

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18540

研究課題名（和文）歯石結晶および歯周病原細菌による歯周ポケット上皮バリア破壊メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the periodontal pocket epithelium barrier destruction mechanism caused by dental calculus and periodontopathic bacteria

研究代表者

ジャウディン エスエム (Ziauddin, SM)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・客員研究員

研究者番号：80868141

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）：歯周病患者では歯石沈着により症状が悪化することが知られているが、歯石が歯周病の病状を悪化させるメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、歯石中のリン酸カルシウム結晶が、マクロファージにおいてはNLRP3インフラマソームという自然炎症経路を活性化して炎症性サイトカインIL-1産生を誘導し、歯肉上皮細胞においては、ピロトーシスと呼ばれるインフラマソーム依存性細胞死を誘導して上皮細胞シートの透過性を亢進させることを明らかにした。これらの結果から、歯石粒子の歯肉上皮バリア破壊と歯周組織における炎症拡大への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病患者では歯石沈着により症状が悪化することは広く知られているが、歯石はブランクリテンション因子と考えられ、歯石自体の有害作用はあまり知られていない。本研究では、歯石中のリン酸カルシウム結晶が、NLRP3インフラマソームの活性化を介して歯周組織の破壊と歯周組炎症拡大に関与することを示したものであり、学術的に重要な意味を持つと同時に、今後の新たな歯周病の診断、治療法の開発へ寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：It is known that calculus aggravates periodontal disease, but the mechanism has not been elucidated. In this study, we have clarified that calcium phosphate crystals in dental calculus activate the NLRP3 inflammasome to induce IL-1 production in macrophages, and induce inflammasome-dependent cell death called pyroptosis in gingival epithelial cells that enhances the permeability of the epithelial cell sheet. These results suggest that calculus particles are involved in the destruction of the gingival epithelial barrier and the exacerbation of inflammation in the periodontal tissue.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯石 歯周病原細菌 上皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯石は歯周炎の代表的なリスク因子の 1 つであり、歯石が沈着した部位で歯周炎は進行しやすく、歯石を取り残すと深いポケットが残存しやすい。近年、生体の様々な部位において、組織に沈着した結晶が NLRP3 インフラマソームと呼ばれる蛋白複合体を活性化して炎症や組織傷害を起こすことが明らかとなった。痛風における関節包内の尿酸ナトリウム結晶、塵肺におけるシリカ結晶などはこの例である。これらの疾患では、組織に蓄積された結晶がマクロファージに貪食され、NLRP3 インフラマソームを活性化する。インフラマソームは、IL-1 前駆体を成熟型蛋白として分泌させ、IL-1 は免疫系細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など幅広い細胞に炎症性サイトカインや接着分子の発現を誘導し、組織に炎症を引き起こす。

我々は、歯石中のリン酸カルシウム結晶もインフラマソームを活性化し、IL-1 産生を誘導していると仮説を立て、粉碎した歯石でマウスマクロファージを刺激した。その結果歯石濃度依存的に、マクロファージから IL-1 が誘導されることを明らかとした (Montenegro RJL et al., PLoS ONE, 11(9), e0162865, 2016)。また、歯石で歯肉上皮細胞を刺激すると、ピロトーシスと呼ばれるインフラマソーム依存性細胞死が誘導されることも明らかにした (Ziauddin SM et al., J Periodontal Res, 53(3), 353-361, 2018)。

歯肉上皮細胞に細胞死が誘導されれば、歯肉溝/歯周ポケット上皮のバリアが破壊され、プラーク中の細菌の侵入を許し、歯周組織破壊が進行する。これまでに、プラーク中の細菌により誘導される歯肉上皮細胞の細胞死については多くの報告があるが、プラーク中の細菌と歯石結晶粒子の細胞傷害性を比較した研究はない。

2. 研究の目的

本研究では、歯石結晶粒子と歯周病原細菌がそれぞれ歯肉上皮細胞にどの程度の細胞傷害性を有し、上皮細胞のバリア破壊の原因となるのかを比較する。結晶粒子や細菌の細胞傷害性は、これらに暴露される細胞の由来する組織により異なると予想されるため、マクロファージ様細胞をコントロールに用いる。これらの実験により、歯肉溝/歯周ポケット上皮のバリア破壊における歯石結晶粒子と歯周病原細菌の相対的依存度を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

歯石中には結晶成分だけでなく細菌やヒト組織由来の有機成分も含まれるため、本研究では無機的に合成されたハイドロキシアパタイト (HA) (市販の 40 nm、150 nm、 $<2 \mu\text{m}$ のものを購入)も使用した。HA 結晶と歯周病原細菌の歯肉上皮細胞および細胞シートに対する細胞傷害性を以下の方法で検討した。

(1) 歯肉上皮細胞 HSC-2 を HA 結晶と歯周病原細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Fusobacterium nucleatum* に暴露し、細胞傷害性を比較した。細胞傷害性は、細胞内から放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 測定試験と死細胞をヨウ化プロピジウム (PI) で染色する方法を用いた。

また、歯肉上皮細胞に対する細胞傷害性は、他の組織由来の細胞と異なる可能性があるため、PMA でマクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞をコントロールとして使用した。

(2) 上記(1)ではヒト口腔上皮癌由来 HSC-2 細胞を使用した。正常口腔上皮細胞についても HA 結晶、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Fusobacterium nucleatum* に暴露して細胞傷害性を測定し、HSC-2 細胞と同様の結果が得られるかどうか検証した。また、コントロールとして THP-1 細胞の代わりにヒト末梢血から分離した単球を用いて、PMA でマクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞と同様の結果が得られるか検証した。

(3) メンブレンフィルター上に歯肉上皮細胞 HSC-2 がコンフルエントになるまで単層培養し、この細胞シート上に HA 結晶および歯周病原細菌を添加し、低分子量蛍光物質または色素による透過性試験を行った。

この解析から、HA 結晶および歯周病原細菌が上皮細胞のバリア機能の破壊に及ぼす影響を比較した。

(4) 歯肉上皮細胞 HSC-2 を HA 結晶と歯周病原細菌に暴露し、細胞死の誘導されるメカニズムの違いについて解析した。細胞死には、外傷などによって誘導されるネクローシスとプログラムされた細胞死であるアポトーシス、両者の特徴を合わせ持つピロトーシスやネクローシスなどが存在する。結晶粒子はピロトーシスを誘導し、菌体成分はアポトーシスやピロトーシス、ネクローシスを誘導することが知られているが、歯肉上皮細胞にどのような細胞死が誘導されるか解析した。また、コントロールとして PMA 処理した THP-1 細胞を用いてマクロファージの細胞死の誘導メカニズムと比較した。

4. 研究成果

(1) 口腔上皮癌由来 HSC-2 細胞を、歯周病患者から採取した歯石を粉砕した歯石粒子、歯石中に多く含まれる結晶成分である合成ハイドロキシアパタイト (HA)、歯周病原細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Fusobacterium nucleatum* の凍結乾燥菌体に暴露し、細胞傷害性を細胞内からの乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出試験で測定した。その結果、HSC-2 細胞においては歯石および HA 結晶に凍結乾燥 *A. actinomycetemcomitans*、*F. nucleatum* よりも有意に強い細胞傷害性が認められた (図 1)。死細胞をヨウ化プロピジウム (PI) で染色する方法においても、同様の結果が得られた。

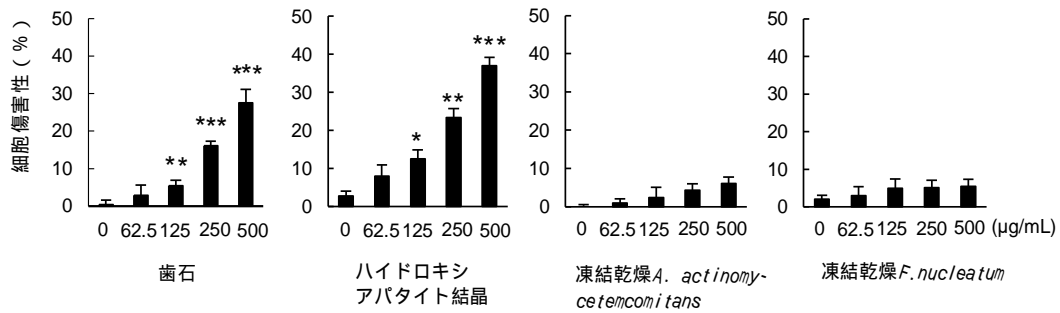


図 1. HSC-2 口腔上皮細胞における細胞傷害性

コントロールとして用いた PMA でマクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞においては、歯石および HA 結晶よりも凍結乾燥 *A. actinomycetemcomitans*、*F. nucleatum* に強い細胞傷害性が認められた (図 2)。

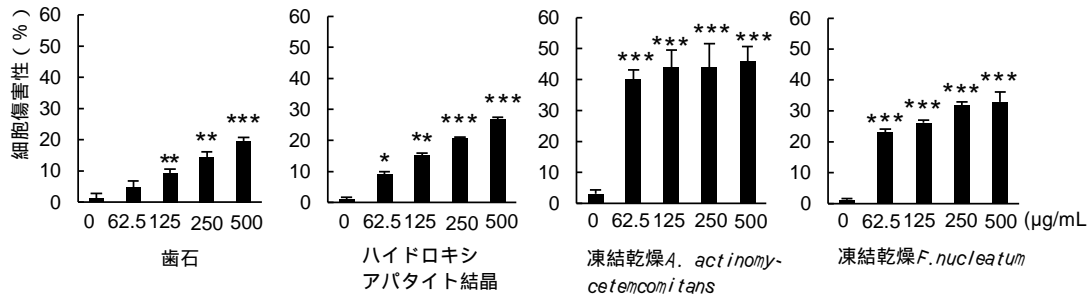


図 2. THP-1 マクロファージにおける細胞傷害性

(2) 正常口腔上皮細胞 HOMK 細胞も歯石粒子、HA 結晶、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Fusobacterium nucleatum* に暴露して細胞傷害性を測定した。HSC-2 細胞と同様に、歯石および HA 結晶に凍結乾燥 *A. actinomycetemcomitans*、*F. nucleatum* よりも有意に強い細胞傷害性が認められた (図 3)。

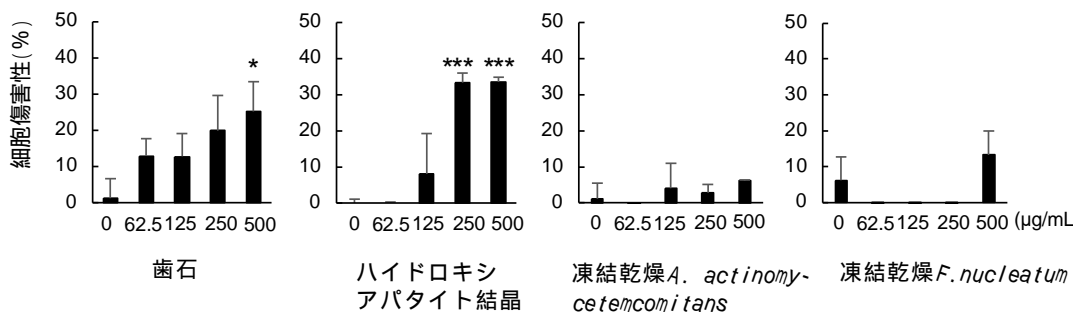


図 3. HOMK 正常口腔上皮細胞における細胞傷害性

末梢血単核球も歯石粒子、HA結晶、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Fusobacterium nucleatum*に暴露して細胞傷害性を測定した。PMAでマクロファージ様細胞に分化させたTHP-1細胞と同様に歯石およびHA結晶よりも凍結乾燥*A. actinomycetemcomitans*、*F. nucleatum*に強い細胞傷害性が認められた(図4)。

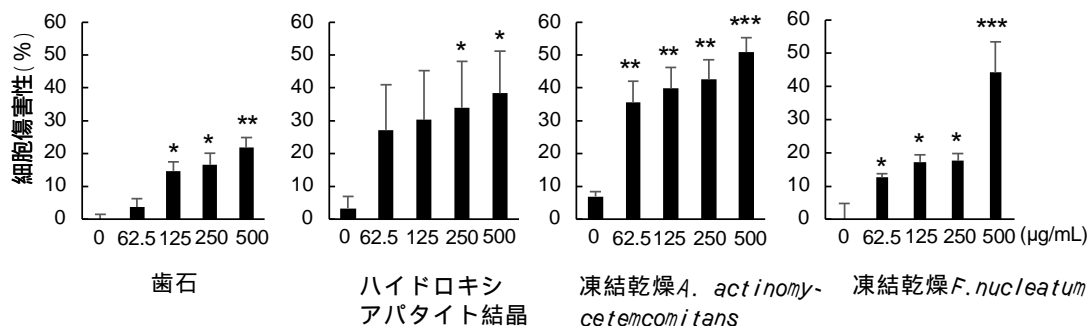


図4. 末梢血単核球における細胞傷害性

(3) メンブレンフィルター上に歯肉上皮細胞HSC-2がコンフルエントになるまで単層培養し、この細胞シート上にHA結晶および歯周病原細菌を添加し、トリパンブルー色素による透過性試験を行った。歯石粒子およびHA結晶を添加した場合には細胞シートの色素透過性は亢進したが、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*)、*Fusobacterium nucleatum* (*F.n.*)を添加した場合には細胞シートの色素透過性は亢進しなかった(図5)。

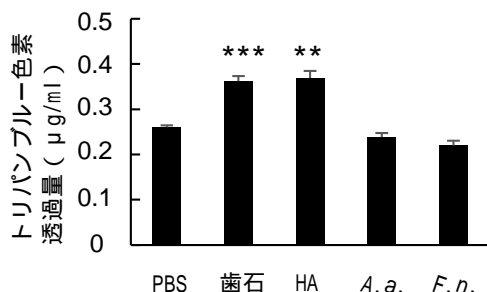


図5. HSC-2口腔上皮細胞におけるトリパンブルー色素透過性

(4) 歯肉上皮細胞HSC-2をHA結晶と歯周病原細菌に暴露し、細胞死の誘導されるメカニズムの違いについて解析した。歯石またはHA結晶で誘導した細胞死は、NLRP3インフラマソーム阻害剤Glyburideで抑制されたが、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*または*Fusobacterium nucleatum*で誘導した細胞死は、Glyburideで抑制されなかった(図6)。このことから、歯石およびHA結晶ではインフラマソーム依存性細胞死ピロトーシスが誘導され、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*および*Fusobacterium nucleatum*ではインフラマソーム非依存性の細胞死が誘導されたと考えられる。

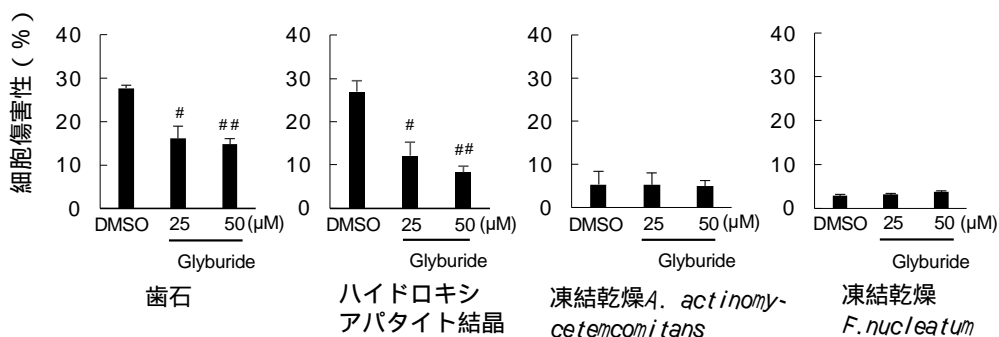


図6. HSC-2口腔上皮細胞におけるNLRP3インフラマソーム阻害剤Glyburideの細胞傷害性抑制効果

これらの結果から、歯石結晶粒子は上皮細胞にピロトーシスを誘導し、マクロファージが歯周病原細菌に暴露されると上皮細胞よりも細胞死が誘導されやすいのと対照的に、上皮細胞は比較的ピロトーシスにも感受性が高いことが示唆された。このことは、歯石粒子が歯肉上皮バリア破壊へ関与している可能性を示していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ziauddin S.M., Alam Mohammad Ibtehad, Mae Megumi, Oohira Masayuki, Higuchi Kanako, Yamashita Yasunori, Ozaki Yukio, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytotoxic effects of dental calculus particles and freeze dried Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Fusobacterium nucleatum on HSC 2 oral epithelial cells and THP 1 macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	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） 10.1002/JPER.21-0196	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 Mae Megumi, Alam Mohammad Ibtehad, Yamashita Yasunori, Ozaki Yukio, Higuchi Kanako, Ziauddin S. M., Montenegro Raudales Jorge Luis, Sakai Eiko, Tsukuba Takayuki, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 The Role of Cytokines Produced via the NLRP3 Inflammasome in Mouse Macrophages Stimulated with Dental Calculus in Osteoclastogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12434 ~ 12434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212434	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 MATSUURA Takashi, ZIAUDDIN S. M., KAWATA-MATSUURA Viviane K. S., SUGIMOTO Kouji, YAMADA Shizuka, YOSHIMURA Atsutoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Long-term clinical and radiographic evaluation of the effectiveness of direct pulp capping materials: A meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2020-043	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasunori Yamashita, Yukio Ozaki, Kanako Higuchi, Masayuki Oohira, Megumi Mae, Ziauddin S.M., Atsutoshi Yoshimura
2. 発表標題 Role of quiescent osteoclast precursors in occlusal trauma in mice
3. 学会等名 The 106th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, the Japanese Academy of Clinical Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松裏貴史, S. M. Ziauddin, 松裏恵子, 杉本浩司, 山田志津香, 吉村篤利
2. 発表標題 直接覆髄材の有効性に関する長期臨床評価: メタアナリシス
3. 学会等名 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 尾崎幸生、山下恭徳、前めぐみ、大平真之、Ziauddin SM、Alam IM、樋口賀奈子、金子高士、吉村篤利
2. 発表標題 ペプチドグリカンおよびリポ多糖投与マウス歯槽骨面上の破骨細胞形成におけるIL-10の役割
3. 学会等名 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 山下 恭徳, 前 めぐみ, 大平 真之, 樋口 賀奈子, Ziauddin S.M., 尾崎 幸生, 吉村 篤利
2. 発表標題 音波振動歯ブラシの臨床的有用性の評価
3. 学会等名 第63回日本歯周病学会春季学術大会
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
---------	---------