

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16990

研究課題名（和文）in situモデルを用いたデンタルバイオフィームと歯肉上皮の共生機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the interaction between dental biofilm and gingival epithelium with the use of in situ dental biofilm model

研究代表者

外園 真規（Sotozono, Maki）

新潟大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00876675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：デンタルバイオフィームはう蝕および歯周病の主因である一方、歯肉上皮に対して免疫応答を惹起し、上皮バリア機構の恒常性維持に寄与するなど、宿主に対して有益な作用ももたらしている。本研究ではin situ デンタルバイオフィームモデルで形成した実験的デンタルバイオフィームと三次元的歯肉上皮モデルを共培養し、バイオフィーム側および宿主側の両面から解析を行った。その結果、歯肉上皮モデルと共培養することで、バイオフィーム中のFusobacterium属の割合が低下、Rothia属が増加し、細菌叢が変化すること新たに示された。宿主側では炎症性サイトカイン遺伝子の発現および上皮層の厚みの増加が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌叢のバランスの乱れ（dysbiosis）がう蝕や歯周病の進行を助長し、全身疾患の重篤化にも影響を与えると考えられている。本研究により、歯肉上皮がデンタルバイオフィーム細菌叢に影響を与えることが示唆されたことから、単にデンタルバイオフィームを除去することが疾患の予防方法ではなく、宿主側にアプローチすることで、新たな疾患予防の確立に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Dental biofilm is the main cause of dental caries and periodontitis. However, dental biofilm can contribute the homeostasis of gingival epithelium, promoting immune system of the host. In this study, the interaction between gingival epithelial model and experimental dental biofilm formed by in situ dental biofilm model was investigated from two aspects, host and dental biofilm. The result of this study showed that microbiome of dental biofilm can change and be affected by host epithelial cell and dental biofilm induce the increase of the thickness of epithelial model.

研究分野：歯科保存学

キーワード：デンタルバイオフィーム 細菌叢解析 歯肉上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 微生物と宿主の関連

う蝕や歯周病はヒト口腔内に生息する微生物が歯面に形成するデンタルバイオフィーム(以下、DB)により引き起こされるバイオフィーム感染症であるが、その他の生体内バイオフィーム感染症とは異なり、発熱や悪寒などの全身症状や白血球数の上昇といった自然免疫の反応は見られない。生体はDBに対して抗菌ペプチドやサイトカインを産生しながら共生している

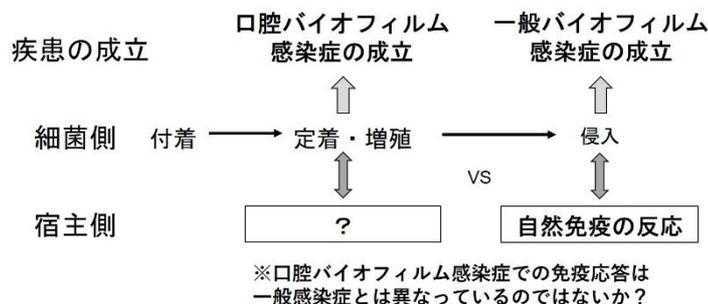


図1 バイオフィーム感染症の口腔と全身の違い

(Brestoff JR et al. Nat Immunol 14: 676-684, 2013)。また、上皮はDBに対して適度に免疫応答を行いながら上皮バリア機能の恒常性を保っている(Shang L et al. Sci Rep 8:16061, 2018)という点では、DBの存在は生体に利益をもたらしているといえる。しかし、口腔常在細菌叢のバランスの乱れ(dysbiosis)は、う蝕や歯周病の発症および進行を促進し、糖尿病などの代謝性疾患や動脈硬化性疾患などの様々な疾患のリスクを高めることが明らかになりつつある(Roberts FA et al. Periodontol 2000 69: 18-27, 2015)。感染症の成立や進行には細菌学的要因と生体の免疫学的要因が存在し、dysbiosisが単なる細菌学的要因の変化だけでなく、もう一方の要因である生体の免疫応答を変化させている可能性があるが、これらの関連性は十分に解明されていない。

(2) 細菌-宿主間の相互作用解析モデルの限界

バイオフィーム感染症であるう蝕や歯周病はDB細菌叢のdysbiosisにより発症し(Simón-Soro A. et al. Trends Microbiol. 23: 76-82, 2015, Hajishengallis G. et al. Mol Oral Microbiol. 27: 409-419, 2012)。特に歯周病においてはバイオフィームと生体(歯周組織)の均衡崩壊により進展するとされている(Robert FA et al. Periodontol 2000. 69: 18-27, 2015)。昨今、バイオフィームと三次元組織ヒト歯肉上皮モデルを用いて、細菌-生体間の相互作用を解析したin vitro研究が散見されるようになった。先行研究では、バイオフィームサンプルとして、数菌種を混合しin vitroで培養したものや(Brown JL et al. Sci Rep 9: 15779, 2019)、ヒト唾液をin vitroで培養したもの(Shang L et al. Sci Rep 8: 16061, 2018)が用いられている。しかし、同一の被験者から採取した唾液とデンタルバイオフィームの細菌叢は異なっており(Sotozono M et al. PLoS One. 9:16(12):e0259850. 2021)、唾液由来のin vitroバイオフィームでは実際のDBの実態を再現できないことが明らかとなった。また、上記の報告は宿主細胞側のみを解析しか行っておらず、細菌・バイオフィーム側の解析は行われていない。

(3) 本研究で使用したバイオフィーム形成方法

前述のように、in vitroで形成したバイオフィームではDBを再現できていないため、本研究では、申請者が所属する研究グループで過去に開発したin situ DBモデルを用いることとした。このモデルはマウスピースの類側に歯面を模倣したハイドロキシアパタイト(HA)ディスクが挿入された口腔装置である。この口腔内装置は、被験者の歯列に装着し口腔でHAディスク上に実験的DBを作製し、ディスクごとバイオフィーム試料を採取するというものである。ディスクごとバイオフィームを回収することで、ヒト口腔内のDBと類似した三次元的構造および細菌叢を持つバイオフィームの評価が可能となった。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、申請者らのグループが開発した口腔環境を可及的に再現するin situ DBモデル(図1, Wake N et al. NPJ Biofilm Microbiomes, 2: 16018, 2016)を用いて、健常者由来のDBを作製し、ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯肉上皮細胞を使用して作成した三次元的歯肉モデル(Reconstructed Human Gingiva: RHG)との共培養を行い、今まで行われてこなかったバイオフィーム側の解析も含め、宿主-バイオフィーム間の相互作用を検討することとした。



図2 in situ DBモデル

3. 研究の方法

本研究は、新潟大学倫理審査委員会の承認（承認番号：2021-0041）、新潟大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認（承認番号：SD01888）後に遂行した。

(1) 被験者の選択

新潟大学大学院医歯学総合研究科職員または学生で、以下の基準を満たす者を対象とした。全身疾患がない、う蝕がない、全顎的に5 mm以上の歯周ポケットがない、3か月以内に抗菌剤の使用がない、2週間以内に殺菌成分を含む洗口剤の使用がない、喫煙をしていない者とし、～のうち、一つでも該当する者は被験者から除外した。本研究の被験者は、男性5名、女性5名、25歳～32歳の10名とした。書面により、実験に関するインフォームドコンセントを行い、被験者から同意を得た。

(2) 実験的DB成およびRHGの培養

DBの形成には *in situ* DBモデルを用いた（図1）。被験者がこの口腔装置を上顎に装着し24時間後にディスク上に形成された実験的DBを採取した。

RHGは、Transwell®プレート（CORNING, USA. 12mm Insert, 12 well Plate 0.4µm Poresize）のインサート内で不死化ヒト歯肉線維芽細胞（hTERT Gingival Fibroblast; ATCC-3397, American Type Culture Collection, Manassas, U.S.A）をコラーゲンゲル内培養し、さらにゲル上に不死化ヒト歯肉上皮細胞（hTERT TIGKs; ATCC-4061, American Type Culture Collection）を積層し、気液界面培養を行って作成した。

(3) 実験的DBとRHGの共培養

培養したRHG上に、厚さ0.5mmのシリコンループを置き、その上から実験的DBを近接させ設置した。コントロール群として、細胞無添加のゲルと培養した実験的DBをDB単独培養群、滅菌したHA diskと培養したRHG単独培養群を使用した。37℃、5% CO₂条件下で共培養を行い9,14, 1時間, 12時間, 24時間後にRHGおよび実験的DBを回収した。実験的DBとRHGを回収した後、次項に示す評価を行った。

(4) 評価方法

DB側の解析として、リアルタイムPCRによる総菌数測定、共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）観察、16SrRNA配列解析を実施した。RHG側の解析として、リアルタイムPCR法による遺伝子発現解析、組織学的評価を実施した。

リアルタイムPCRによる総菌数測定

装置からHA diskを採取し、DNeasy® PowerSoil Pro Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を用いてDNAを抽出した。その後、16S rRNAのV1-V2可変領域を標的としたユニバーサルプライマーおよびPower SYBR® Green Master Mix（Applied Biosystem, Waltham, Massachusetts, U.S.A）を用い、StepOne™ Real-Time PCR Systems（Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A）にてリアルタイムPCRを行い、総菌数を測定した。

共焦点レーザー顕微鏡観察

採取したHA diskをPBSにて洗浄し、LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit（Invitrogen, Waltham, Massachusetts, U.S.A）にて染色した。また、菌体外多糖はCF®405標識Wheat Germ AgglutininおよびConcanavalin A（Biotium, San Francisco, U.S.A）にて蛍光標識した。共焦点レーザー顕微鏡にて観察後、画像解析ソフトImaris®（Oxford Instruments, Abingdon-on-Thames, UK）にて画像解析を行い、生菌、死菌、菌体外多糖それぞれの体積を算出した。

16SrRNAシーケンス解析

試料より細菌のゲノムDNAを抽出し、16S rRNAのV1-V2領域をMiSeq®（Illumina Inc., San Diego, California, U.S.A.）にて増幅し、97%相同性カットオフに基づく操作的分類単位（Operative Taxonomic Units, OTU）でクラスタリングを行った。

リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析

RHGを採取し、RNeasy® PowerBiofilm® Kit（QIAGEN）を用いてRNAを抽出後、High-Capacity 16 RNA-to-cDNA™ Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いてcDNAを合成した。IL-6、MCP-1、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 遺伝子を標的として、StepOne™ Real-Time PCR SystemsにてリアルタイムPCRを行い、遺伝子発現量を定量した。

組織学的評価

RHGを採取しパラフィン包埋後、組織切片を作製、Hematoxylin-Eosin染色を行い顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 結果

リアルタイム PCR による総菌数測定

共培養開始直前から、1 時間、12 時間、24 時間後に PCR による総菌数を測定したところ、単独培養群、共培養群は、ともに経時的な増加傾向を示したが、各時間において 2 群間に統計学的有意差はなかった (Friedman test, $p > 0.05$)。

共焦点レーザー顕微鏡観察
共焦点レーザー顕微鏡観察により得られた画像の例を図に示す (図 2)。RHG との共培養の有無に関わらず、実験的 DB の厚みは共培養開始から 24 時間後に増加する傾向が認められた。

画像から体積を算出した結果、24 時間の実験期間で、生菌、死菌、菌体外多糖は、単独培養群、共培養群ともに経時的な増加傾向を示した。生菌、死菌、菌体外多糖は、各時間において共培養群と単独培養群の間に統計学的有意差はなかった (図 3, Friedman test, $p > 0.05$)。

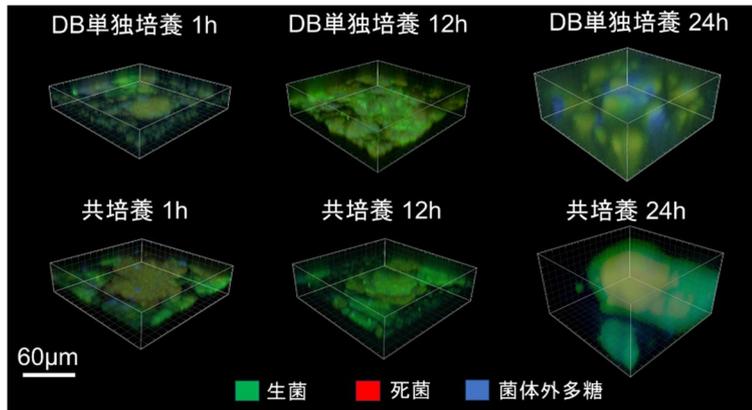


図 2 共焦点レーザー顕微鏡像

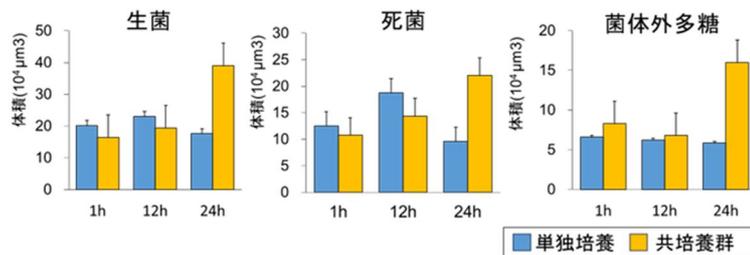


図 3 生菌、死菌および菌体外多糖の体積

16SrRNA シーケンス解析

多様性に関して、Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) 解析を行った結果、10 名の被験者から得られたサンプルは、被験者間で比較した場合に、有意に異なることが示された (図 4A、PERMANOVA, $p < 0.05$)。一方、共培養の有無 (図 4B、PERMANOVA, $p = 0.95$) および RHG との共培養の期間 (図 4C、PERMANOVA, $P = 0.336$) で比較した場合には、統計学的有意差はなかった。

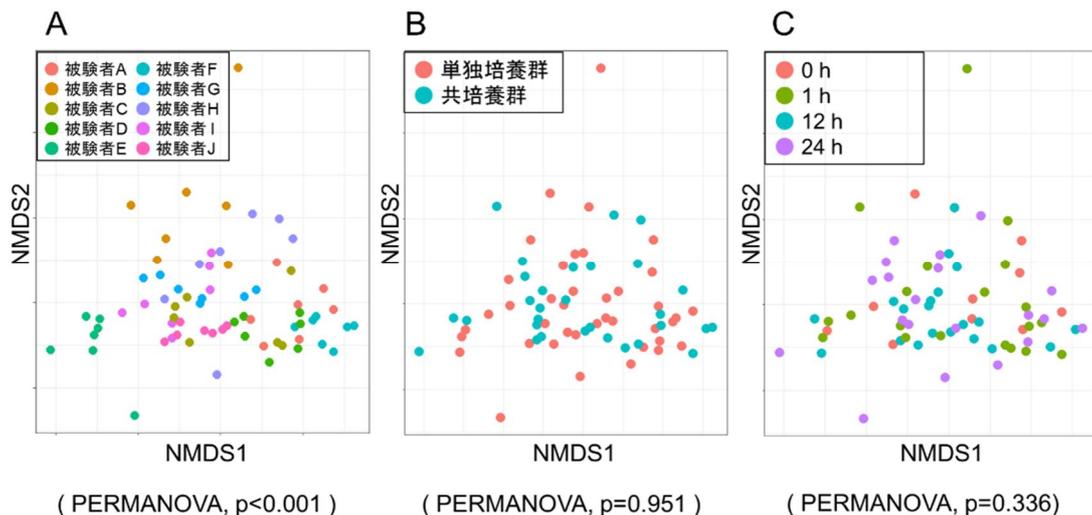


図 4 NMDS 解析 A: 被験者, B: 共培養の有無, C: 共培養の期間

また、門レベルでの相対的割合は、24 時間の実験期間で単独培養群と共培養群の間および各タイムポイント間で統計的な有意差は認めなかった。属レベルでの相対的割合を図 5 に示す。属レベルでは、全体としては大きな割合の変化は認めなかったが、共培養開始後 12 時後に、DB 単独培養群に比べ共培養群の *Rothia* 属の相対的割合が有意に増加した。一方で、12 時後に DB 単独培養群に比べ共培養群において、*Fusobacterium* 属の相対的割合が有意に減少した (sign test, $p < 0.05$)。

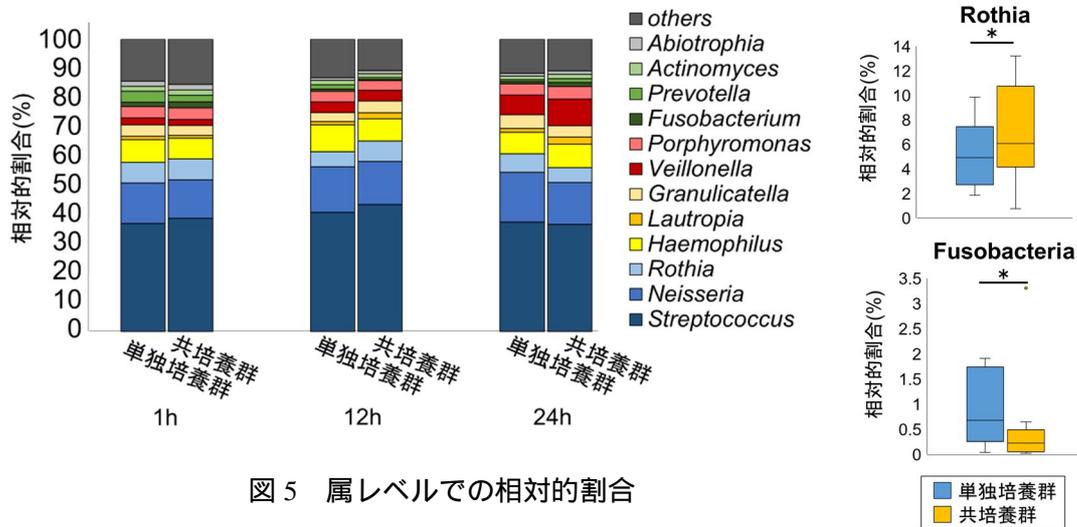


図5 属レベルでの相対的割合

リアルタイム PCR による遺伝子発現解析
 宿主側の評価として、RHG の炎症性サイトカイン遺伝子の発現をリアルタイム PCR により定量した。
 IL-6 遺伝子の発現は、DB サンプルとの共培養開始後 1 時間から 24 時間の実験期間において、共培養群で経時的に増加した。共培養群と単独培養群の間で有意差はなかった。また、TNF- α 遺伝子の発現は共培養開始後、1 時間後に単独培養群に比べ共培養群において有意に増加した (paired t-test, $p < 0.05$)。

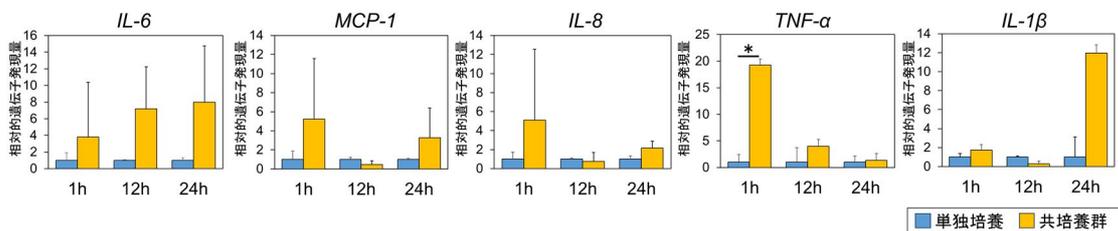


図6 遺伝子発現

組織学的評価

各時間において、単独培養群に比べ共培養群で上皮細胞層の肥厚が観察された。24 時間の実験期間で、経時的な厚みの増加は観察されなかった。

(2) 考察および結論

実験的 DB を構成する総菌数、菌体体積および菌体外多糖の体積は、RHG との共培養群および DB 単独培養群の両群で経時的に増加し、2 群間で有意な差を認めなかったことから、RHG は DB を構成する細菌数や三次元的構造

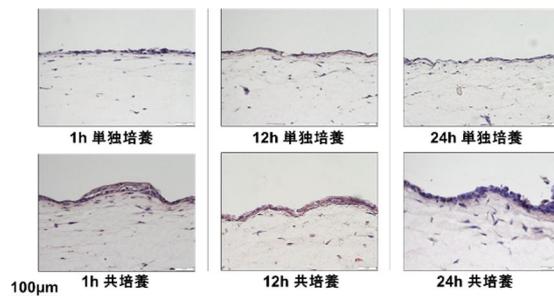


図7 組織学的評価

には影響を及ぼさないことが示された。一方、DB 細菌叢に関しては、共培養開始から 12 時間後、DB 単独培養群と比較して共培養群で Rothia 属の相対的割合の増加および Fusobacterium 属の低下が認められ、わずかではあるが細菌叢が変化する可能性が示唆された。NMDS による解析では、共培養群と単独培養群の間で細菌叢の構成に有意差はなかったが、これは同一被験者の試料ごとに細菌叢構造の類似度が高いことが影響していると考えられる。採取時間や共培養の有・無による DB 細菌叢の構造の変化が NMDS 解析では検出されなかった可能性がある。ヒト口腔バイオフィルム細菌叢は、被験者内で変動するが、被験者内の変化よりも被験者間での差が大きく、解析方法によっては検出されないとの過去の報告からも、本研究における NMDS 解析の結果は Rothia 属および Fusobacterium 属の相対的割合の有意な変化と矛盾するものではなく、RHG が DB に与えた影響であることを否定するものではないと考えられる。

RHG 側に関しては、サイトカインやケモカインの遺伝子発現の増加や上皮の厚さの増加が認められたことは過去の報告と一致しており、このことから DB が宿主上皮バリアの形成に寄与することが示された。

本研究の結果により、DB と RHG が相互に影響を与えることが示唆された。特に、RHG が DB に影響し細菌叢の組成に変化を与える可能性が新規に示唆されたが、今後さらなる詳細な解析が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 高橋竜平, 外園真規, 井田貴子, 永田量子, Niraya Kornsonbut, 齋藤 瑠郁, 竹中彰治, 野杵由一郎
2. 発表標題 in situデンタルバイオフィルムモデルを用いた宿主-バイオフィルム間相互作用の解明.
3. 学会等名 第37回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------