

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09846

研究課題名（和文）腸-口腔相関を制御する免疫系バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Identification of Immune System Biomarkers Regulating the Gut-Oral axis

研究代表者

小林 良喜（KOBAYASHI, Ryoki）

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：10609085

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：生体の入り口である口腔は、外来抗原や病原性微生物の侵入を防ぐ重要な場所である。小腸を含む腸管は免疫細胞の約6割が存在し、食事由来成分などの刺激により自然免疫システム/獲得免疫システムが活性化され、全身の各臓器に波及することで生体恒常性の維持・亢進されている。プロバイオティクス機能を有する乳酸菌による腸を起点とした免疫機能の賦活化が全身に波及することが知られているが、口腔の免疫システムを活性化させる免疫系シグナル分子を見出した。口腔の免疫システムの賦活化が食事由来成分により腸管を起点としたヘルスケアや予防医療システムの技術開発に寄与する基礎情報を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

解剖学的特徴から独自の常在菌叢を有し、全身免疫システムと粘膜免疫システムを併せ持つユニークな免疫システムを構築している。腸管を起点とした全身の臓器連関を理解するために免疫系システムによる解明が取り組まれている。本研究では口腔免疫システムを活性化させる機序を腸-口腔相関と捉えて免疫系シグナル分子の探索を行った。腸管免疫システムを起点とした免疫機能の賦活化が口腔に至る機序を解明することは口腔内疾患だけでなく、生活習慣病を含む全身疾患の発症リスクの軽減にも有効であり、「子供の健やかな育ち」や「高齢者の健やかな老い」に対する取り組みの起点となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The oral cavity, as the gateway to the body, has a crucial function in protecting against the entry of foreign substances and harmful microorganisms. Otherwise, the small intestines contain approximately 60% of the body's immune cells. Stimulation by dietary components activates both the innate and acquired immune systems, which then spread to various organs throughout the body, thus maintaining and enhancing homeostasis. Probiotics, such as lactic acid bacteria, are known to activate the immune function, starting in the gut and spreading throughout the body. We have identified immune signaling molecules that activate the immune system in the oral cavity. This activation of the oral immune system by dietary components provides essential information that contributes to the development of healthcare and preventive medical technologies, starting from the gut.

研究分野：口腔免疫

キーワード：腸口腔相関 免疫系バイオマーカー 抗菌性ペプチド ディフェンシン

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体の入り口である口腔は、外来抗原や病原性微生物の侵入を防ぐ重要な場所である。軟組織（歯肉・舌・頬）と硬組織（歯）から構成される解剖学的特徴から、好氣的や嫌氣的の部位が混在して多様な常在菌叢が存在する。また、顎骨が裏打ちすることで他の消化器官と異なるユニーク性を有している。近年、免疫系システムは生体防御作用だけでなく生体リズムを一定に保つ生体恒常性の維持・亢進における中心的な役割を担うことが報告されている。免疫細胞の約6割が存在している腸管は栄養素の消化・吸収の場だけでなく、独自に構成された常在細菌叢により免疫細胞を活性化させる場として注目され、免疫細胞や液性因子の全身循環が多臓器間ネットワークシステムに及ぼす影響の解明に向けて様々な取り組みがなされている。しかしながら、口腔に対する免疫波及機序は依然として不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

そこで、腸-口腔相関を制御する免疫系パラメータを検討するために、プロバイオティクス乳酸菌の胃内投与により、腸管を起点とした免疫機能の賦活化が口腔領域に波及する機序について、免疫系シグナル分子による多臓器関連ネットワークシステムを解明することを目的とした。これまでに、唾液中に抗菌性ペプチド( $\beta$ -ディフェンシン, bD3)を産生することで歯周炎の発症抑制や症状を軽減させることを報告した(Kobayashi R, et al., Sci rep 2017)が、腸管から口腔周囲組織に波及する機序はまだ不明である。本研究に先立ち、腸管から口腔に波及させるシグナル分子(サイトカインや遊離核酸など)として脈管系に着目し、乳酸菌投与マウスから採取した血清をBALB/cマウスに尾静脈投与させたところ、唾液中に抗菌性ペプチドの産生応答や口腔周囲組織(唾液腺・舌・歯肉)に遺伝子発現が増加することを確認している。しかしながら関与する液性因子の詳細は不明であった。本研究では腸管を起点として口腔周囲組織に活性化した免疫応答を波及させるシグナル分子の解明を目的とし、腸管免疫機構の活性化が口腔周囲組織に波及する機序について免疫系を中心とする多臓器関連ネットワークシステムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

プロバイオティクス乳酸菌による抗菌ペプチド(bD3)の産生誘導機序を解明するためにマウスを用いてサイトカイン等を中心とした液性因子の探索を行い、産生誘導が寄与することを中和抗体により機能的に検証する。

#### (1) 液性因子(免疫系バイオマーカー)の探索

粘膜免疫システムではIL-17やIL-22による抗菌性ペプチドの産生誘導が報告されているが、唾液腺など口腔領域における産生誘導機序は不明である。そこで、本研究ではこれまでの報告をサイトカインによる腸-口腔相関による抗菌性ペプチドの産生誘導機序をプロバイオティクス乳酸菌の胃内投与させた後、マウスから採取した各々の臓器中におけるIL-22産生を応答をELISA法、qPCR法を用いて検討する。

#### (2) 免疫系バイオマーカーを用いたbD3産生誘導機序の解明

上記①の成果を踏まえ、免疫系バイオマーカー(IL-22)が唾液bD3産生応答に寄与することをIn vitro / In vivo系を用いて検討する。IL-22が寄与することを解析するためにヒト/マウス由来の歯肉上皮細胞株やマウスに中和抗体を用いて検討した。bD3産生

誘導を確認するために特異抗体を用いた蛍光標識抗体による化学免疫組織染色解析、遺伝子発現解析 (qPCR)、タンパク質発現解析等 (ELISA) を用いた。

#### 4. 研究成果

免疫機能の賦活化が腸管を起点として口腔領域に波及する機序を理解する免疫系シグナル分子の探索を目的とする中で、プロバイオティクス乳酸菌を用いて *in vivo* / *in vitro* 系の実験を用いて検討した。

マウスを用いた *in vivo* 系試験では、免疫系シグナル分子としてサイトカインの探索を行った。小腸における自然免疫システムの活性化としてサイトカインシグナルによる抗菌ペプチドの産生誘導が報告されている。他の研究者らの報告から、食事由来成分など外来抗原刺激により抗原提示細胞が活性化され IL-23 刺激により活性化されたエフェクター細胞が IL-22 を産生、小腸上皮細胞を刺激することで腸管腔内に抗菌性ペプチドが産生される。IL-22 産生されるエフェクター細胞には Th22 や Th17 が報告されている。さらに、近年報告されている 3 型自然リンパ球 (Type 3 Innate lymphocyte cells; ILCs) がある。これらの知見を踏まえて、唾液中の  $\beta$ -ディフェンシン 3 (bD3) 産生誘導が IL-22 に依存することを検討した。

プロバイオティクス乳酸菌 (LAB) を投与したマウスの小腸における IL-22 産生誘導を検討したところ、経過時間的に増加していることをタンパクレベルおよび遺伝子レベルで認められた。また、IL-22 活性に拮抗する IL-22 結合タンパク質 (IL-22 Binding protein; IL-22BP) が LAB 投与群の小腸で有意に減少していることを認めた。同時に、血液中に IL-22 が有意に増加していることを ELISA 法で認めたことから、小腸にて産生された IL-22 が血行由来で全身循環する可能性が示唆された。IL-22 は IL-22 受容体 (IL-22R) を介してシグナル伝達され、IL-22BP との相互作用によって調節されることから、本研究の目的である口腔領域の標的組織である舌や歯肉での発現を検討した。LAB 投与マウスにおける小腸では投与期間中に IL-22R の発現を認めるが、口腔領域では経時的に歯肉で増加することが認められた。この結果から、小腸で産生された IL-22 は血行経路にて歯肉組織に作用することが示唆された。

唾液 bD3 産生誘導が IL-22 に依存することを検討するために、IL22 中和 (anti-IL22) 抗体を用いて検討したところ anti-IL22 抗体投与群では唾液 bD3 が顕著に抑制されたことが示された。以上のことから LAB 投与により活性化された小腸で産生された IL-22 を介して遠隔臓器である歯肉に IL-22-IL-22R 経路による産生誘導機序が存在することが示された。

歯肉上皮細胞における IL-22 刺激による STAT3 の活性化応答についてはマウス歯肉上皮 (GE1) 細胞を用いた *in vitro* 試験系を用いて検討した。STAT3 は受容体に結合した JAK によりサイトカインなど各種刺激因子に応答してリン酸化され、細胞核に移行して転写アクチベーターとして作用することが知られている。そこで、本研究の目的である歯肉上皮細胞で STAT3 のリン酸化が IL-22 に依存することを検討した。GE1 細胞における bD3 産生は IL-22 刺激で誘導され、anti-IL22 中和抗体により顕著に抑制されることがスライド培養法により確認できた。STAT3 のリン酸化の評価のために GE1 細胞を蛍光標識抗体を用いてフローサイトメトリーにより検討したところ IL-22 刺激により STAT3/pSTAT3 比率が顕著に増加することが認められた。

プロバイオティクス乳酸菌の胃内投与における免疫機能の賦活化が全身に波及させることが知られてきた。しかしながら、腸管内局所など限定された領域における効果や活性化機序の報告が多くあった。今回の結果から、腸管を起点とした全身への波及効果の一つとして口腔領域への

機序解明が進められた。

IL-22による遠隔臓器連関ネットワークの解明にはさらに検討が必要である。今後、IL-22産生するエフェクター細胞を同定し、腸管内局所での活性化が誘導されているのか、全身循環経路を介して遊走することで標的組織や臓器に作用することを検討していく。

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 0件）

1. 著者名 Miyuki Toda, Ryoki Kobayashi, Tomoko Kurita-Ochiai, Tetsuro Kono, Arata Watanabe, Hidenobu Senpuku, Hiroyuki Okada	4. 巻 21(#)
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum induced Gut Dysbiosis and Inflammation nas Promote Colonic Inflammation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Ora-Medical Science.	6. 最初と最後の頁 60-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5466/ijoms.21.60	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 Miyuki Toda, Ryoki Kobayashi, Tomoko Kurita-Ochiai, Tetsuro Kono, Arata Watanabe, Hidenobu Senpuku, Hiroyuki Okada	4. 巻 21(3)
2. 論文標題 The mechanism of inflammation caused by oral infection with Fusobacterium nucleatum in Periodontal Tissue.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Science.	6. 最初と最後の頁 112-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5466/ijoms.21.112	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 Kazuhide Takada, Vyacheslav G. Melnikov, Ryoki Kobayashi, Shihoko Komine-Aizawa, Noriko M. Tsuji, Satoshi Hayakawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Female reproductive tract-organ axes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 111001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1110001	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 Suguru Saito, Alato Okuno, Toshio Maekawa, Ryoki Kobayashi, Osamu Yamashita, Noriyuki Tsujimura, Morihiko Inaba, Yasushi Kageyama, Noriko M. Tsuji.	4. 巻 13
2. 論文標題 Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D downregulation is a novel parameter for functional impairment of neutrophils in aged mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1001179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.1001179 OPEN	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 Yohei Nakayama, Shinichi Tabe, Arisa Yamaguchi, Yuto Tsuruya, Ryoki Kobayashi, Katsunori Oyama, Daisuke Kitano, Keisuke Kojima, Rijutaje Kagawa, Yasuo Okamura, Jun Ogiwara, Hidenobu senpuku, Yorimasa Ogata.	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of Nutritional Factors to Evaluate Periodontal Clinical Parameters in Patients with Systemic Disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15020365	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 Shinichi Tabe, Yohei Nakayama, Ryoki Kobayashi, Katsunori Oyama, Daisuke Kitano, Jun Ogiwara, Hidenobu senpuku, Yorimasa Ogata.	4. 巻 14
2. 論文標題 Patients with Chronic Periodontitis Undergoing Supportive Periodontal Therapy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 4993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14234993	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryoki Kobayashi, Miyuki Toda, Hiroyuki Okada, Hidenobu Senpuku.
2. 発表標題 Investigation of the mechanism of periodontitis-related colitis in a mouse model.
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 戸田みゆき, 小林良喜, 泉福英信, 岡田裕之.
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatum の誘導による新規歯周病モデルマウスの作製と評価.
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryoki Kobayashi, Hidenobu Senpuku
2. 発表標題 IL-22 receptor produced by probiotic lactic acid bacteria may promote $\alpha$ -Defensin 3 productions in the oral mucosa.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林良喜, 泉福英信
2. 発表標題 唾液中の $\alpha$ -defensin 3の誘導に対する乳酸菌の経口投与の効果
3. 学会等名 第65回日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林良喜, 瀧澤智美, 齋藤真規, 桑原紀子, 泉福英信
2. 発表標題 歯周病関連疾患の解明を目的とした歯周病モデルマウスの確立
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林良喜, 辻典子
2. 発表標題 IL-10が歯周病病態モデルマウスに及ぼす影響
3. 学会等名 第17回日本食品免疫学会
4. 発表年 2021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
---------	---------