

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12646

研究課題名(和文)毛細血管網を有する歯肉モデル組織を用いた歯周病菌感染機構の解明

研究課題名(英文) Development of a 3D gingival tissue model infected with periodontal pathogens and dynamic analysis of host invasion

研究代表者

佐々木 尚子 (Sasaki, Naoko)

大阪大学・大学院工学研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：10388762

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)：歯周病菌の *Porphyromonas gingivalis* は口腔内だけでなく、動脈硬化症やアルツハイマー病の病巣からも検出されており、歯周病との関連が注目されている。しかし、予防や治療につながる歯周病菌の感染メカニズムは、未だ解明されていない。本研究では、三次元(3D)歯肉モデル組織を構築し、歯周病菌を感染させることで、歯周病菌が歯肉上皮細胞層の防御機構を突破するメカニズムを明らかにするとともに、歯肉モデル組織内における動態解析及び、血管網構造への感染を可視化することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病菌の増殖や感染メカニズムの研究は、歯肉組織を構成する細胞を二次元培養した状態で行われてきた。しかし、硬い平面のディッシュ上で培養された細胞は、実際の生体の状態を反映しておらず、歯周病菌が歯肉組織の深部まで侵入するメカニズムを理解し、対処方法を導き出すことはできない。より生体に近い組成や硬さを有する3D歯肉モデルを構築し、歯周病菌を感染させ、そのメカニズム及び深部での動態が解明できれば、歯周病治療に新たな治療標的を提供するだけでなく、歯周病菌が関与する種々の疾患に対する医療へつながる知見が得られると考えた。

研究成果の概要(英文)： *Porphyromonas gingivalis* is one of the most virulent periodontal disease-causing bacteria, and also involved in various systemic disease such as atherosclerosis and Alzheimer's disease. However, the infection mechanism of periodontal bacteria that leads to disease prevention and treatment has not yet been elucidated. In this study, we prepared a three-dimensional (3D) gingival tissue model infected with periodontal pathogens, and clarified the mechanism by which periodontal pathogens penetrate the barrier of gingival epithelial cell layer. Furthermore, this infection model enabled us to analyze the dynamics of periodontal pathogens within the gingival tissue model and to visualize their invasion into blood capillaries.

研究分野：生体材料学

キーワード：三次元歯肉モデル組織 *Porphyromonas gingivalis* 血管網構造 コラーゲンマイクロファイバー (CMF)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周病菌の複合感染による炎症性疾患である。歯周ポケットで増殖した歯周病菌や、それらが産生した有害物質が歯茎の毛細血管に入り、血流に乗って全身へと運ばれ、動脈硬化症や糖尿病など、様々な疾患の発症や悪化に関与することが報告されている。最も毒性が高い歯周病原菌の *P. gingivalis* は、歯周病の病巣だけでなく動脈硬化症やアルツハイマー病の病巣からも検出されている。しかし、*P. gingivalis* がどのようにして歯肉組織へ感染し、歯肉組織深部へと移動後、血管へ侵入するのか、予防や治療につながるメカニズムは解明されていない。

歯肉組織は、乾燥重量の約 30% をコラーゲン線維が占めており、力学的に安定で強靱な組織である。また、上皮細胞層と結合組織層の 2 層から構成され、歯と密着し、細菌や毒素の侵入を防ぐ防御機能を有している。歯周病菌の感染メカニズムを解明するために、歯肉組織は必須のツールであるが、ヒト歯肉は入手が困難である。これまで、培養細胞から歯肉モデルの作製を試みた例は存在するが、作製日数を要する、組織構造が単純などの理由から、歯肉モデルの作製に留まり、歯周病菌感染メカニズムの解明へ応用された例は、殆どなかった。そのため、二次元培養細胞を用いて、歯周病菌の宿主細胞への侵入機構や炎症反応機構が明らかにされてきたが、生体と近い立体的な組織でも、同様の動態を示すか検証する必要がある。しかし、機能的な細胞から構成され、かつ血管網を含んだ生体に近い組織と *P. gingivalis* との相互作用は解析されておらず、より生体に近い 3D 組織モデルを用いた研究への期待は大きい。

2. 研究の目的

3D 歯肉モデル組織を構築し、この組織へ *P. gingivalis* を感染させた系を歯周病菌感染歯肉モデル組織とし (図 1)、

- ① いかにして *P. gingivalis* が歯肉上皮細胞の防御機構を突破するのか？
 - ② その後、歯肉組織の深部までどの様にして移動し、血管の中へ侵入するのか？
- これらのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯周病菌感染歯肉モデル組織の作製

組織の足場となるコラーゲンマイクロファイバー (CMF) をヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)、及びヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と混合し、結合組織層を調整した。その後、不死化ヒト歯肉上皮 (IHGE) 細胞を積層し、血管網構造を有する 3D 歯肉モデル組織を構築した。歯肉モデル組織への *P. gingivalis* の感染は、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で行なった。

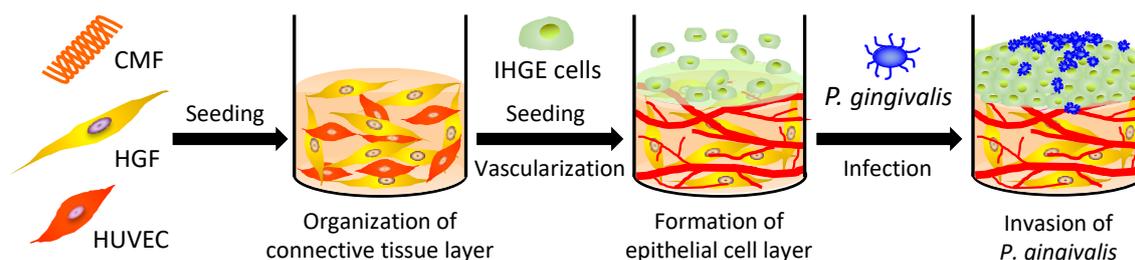


図 1. 3D 歯肉モデル組織の概要

(2) 遺伝子発現解析

歯肉モデル組織の防御能に関わる分子の発現解析、及び *P. gingivalis* の感染菌数の評価は、リアルタイム PCR 法で行なった。

(3) 歯周病菌の透過性試験

P. gingivalis の上皮細胞層透過性試験は、トランスウェルに構築した 3D 上皮細胞層に、蛍光標識した *P. gingivalis* を感染させ、トランスウェルから培養プレートの培地中へ移動した菌の蛍光強度を測定し、評価した。

(4) 3D 歯肉モデル組織への感染解析

感染 4 時間後の *P. gingivalis* の 3D 歯肉モデル組織への感染は、組織切片を免疫染色し、観察した。感染 24 時間後の血管網構造への *P. gingivalis* の侵入は、ホールマウント蛍光免疫染色法で染色した組織像を撮影後、画像解析ソフトを用いて解析した。

(5) ヒト血管新生関連タンパク質の測定

3D 歯肉モデル組織の培養上清中へ分泌されたヒト血管新生関連タンパク質は、Human Angiogenesis Array を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 上皮バリア形成に対する結合組織層の影響

作製した 3D 歯肉モデル組織の上皮細胞層におけるバリア機能の形成について評価するために、結合組織層の構成成分の異なる 3D 歯肉モデル組織を構築し、細胞間接着や上皮細胞層の安定化に関わる分子の遺伝子発現に対する結合組織層の関与について検討した。結合組織層存在下において、*ZO-1* 及び *COLLAGEN IV* 遺伝子は結合組織層の構成に関わらず、高い発現を示した。また、血管網構造存在下では、*CLAUDIN-1* 及び *CLAUDIN-4* 遺伝子の発現が高くなった。特に、*COLLAGEN IV* 遺伝子は 10 倍以上発現が高くなったことから、コラーゲン IV により上皮細胞は安定的に足場に接着し、より強いタイトジャンクション形成につながったと考えられる。以上の結果から、結合組織層は上皮細胞層のバリア形成に必須の構造であり、結合組織層が存在することで、強固な上皮バリアが形成されることが確認できた。

(2) 歯肉上皮細胞層における歯周病菌の侵入経路

P. gingivalis が歯肉組織へ感染する際の上皮細胞層の侵入経路について、細胞膜上のコレステロール阻害剤であるメチル- β -シクロデキストリン ($M\beta CD$) を用いて検討した。二次元培養の IHGE 細胞を $M\beta CD$ 処理すると、細胞内へ侵入した *P. gingivalis* の数は、コントロール処理細胞と比較すると、著しく減少していた。次に、3D 上皮細胞層を $M\beta CD$ 処理しても、上皮細胞層に対する *P. gingivalis* の透過性は時間依存的に増加したことから、*P. gingivalis* は細胞内を移動するのではなく、上皮細胞層の細胞間隙を主な移動経路として、歯肉組織の結合組織層へ移動していることが示唆された。

(3) 3D 歯肉モデル組織深部への *P. gingivalis* の侵入

歯周病菌感染歯肉モデル組織における *P. gingivalis* の挙動を解析した。感染 4 時間後、*P. gingivalis* は上皮細胞層を通過し、結合組織層上部まで侵入していた (図 2)。さらに感染 24 時間後には、*P. gingivalis* は結合組織層中の血管網構造まで到達していることが確認できた (図 3)。また、トリプシン様プロテアーゼ活性を持つジンジパイン欠損 *P. gingivalis* 感染歯肉モデル組織では、血管網構造へ到達した菌数が減少したことから、ジンジパインが *P. gingivalis* の歯肉組織深部への移動と、血管網構造への感染に関与している可能性が示唆された。

血管網構造へ感染するための *P. gingivalis* 誘引因子を探索するために、55 種類の血管新生関連因子の発現解析を行なった。これにより、血管新生促進因子である血管内皮細胞増殖因子や IL-8 など、15 種類の因子を誘引因子候補とすることができた。

歯周病菌感染歯肉モデル組織における菌数の経時時間変化を定量解析した。その結果、歯肉モデル組織へ感染後、24 時間で菌数は約 2 倍まで組織内で増加し、少なくとも 48 時間は組織内で維持されていた。このことから、3D 歯肉モデル組織に感染した *P. gingivalis* は、組織内で生存・増殖できることが示された (図 4)。

本研究で構築した 3D 歯肉モデル組織は、 $M\beta CD$ をはじめとする阻害剤などの薬剤投与実験に用いることも、*P. gingivalis* のみを感染させることもできるため、*in vivo* の研究では知り得なかった新たな知見を得ることができると考えられる。ヒト由来の歯肉組織には、様々な微生物が存在していることが多いため、無感染状態の組織で、*P. gingivalis* が上皮組織や血管網構造へ到達できることは、歯周病の病因を検討する上で有意義である。さらに、血管網構造を有する本モデル組織は、歯肉組織深部への歯周病菌の侵入について検証を進める上で、重要な役割を果たすことが示された。今後、本モデル組織を用いることで、*P. gingivalis* が血管網へ侵入するまでの一連の動態を長時間、観察することが可能になるとともに、本モデル組織が、感染メカニズムの解明や、歯周病治療薬のスクリーニングに有用な評価系として、活用されることが期待される。

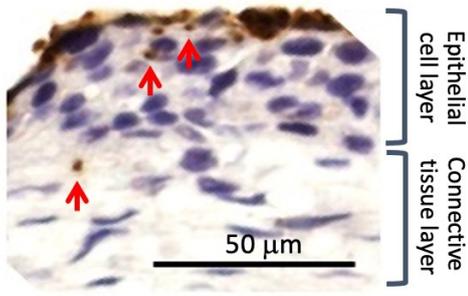


図 2. 感染 4 時間後の 3D 歯肉モデル組織における *P. gingivalis* の局在。茶色のシグナルが *P. gingivalis* を表す。矢印は組織へ侵入している *P. gingivalis* を示す。

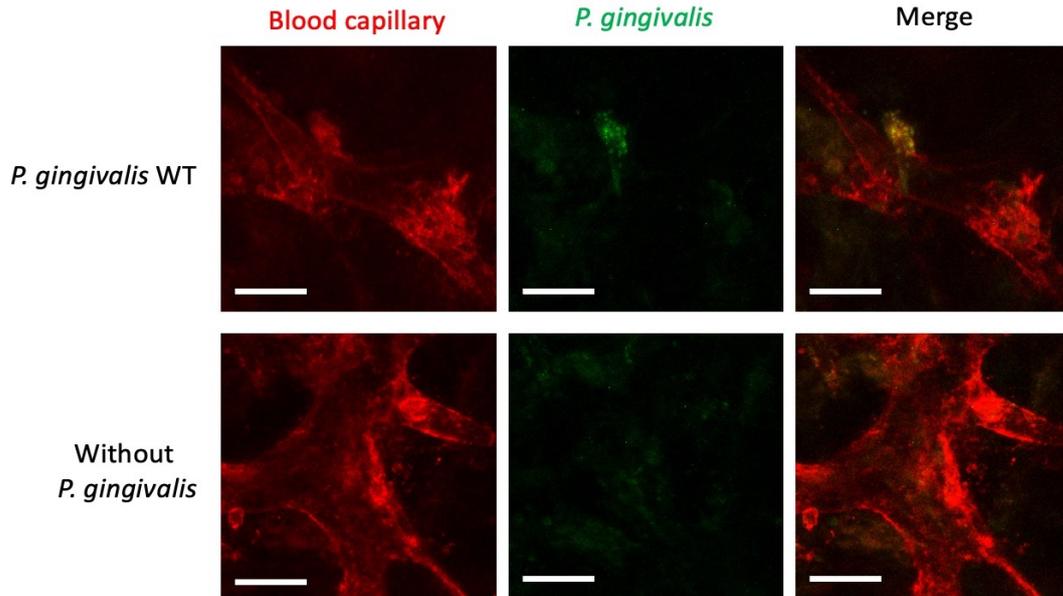


図 3. 3D 歯肉モデル組織内の血管網構造における感染 24 時間後の *P. gingivalis* の局在。スケールバー 20 μm 。

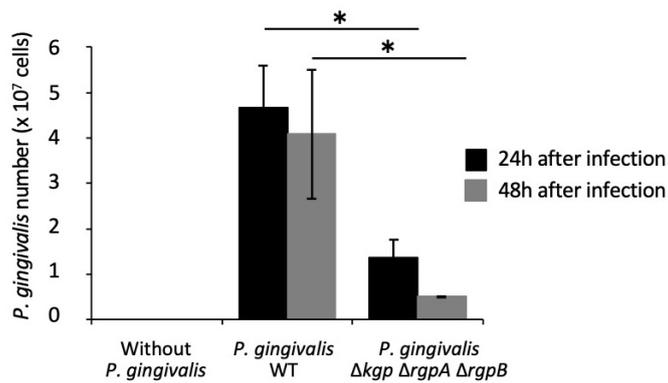


図 4. 感染 24 及び 48 時間後の 3D 歯肉モデル組織における *P. gingivalis* の菌数比較。* $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Naoko Sasaki, Hiroki Takeuchi, Shiro Kitano, Shinji Irie, Atsuo Amano, Michiya Matsusaki	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 Hiroki Takeuchi, Shunsuke Yamaga, Naoko Sasaki, Masae Kuboniwa, Michiya Matsusaki, Atsuo Amano	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 1 ~ 13
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi Hiroki, Kato Yuta, Sasaki Naoko, Tanigaki Keita, Yamaga Shunsuke, Mita Ena, Kuboniwa Masae, Matsusaki Michiya, Amano Atsuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Surface pre-reacted glass-ionomer eluate protects gingival epithelium from penetration by lipopolysaccharides and peptidoglycans via transcription factor EB pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0271192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0271192	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 Shang Yucheng, Zeng Jinfeng, Xie Zhengtian, Sasaki Naoko, Matsusaki Michiya	4. 巻 95
2. 論文標題 Effect of Extracellular Matrix Density and Cell Number on Blood Capillary Formation in Three-Dimensional Tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20220108	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoko Sasaki, Hiroki Takeuchi, Shiro Kitano, Shinji Irie, Atsuo Amano, Michiya Matsusaki
2. 発表標題 Construction of Vascularized Gingival Tissue as a Model of Porphyromonas gingivalis Infection
3. 学会等名 World Biomaterials Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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肉組織モデルへの感染過程における歯周病菌の動態解析
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第15回若手研究発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2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 大阪大学、凸版印刷
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-168577	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

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 大阪大学、凸版印刷
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	松崎 典弥 (Matsusaki Michiya) (00419467)	大阪大学・大学院工学研究科・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
---------	---------