

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21057

研究課題名（和文）3次元腸管オルガノイドを用いた歯周病原細菌 - 腸管上皮相互作用の解明

研究課題名（英文）Investigation of periodontal pathogens- intestinal epithelial interactions using 3D intestinal organoids

研究代表者

峯尾 修平（Mineo, Shuhei）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：20962814

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯周医学において、嚥下された歯周病原細菌が腸管を介して全身に悪影響を与えることが報告されている。申請者らの研究室においては、歯周病原細菌が腸管上皮バリアの障害および腸管局所への炎症惹起に関与することを明らかにしたが、詳細なメカニズムは不明である。本研究では腸管オルガノイドを用いた細菌感染モデルを確立し、歯周病原細菌による腸管上皮細胞への直接的な影響を検討する。まず、マウス腸管から幹細胞を分離し、オルガノイドの培養技術を確立した。その後、インジェクターによる細菌感染を試みたが、技術的困難さから、別技術を検討した。その結果、細胞極性を変化させる技術を確立し、細菌感染モデルとしての有用性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内環境を模倣可能な3次元腸管オルガノイドを用いて歯周病原細菌 - 腸管上皮相互作用を明らかにすることで、口腔 - 腸管連関におけるペリオドンタルメディスン病因論の理解を深めるという学術的意義を有する。また社会的意義として、本研究結果から動物モデルに替わる新たな解析技術として一般化することで、動物実験の代替・削減につながり、動物愛護の観点からの社会的貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In periodontal research, swallowed periodontopathogenic bacteria has been reported to have adverse systemic effects via the gut dysbiosis. Our laboratory has previously demonstrated that swallowed periodontopathogenic bacteria is involved in disrupting the intestinal epithelial barrier and inducing inflammation locally, but the detailed mechanisms remain unclear. In this study, we aimed to establish a bacterial infection model using intestinal organoids to examine the direct effects of oral- intestinal epithelial interactions. First, stem cells were isolated from mouse intestinal tracts, and organoid culture techniques were established. Subsequently, we attempted bacterial infection using an injector, but due to technical difficulties, we considered an alternative technique. As a result, we established a technique to change cell polarity and confirmed its usefulness as a model for bacterial infection.

研究分野：口腔科学

キーワード：ペリオドンタルメディスン 歯周病原細菌 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでの歯周医学研究において、嚥下された歯周病原細菌が腸管を介して全身性に悪影響を与えることが報告されている。申請者らの研究室において、嚥下された歯周病原細菌が腸管上皮バリアを障害すること、腸管局所の炎症惹起に直接的に関与することを示唆した(Tsuzuno T et al., J Periodontal Res. 2021)。しかしながらその詳細なメカニズムは不明である。

腸管上皮はヘテロな細胞集団(吸収上皮細胞, 杯細胞, 内分泌細胞, パネート細胞)から構成される絨毛部と, 腸管上皮幹細胞などの未分化細胞が存在する陰窩部から構成される。腸管上皮構造の複雑さから in vitro における初代培養・維持はこれまで困難であったが, オルガノイド培養技術の開発によりヘテロな細胞集団をそのまま体外で3次元培養することが現在可能となり, 疾患の病態理解や創薬研究で汎用されている(Date S et al., Annu Rev Cell Dev Biol. 2015)。

しかし本培養法の問題点として, 本来細菌が存在する腸管の管腔側がオルガノイドの内腔面に相当し, 液体培地中に細菌を播種するだけでは細菌は内腔面に到達できず, 生理的な条件下での刺激および解析が困難な点が挙げられる。

2. 研究の目的

これらの背景から本研究課題の目的は, 腸管オルガノイドにおける細菌感染モデルを樹立し, 歯周病原細菌の腸管上皮細胞における炎症応答やバリア機能への影響を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 3次元腸管上皮オルガノイド培養の確立

マウス腸管上皮細胞を分離後, 各種増殖因子 (EGF, Noggin, R-spondin1) とともにマトリゲル(Corning社)中で3次元培養を行い, 腸管上皮オルガノイドの培養法を確立するオルガノイドが十分なサイズとなるように培養条件(各種増殖因子濃度や培養時間の至適化)を検討する。

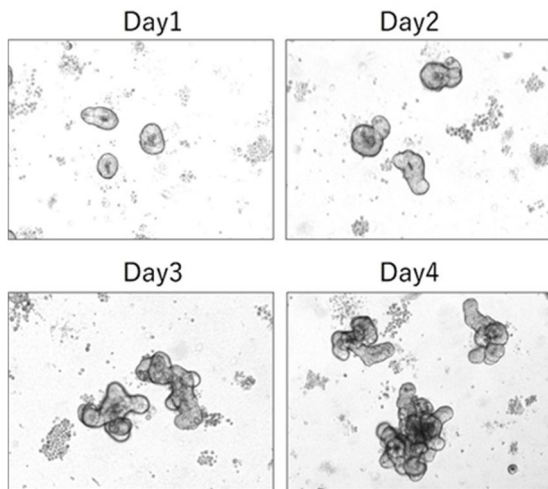
(2) 腸管オルガノイドにおける歯周病原細菌共培養系の確立

実体顕微鏡下においてマイクロシリンジおよびマイクロインジェクターを用いて, オルガノイド内腔に細菌懸濁液を注入する。蛍光プローブを用いて標識した細菌懸濁液を用いて正確に内腔に注入できていることを蛍光顕微鏡下にて確認する。

4. 研究成果

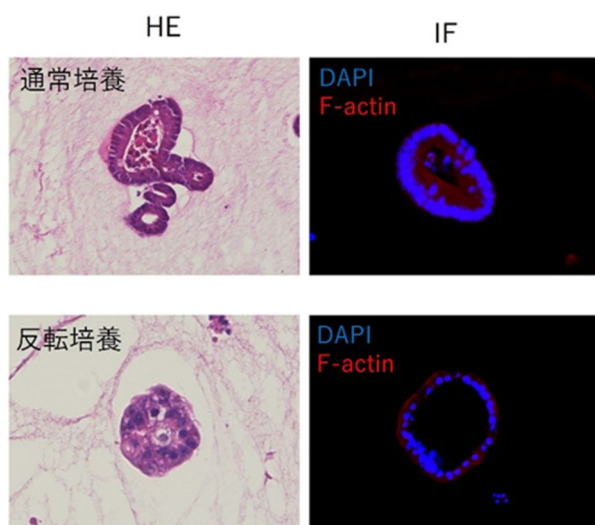
(1) 3次元腸管上皮オルガノイド培養の確立

過去のプロトコール等を参考に, マウス腸管から幹細胞を分離後, 至適培地にてマトリゲル中で3次元培養を実施した。その結果, 経時的な細胞塊の増大と, 突起の伸長が観察され, 腸管上皮オルガノイドの培養技術が確立された(下図)。



(2) 腸管オルガノイドにおける歯周病原細菌共培養系の確立

実体顕微鏡下においてマイクロシリンジおよびマイクロインジェクターを用いて、オルガノイド内腔に細菌懸濁液の注入を試みたが、手技的に極めて困難であり、スルーピットの低さから別の方法を検討した。近年の報告 (JY Co et al., Nat Protoc. 2021) を参考に、オルガノイド上皮細胞の極性反転培養を行い、極性が変化していることを確認した (下図)。今後、このモデルを用いた更なる解析が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------