

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19328

研究課題名(和文) 歯周病原菌由来の分泌小胞に着目した歯周病関連気管支・肺炎の病態解明

研究課題名(英文) The effect of extracellular vesicles released from oral bacteria on the destruction of lung epithelial cells

研究代表者

味野 範子(塩津範子)(mino(shiotsu), noriko)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：90771452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原菌による気管支炎や誤嚥性肺炎の重症化は大きな問題である。本研究では、歯周病原菌が放出する『細胞外分泌小胞』に着目し、肺胞上皮細胞に与える障害性について解析を行った。Porphyromonas gingivalisから『細胞外分泌小胞』を回収し、培養肺胞上皮細胞株A549に作用させ、その影響について調べた。その結果、歯周病原菌が放出する『細胞外分泌小胞』は、歯周病原菌固有の病原因子を豊富に含むこと、培養肺胞上皮細胞にアポトーシスを誘導し、接着機構に障害をもたらすことを明らかにした。以上より、歯周病原菌由来の『細胞外分泌小胞』が気道や肺の上皮組織の炎症や破壊に関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病を惹起する歯周病原菌は、歯周組織の上皮や硬組織を破壊するだけでなく、口腔領域外の組織の炎症にも関与することが分かってきた。中でも、歯周病原菌による気管支炎や誤嚥性肺炎の重症化は生命の危険に直結するため、高齢者では大きな問題となっている。しかし、歯周病原菌が気道や肺の炎症を増悪する分子メカニズムはよく分かっていなかった。本研究の結果、歯周病原菌由来の『細胞外分泌小胞』が気道や肺の上皮組織に与える障害性を調べ、歯周病原菌によって誘導される呼吸器系組織の炎症の新たな分子メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Periodontal pathogens such as Porphyromonas gingivalis have been reported to aggravate bronchitis and aspiration pneumonia. In this study, we focused on the "extracellular vesicles" released from periodontal pathogens and analyzed the cytotoxicity to alveolar epithelial cells. "Extracellular vesicles" were collected from Porphyromonas gingivalis and used for treatment of cultured alveolar epithelial cell line A549. As a result, it was clarified that the "extracellular vesicles" released by periodontal pathogens are rich in virulence factors specific for periodontal pathogens. The treatment of "extracellular vesicles" induced apoptosis in the alveolar epithelial cells and destroyed the adhesion mechanism. These results suggest that "extracellular vesicles" derived from periodontal bacteria may be involved in the inflammation and destruction of epithelial tissues of the respiratory tract and lung.

研究分野：細胞組織学

キーワード：歯周病原菌 Porphyromonas gingivalis 細胞外小胞 アポトーシス 細胞接着機構

1. 研究開始当初の背景

歯周病は口腔領域のみならず、糖尿病や高血圧など全身性疾患とも関連することが明らかになってきた(ペリオドンタルメディスン)。平成28年の日本人の死因の第3位が肺炎であり、高齢者の肺炎の約70%は誤嚥性によるものと考えられる。歯周病原菌は、誤嚥に伴う気管支炎や肺炎の重症化に関わることが報告されているが、その詳細な分子メカニズムは解明されていない。そのため、『歯周病の予防・治療が、誤嚥に伴う気管支炎や肺炎のリスクを軽減させるために重要であること』の認識が広まっていなかった。私たちは、歯周病原菌が炎症を誘導するメカニズムについて解析を行い、その過程で、歯周病原菌由来の『細胞外分泌小胞』が上皮組織の破壊と炎症を誘発する新たな因子である可能性を見出したため、その障害性に着目した。

2. 研究の目的

歯周病による歯の喪失は食生活・社会生活に支障をきたし、ひいては全身の健康に影響を与える。歯周病を惹起する歯周病原菌は、歯周組織の上皮や硬組織を破壊するだけでなく、口腔領域外の組織の炎症にも関与することが分かってきた。その中でも、歯周病原菌による気管支炎や誤嚥性肺炎の重症化は生命の危険に直結するため、特に高齢者では大きな問題となっている。しかし、歯周病原菌が気道や肺の炎症を増悪する分子メカニズムはよく分かっていなかった。我々は、歯周病原菌が放出する『細胞外分泌小胞』が上皮防御機構を破壊し、呼吸器系の組織の炎症を誘導する可能性を見出した。歯周病原菌由来の細胞外分泌小胞は、菌固有の核酸やタンパク質分解酵素など様々な病原因子を含み、気道や肺に到達する。そこで、本研究では、歯周病原菌由来の『細胞外分泌小胞』が気道や肺の上皮組織に与える障害性を調べ、歯周病原菌によって誘導される呼吸器系組織の炎症の新たな分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

主要な歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* を培養し、その上清中から『細胞外分泌小胞』を回収した。

1) 歯周病原菌由来の細胞外小胞の内容物について

歯周病原菌由来の細胞外分泌小胞には、菌固有のタンパク質、DNA や RNA などの核酸が含まれている。主要な歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* を培養し、その上清中から『細胞外分泌小胞』を回収した。回収した『細胞外分泌小胞』を電子顕微鏡で観察するとともに粒子径の測定を行った。また、細胞外分泌小胞からタンパク質を抽出し、質量分析によりアミノ酸配列を調べ、すべてのタンパク質を同定した。

2) 肺胞上皮細胞に対する歯周病原菌由来の細胞外小胞の影響について

Porphyromonas gingivalis を培養し、その上清中から『細胞外分泌小胞』を回収した。回収した『細胞外分泌小胞』をヒト培養肺胞上皮細胞株 A549 に作用させた。位相差顕微鏡で細胞の形態変化を調べ、MTT アッセイを用いて細胞活性の変化を測定した。細胞からタンパク質を抽出し、アポトーシスの指標である Caspase-3 および PARP の断片化についてウエスタンブロットを用いて解析した。さらに、免疫染色により、細胞接着に重要な因子であるクローディン、オクルーディンの発現(パターン)について調べた。

4. 研究成果

歯周病原菌が放出する『細胞外分泌小胞』は、直径が約 100 nm の小胞であり、内部には核酸やタンパク質分解酵素などの歯周病原菌固有の病原因子が豊富に含まれていた。『細胞外分泌小胞』を培養肺胞上皮細胞に作用させたところ、濃度依存的に細胞死を誘導すること、その細胞死はアポトーシスであることが分かった。さらに、『細胞外分泌小胞』は細胞接着因子であるオクルーディンやクローディンに何らかの影響を与え、細胞どうしの接着機構に障害をもたらすことを明らかにした。以上の研究により、歯周病原菌由来の『細胞外分泌小胞』が気道や肺の上皮組織の炎症や破壊に関与する可能性を示した。これらの成果の一部は、査読のある国際英文雑誌に論文公表した (He et al., *Outer membrane vesicles derived from Porphyromonas gingivalis induced cell death with disruption of tight junctions in human lung epithelial cells*, *Archives of Oral Biology*, 2020)。また、2020 年度の歯科基礎医学会で学会発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 He Yuhan, Shiotsu Noriko, Uchida-Fukuhara Yoko, Guo Jiajie, Weng Yao, Ikegame Mika, Wang Ziyi, Ono Kisho, Kamioka Hiroshi, Torii Yasuhiro, Sasaki Akira, Yoshida Kaya, Okamura Hirohiko	4. 巻 118
2. 論文標題 Outer membrane vesicles derived from Porphyromonas gingivalis induced cell death with disruption of tight junctions in human lung epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104841 ~ 104841
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 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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口真輝, 塩津範子, 竹本史子, 池亀美華, 吉田賀弥, 上岡寛, 鳥井康弘, 佐々木朗, 岡村裕彦
2. 発表標題 肺および口腔上皮細胞におけるPorphyromonas gingivalis由来の細胞外小胞の障害性
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020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

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		
中国	中国医科大学		