~ 2088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25092088	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 Maekawa Tomoki, Tamura Hikaru, Domon Hisanori, Hiyoshi Takumi, Isono Toshihito, Yonezawa Daisuke, Hayashi Naoki, Takahashi Naoki, Tabeta Koichi, Maeda Takeyasu, Oda Masataka, Ziogas Athanasios, Alexaki Vasileia Ismini, Chavakis Triantafyllos, Terao Yutaka, Hajishengallis George	4. 巻 5
2. 論文標題 Erythromycin inhibits neutrophilic inflammation and mucosal disease by upregulating DEL-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 136706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.136706	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 Takahashi Naoki, Tsuzuno Takahiro, Mineo Shuhei, Yamada-Hara Miki, Aoki-Nonaka Yukari, Tabeta Koichi	4. 巻 62
2. 論文標題 Epithelial TRPV1 channels: Expression, function, and pathogenicity in the oral cavity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 235 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.05.005	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 Matsugishi Aoi, Aoki-Nonaka Yukari, Yokoji-Takeuchi Mai, Yamada-Hara Miki, Mikami Yoshikazu, Hayatsu Manabu, Terao Yutaka, Domon Hisanori, Taniguchi Masayuki, Takahashi Naoki, Yamazaki Kazuhisa, Tabeta Koichi	4. 巻 121
2. 論文標題 Rice peptide with amino acid substitution inhibits biofilm formation by Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104956 ~ 104956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2020.104956	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 Tsuzuno Takahiro, Takahashi Naoki, Yamada Hara Miki, Yokoji Takeuchi Mai, Sulijaya Benso, Aoki Nonaka Yukari, Matsugishi Aoi, Katakura Kyoko, Tabeta Koichi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 56
2. 論文標題 Ingestion of Porphyromonas gingivalis exacerbates colitis via intestinal epithelial barrier disruption in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 275 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12816	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 Yokoji-Takeuchi Mai, Tabeta Koichi, Takahashi Naoki, Arimatsu Kei, Miyazawa Haruna, Matsuda-Matsukawa Yumi, Sato Keisuke, Yamada Miki, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 5
2. 論文標題 Indirect regulation of PCSK9 gene in inflammatory response by Porphyromonas gingivalis infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01111 ~ e01111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e01111	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 Hiyoshi Takumi, Domon Hisanori, Maekawa Tomoki, Nagai Kosuke, Tamura Hikaru, Takahashi Naoki, Yonezawa Daisuke, Miyoshi Tomohiro, Yoshida Akihiro, Tabeta Koichi, Terao Yutaka	4. 巻 63
2. 論文標題 Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces detachment and death of human gingival epithelial cells and fibroblasts via elastase release following leukotoxin dependent neutrophil lysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 100 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12672	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 Sulijaya Benso, Takahashi Naoki, Yamazaki Kyoko, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 6
2. 論文標題 Nutrition as Adjunct Therapy in Periodontal Disease Management	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Oral Health Reports	6. 最初と最後の頁 61 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40496-019-0216-4	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 Takahashi Naoki, Sulijaya Benso, Yamada-Hara Miki, Tsuzuno Takahiro, Tabeta Koichi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 7
2. 論文標題 Gingival epithelial barrier: regulation by beneficial and harmful microbes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 e1651158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2019.1651158	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 Sulijaya Benso, Takahashi Naoki, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 105
2. 論文標題 Host modulation therapy using anti-inflammatory and antioxidant agents in periodontitis: A review to a clinical translation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 72 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.07.002	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 Aoki Nonaka Yukari, Tabeta Koichi, Yokoji Mai, Matsugishi Aoi, Matsuda Yumi, Takahashi Naoki, Sulijaya Benso, Domon Hisanori, Terao Yutaka, Taniguchi Masayuki, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 90
2. 論文標題 A peptide derived from rice inhibits alveolar bone resorption via suppression of inflammatory cytokine production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1160 ~ 1169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.18-0630	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 Sulijaya Benso, Yamada Hara Miki, Yokoji Takeuchi Mai, Matsuda Matsukawa Yumi, Yamazaki Kyoko, Matsugishi Aoi, Tsuzuno Takahiro, Sato Keisuke, Aoki Nonaka Yukari, Takahashi Naoki, Kishino Shigenobu, Ogawa Jun, Tabeta Koichi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 90
2. 論文標題 Antimicrobial function of the polyunsaturated fatty acid KetoC in an experimental model of periodontitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1470 ~ 1480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.19-0130	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 Yokoji-Takeuchi Mai, Takahashi Naoki, Yamada-Hara Miki, Sulijaya Benso, Tsuzuno Takahiro, Aoki-Nonaka Yukari, Tabeta Koichi, Kishino Shigenobu, Ogawa Jun, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 110
2. 論文標題 A bacterial metabolite induces Nrf2-mediated anti-oxidative responses in gingival epithelial cells by activating the MAPK signaling pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104602 ~ 104602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.104602	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 Yoshiba N., Edanami N., Ohkura N., Maekawa T., Takahashi N., Tohma A., Izumi K., Maeda T., Hosoya A., Nakamura H., Tabeta K., Noiri Y., Yoshiba K.	4. 巻 99
2. 論文標題 M2 Phenotype Macrophages Colocalize with Schwann Cells in Human Dental Pulp	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 329 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034519894957	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 Aoki-Nonaka Y, Matsugishi A, Lwin HY, Takahashi N, Tabeta K	4. 巻 -
2. 論文標題 Nutritional supplements and periodontal disease prevention - Current understanding.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr Oral Health Rep	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) 10.1007/s40496-020-00261-7	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13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 都野隆博, 高橋直紀, 峯尾修平, 原 実生, 野中由香莉, 多部田康一
2. 発表標題 歯肉上皮細胞に発現するTRPV1活性化による抗炎症性作用の解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会(第152回)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 山崎恭子, 中島麻由佳, 竹内麻衣, 原 実生, 都野隆博, 松岸 葵, 松川由実, 佐藤圭祐, 高橋直紀, 多部田康一, 坪井裕理, 菊池 淳, 加藤 完, 大野博司, 山崎和久
2. 発表標題 腸内細菌叢の変動を介した歯周病のNAFLDへの影響
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 峯尾修平, 高橋直紀, 都野隆博, 野中由香莉, 田村 光, 多部田康一
2. 発表標題 歯肉上皮細胞における抗酸化ストレス応答を活性化させる食物由来ペプチドの探索
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会(第152回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎恭子, 中島麻由佳, 竹内麻衣, 原 実生, 都野隆博, 松岸 葵, 松川由実, 佐藤圭祐, 高橋直紀, 多部田康一, 山崎和久
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis経口投与は腸内細菌の変化を介してNAFLD病態に影響を与える
3. 学会等名 令和2年新潟歯学会第2回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 峯尾修平, 高橋直紀, 都野隆博, 野中由香莉, 多部田康一
2. 発表標題 ヒト歯肉上皮細胞における抗酸化ストレス応答を増強する食物由来ペプチドの探索
3. 学会等名 令和2年度新潟歯学会第2回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuzuno T, Takahashi N, Yokoji M, Yamada-Hara M, Nakajima M, Tabeta K, Yamazaki K
2. 発表標題 Oral administration of Porphyromonas gingivalis aggravates intestinal inflammation in mice.
3. 学会等名 97th General Session of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamazaki K, Sato K, Nakajima T, Muyazawa H, Takahashi N, Yamada-Hara M, Yokoji M, Yamazaki K
2. 発表標題 Dysbiosis of gut microbiome in Japanese patients with periodontitis.
3. 学会等名 7th General Session of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuzuno T, Takahashi N, Yamada-Hara M, Yokoji-Takeuchi M, Aoki-Nonaka Y, Matsugishi A, Tabeta K, Yamazaki K
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis aggravates experimental induced colitis in mice.
3. 学会等名 Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 都野隆博, 高橋直紀, 竹内麻衣, 原 実生, 中島麻由佳, 多部田康一, 山崎和久
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis口腔投与がDSS誘導性実験的腸炎に及ぼす影響の解析.
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 都野隆博, 高橋直紀, 竹内麻衣, 原 実生, 中島麻由佳, 多部田康一, 山崎和久
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisが腸管上皮バリア機能へ及ぼす影響の解析.
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 都野隆博, 高橋直紀, 竹内麻衣, 原 実生, 多部田康一, 山崎和久
2. 発表標題 実験的腸炎モデルマウスにおけるPorphyromonas gingivalisによる腸炎増悪メカニズムの解析.
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi N
2. 発表標題 Neuronal TRPV1 activation prevents alveolar bone resorption via CGRP.
3. 学会等名 97th General Session of the IADR (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi N
2. 発表標題 Gingival epithelial cells: a possible target for host modulation therapy?
3. 学会等名 Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋直紀, 多部田康一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 臨床歯周病学 第3版	

〔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	多部田 康一 (Tabeta Koichi) (20401763)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究分担者	片倉 響子 (Katakura Kyoko) (70423788)	福島県立医科大学・医学部・講師  (21601)	

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