

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18503

研究課題名(和文) ANGPTL4による歯肉上皮系バリアシステム制御と創傷治癒に対する効果

研究課題名(英文) ANGPTL4 on the Regulation of Gingival Epithelial Barrier and Wound Healing

研究代表者

原 実生 (Hara, Miki)

新潟大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60848266

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)：上皮系細胞で構築されるバリアシステムは外来因子に対する物理的バリアとして機能し、生体の恒常性維持を担っており、その破綻は感染症や炎症性疾患の発症に関与する。ANGPTL4は障害組織の修復を促進するための局所的な環境を整える「局所環境制御因子」としての役割が注目されているが、口腔の上皮バリアにおける報告はほとんどない。

ANGPTL4は上皮バリアにおいて恒常的な発現が認められ炎症誘導により発現が低下した。ANGPTL4処置により物理的バリア機能を強化する傾向が認められ、歯周炎の病態形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンジオポエチン様因子は、血管新生作用、リンパ組織の新生能を有し、組織リモデリング因子として機能するのみならず、障害組織の修復を促進するための局所的な環境を整える「局所環境制御因子」としての機能が近年注目されている。しかしこの機能に着目して、歯周炎の制御を狙う検討はこれまでに報告がなく、口腔疾患の理解を深める学術的な意味を持つ。またそのメカニズムが明らかとなれば、歯周炎のみならず全身の上皮系バリア機構が関連する炎症性腸疾患やアトピー性皮膚炎などの病態解明や新しい治療法の開発につながる可能性をもち、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：ANGPTL4 regulates the microenvironment and promotes repair of damaged tissues. However, little has been reported on its physiological role in periodontal tissues. The purpose of this study was to determine whether ANGPTL4 regulates the local environment in the gingival barrier function. ANGPTL4 was expressed constantly in gingival epithelial cells and gingival fibroblasts, but its expression was decreased by inflammation. On the other hand, the addition of ANGPTL4 in inflammatory conditions promoted the migration of epithelial cells. This suggests that ANGPTL4 may function as a local environmental regulator in periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯肉上皮バリア ANGPTL4 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

生体と外部環境との境界面を規定している上皮細胞とその直下に存在する線維芽細胞は、外来因子に対する物理的バリアとして機能し、生体恒常性維持を担っている。これら上皮系細胞で構築されるバリアシステムの破綻は、外来病原因子が宿主内に侵入することを意味し、感染症や炎症性疾患の発症・進行に大きく関与する。なかでも、腸管上皮バリアの破綻した状態は *leaky gut* と呼ばれ、腸管から漏出した病原因子が局所にとどまらず全身性に悪影響を与えることが明らかとなっている。歯周炎においても、外来病原因子によって生じる歯周ポケット内縁上皮の潰瘍面から病原因子が断続的に宿主内へ流入することは、歯周組織における炎症の惹起とその慢性化に関与している。申請者もこれまでに、主要な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* が歯肉上皮のバリア機能を低下させ、上皮系バリアシステムの機能破綻が歯周炎の発症・進行と密接に関連することを報告した。その一方で、上皮系バリアシステムを維持・強化する因子の報告や、その分子メカニズムの十分な解明には至っていない。

アンジオポエチン様因子 (angiopoietin-like protein: ANGPTL) は、血管新生や幹細胞の維持に関わるアンジオポエチンに類似する構造的特徴を持つ分子であり、その構造や活性様式の違いにより現在 8 種類の ANGPTL ファミリーが同定されている。全身の様々な組織や臓器に発現していることが知られており、アンジオポエチン同様の血管新生作用に加え、リンパ組織の新生能を有し、組織リモデリング因子として機能する。また、抗炎症作用も報告されており、心筋梗塞や腹膜炎モデルの炎症応答を抑制することが報告されている。さらに近年では、ANGPTL4 は皮膚の創傷において上皮細胞の遊走を促すことや、線維芽細胞のコラーゲン産生を制御することが報告されており、障害組織の修復を促進するための局所的な環境を整える「局所環境制御因子」としての機能が注目されている。

申請者らはこれまでに、食物に含まれる脂質の脂肪酸代謝過程で産生されるいくつかの中間代謝産物が、歯肉上皮細胞からの ANGPTL4 発現を顕著に誘導することを確認している。しかしながら、産生誘導される ANGPTL4 が口腔の上皮系バリアシステムの維持における作用及びその重要性についての報告は無く、歯周炎の病態形成との関連は不明である。

2. 研究の目的

これらのことから本研究課題の目的は、口腔の上皮系バリアシステムにおける ANGPTL4 の局所環境制御因子としての役割を明らかにすることで、歯周炎の進行や治癒における関与を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 実験的歯周炎モデルマウスにおける ANGPTL4 発現プロファイルの解析

C56BL/6 マウスの上顎左側第二臼歯を 5-0 絹糸にて結紮することで、歯肉組織における炎症と歯槽骨破壊を誘導し、経時的なサンプリングと解析を行う。歯肉組織を採取し、通法に従い mRNA を抽出して cDNA を合成後 ANGPTL4 に特異的なプライマーを用いて qPCR を行い、歯周組織における ANGPTL4 遺伝子の経時的な発現変動を解析する。歯周組織のパラフィン切片を作成し、ANGPTL4 に特異的な抗体を用いて免疫組織染色を行い、その発現と局在性を評価する。

(2) 歯肉上皮系バリア細胞における ANGPTL4 の発現解析

歯周組織において上皮系バリアを構成する歯肉上皮細胞および線維芽細胞を用いて解析を行う。ヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22) およびヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) を培養し、ANGPTL4 の遺伝子発現を qPCR にて、タンパク発現とその局在を免疫蛍光染色にて確認する。また、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) 由来の LPS で刺激を行い、遺伝子発現変動を qPCR にて、タンパク発現変動を Western blot にて比較検討する。

(3) ANGPTL4 による上皮系バリアシステム維持・修復作用の検証

Ca9-22 および HGF にリコンビナント ANGPTL4 を各種濃度で添加し、細胞為害性を MTT アッセイで確認し、至適濃度を決定する。次に、Ca9-22 をコンフルエントになるまで培養し上記で決定した濃度の ANGPTL4 処置した後、*P.g.* 由来の LPS で刺激することで上皮バリア機能障害を誘導する。Transwell® と蛍光標識デキストランを用いた透過性試験を行い、ANGPTL4 添加の有無によるバリア機能の評価を行う。同様の条件で全 RNA を抽出し、バリア関連分子である

Tight junction, Adherence junction および細胞増殖マーカーの遺伝子発現解析を real-time PCR 法で解析する。

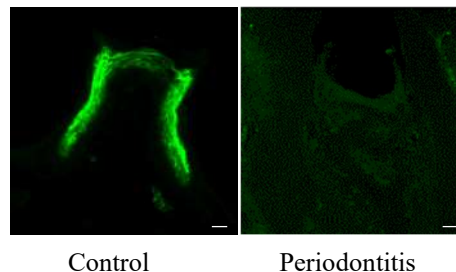
次に、Ca9-22 および HGF をコンフルエントになるまで培養したのちにスクラッチ処理を施し、ANGPTL4 添加の有無による創傷治癒効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 実験的歯周炎モデルマウスにおける ANGPTL4 発現プロファイルの解析

申請者らがこれまでに樹立した歯牙結紮歯周炎モデルマウスを用いて歯周組織における ANGPTL4 の発現プロファイルを解析した。ANGPTL4 はタンパクレベルで歯肉上皮周囲に限局した発現を認め、実験的歯周炎の惹起によりその発現は著明に減少した (図 1)。

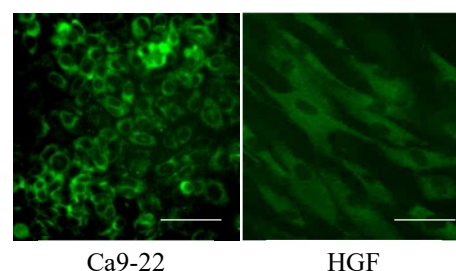
(図 1)



(2) 歯肉上皮系バリア細胞における ANGPTL4 の発現解析

歯肉上皮系バリアを構成するヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22) およびヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) における ANGPTL4 の発現を検証した。Ca9-22、HGF において遺伝子レベル、タンパクレベルでの恒常的な発現を認めた (図 2)。

(図 2)

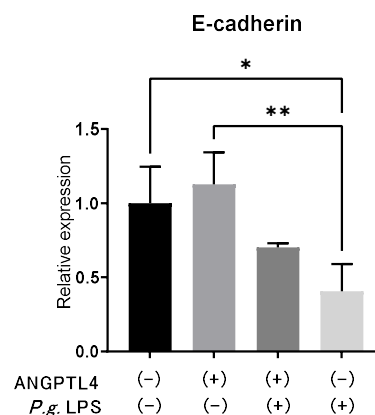


次に、炎症状態における発現変動を解析する目的で、歯周病原細菌 *P.g.* 由来の LPS で刺激するといずれの細胞においても ANGPTL4 の発現は低下した。

(3) ANGPTL4 による上皮系バリアシステム維持・修復作用の検証

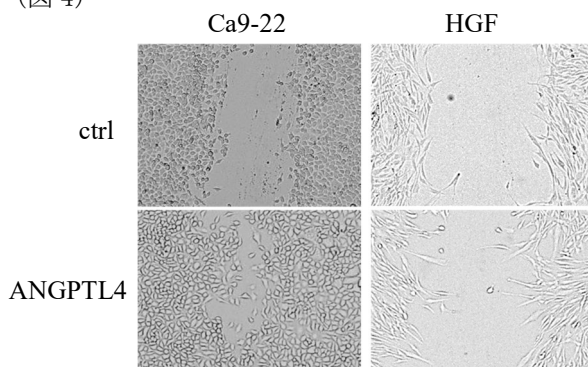
歯肉上皮細胞及び線維芽細胞を用いて、ANGPTL4 が局所環境制御因子として機能するか検討を行った。Transwell® と蛍光標識デキストランを用いた透過性試験において、*P.g.* LPS によって誘導されたバリア機能低下に対し、ANGPTL4 添加による明らかな変化は認められなかった。一方で *P.g.* LPS により低下する上皮バリア関連遺伝子の発現が ANGPTL4 により抑制される傾向が認められた (図 3)。

(図 3)

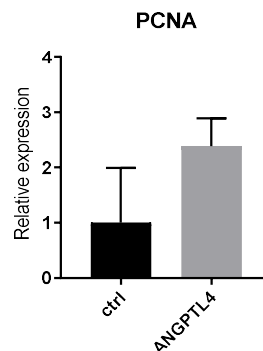


またスクラッチアッセイにおいて、Ca9-22 は ANGPTL4 の添加により細胞の移動が誘導された (図 4)。細胞増殖マーカーである PCNA は ANGPTL4 の添加により増加する傾向が認められた (図 5)。

(図 4)



(図 5)



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 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mineo Shuhei, Takahashi Naoki, Yamada-Hara Miki, Tsuzuno Takahiro, Aoki-Nonaka Yukari, Tabeta Koichi	4. 巻 129
2. 論文標題 Rice bran-derived protein fractions enhance sulforaphane-induced anti-oxidative activity in gingival epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105215 ~ 105215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2021.105215	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 Sato Keisuke, Yamazaki Kyoko, Kato Tamotsu, Nakanishi Yumiko, Tsuzuno Takahiro, Yokoji-Takeuchi Mai, Yamada-Hara Miki, Miura Nobuaki, Okuda Shujiro, Ohno Hiroshi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Obesity-Related Gut Microbiota Aggravates Alveolar Bone Destruction in Experimental Periodontitis through Elevation of Uric Acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	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) 10.1128/mBio.00771-21	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 Yamazaki Kyoko, Kato Tamotsu, Tsuboi Yuuri, Miyauchi Eiji, Suda Wataru, Sato Keisuke, Nakajima Mayuka, Yokoji-Takeuchi Mai, Yamada-Hara Miki, Tsuzuno Takahiro, Matsugishi Aoi, Takahashi Naoki, Tabeta Koichi, Miura Nobuaki, Okuda Shujiro, Kikuchi Jun, Ohno Hiroshi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Oral Pathobiont-Induced Changes in Gut Microbiota Aggravate the Pathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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) 10.3389/fimmu.2021.766170	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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 0件)

1. 発表者名 都野隆博, 高橋直紀, 峰尾修平, 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作用の解析
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会2020年度春季学術大会
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
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
---------	---------