

2016～2020 年度のユニットにおける研究実績（概要）

＜若手研究者育成＞

毎年、バランスユニット若手ワークショップを開催した。本ワークショップは若手研究者が中心となって研究成果の発表ならびに討論を行い、それぞれが行なっている研究をさらに洗練し発展させていくだけでなく、バランスユニット内（咬合機能矯正学分野、細菌感染制御学分野、歯周病学分野、歯髓生物学分野、生涯口腔保健衛生学分野、小児歯科学・障害者歯科学分野、分子免疫学分野）においてその知識やアイデアを共有し、共同研究を促進するために親睦を深めていく目的として実施された。若手研究者が合議のもとで発表者を選定し、座長を務め、評価項目を選定するなど若手研究者が主体的に企画・運営を進めた。さらに、質疑応答に関しては、若手研究者による積極的な討論を目的として、分野長には質疑応答時間内での質問を遠慮していただくことに加え、発表者の評価項目に、他発表者の発表における質疑応答内容も加えることとした。そのため活発な議論が展開され、活気のあるワークショップとなった。

＜研究活動＞

バランスユニットにおける主な3つのプロジェクトは共同研究体制を組んで実施してきた。共同研究による競争的資金として、プロジェクト1に関して、歯周病学分野と細菌感染制御学分野による共同研究提案が2020年度文科科研費基盤B（一般）に採択された。プロジェクト2に関する共同研究提案（分子免疫学分野、歯周病学分野、東京大学農学部平山和宏氏）は、2019-2021年度科学研究費挑戦的研究（萌芽）「新規ヒトフローラマウスでの口腔と全身のクロストーク解析」に採択されている。

1. 歯周炎患者における口腔細菌叢の構成異常に関する検討（歯周病学分野・歯髓生物学分野・分子免疫学分野・細菌感染制御分野・学内及び学外施設との共同研究）

1-1. 歯およびインプラント周囲における細菌叢の構成異常の特性と疾患との関連

歯およびインプラント周囲における炎症性組織破壊は、細菌叢の構成異常（dysbiosis）により引き起こされると考えられている。口腔細菌叢と歯周病の病態との関連について、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析を行うことを計画し、上記バランスユニットの分野のほか、早稲田大学の服部正平教授、日本大学歯学部の渡辺孝康助教らと共同で研究を進めた。

メタ 16S 解析の結果、健常歯と歯周炎部位では認められる細菌叢組成が明らかに異なり、歯周炎部位では *P. gingivalis* に代表される既知の歯周病原菌だけでなく、これまで病原性が注目されていなかった複数種の菌が代謝系を共有するコア・マイクロバイオーームを形成していた。一方、細菌種からの機能予測解析では健常部においても歯周炎部と同様に病原遺伝子の存在が確認された。細菌 DNA を試料とした解析の場合、細菌叢中の死菌の影響により、病態との関連を正確に知ることができない可能性も考えられたため、さらに細菌の RNA を試料としたメタトランスクリプトーム解析を行った。本解析では歯周炎において既知の歯周病原細菌の割合増加が強調された一方で、必ずしもこれらの細菌の活動性が高いとは限らず、細菌間の共起ネットワークでは *Prevotella nigrescens* や *Actinomyces* 属がその中心をなしていた。また歯周炎と類似した病態を示すインプラント周囲炎を比較すると、主座標分析により両疾患の菌叢傾向が異なっていた。また発現している遺伝子の多くは類似していたが、特に病原性に関わる遺伝子組成を比較した場合には *plr/gapA* がインプラント周囲炎で特異的にその発現が上昇しており、これがインプラント周囲炎の病原性に関わると推測された。また細菌叢の *dysbiosis* は根尖性歯周炎の組織破壊にも関わることから、特に歯内-歯周病変に関わる根管内細菌叢と歯周ポケット内細菌叢とを調査した。その結果(1)同一病変においては 根管およびポケットにおける細菌叢は類似しているが、個体差が大きい、(2)門レベルにおいては *Firmicutes/Bacteroidetes* を主体とする細菌叢と、*Firmicutes/Actinobacteria* を主体とする細菌叢が観察され、病態が歯内由来か歯周由来かによりこの違いが生じている可能性が考えられた。

2. 口腔細菌叢による局所口腔免疫及び全身免疫への影響の検討（分子免疫学分野・細菌制御学分野・学内及び学外施設との共同研究）

2-1. 口腔細菌叢移入ヒトフローラマウスにおける免疫応答解析

ヒトフローラ保持マウス (HF マウス) 樹立者である東京大学平山和弘教授の協力を得て、HF マウスを本学実験動物センターに導入するための長期に渡るセンターとの折衝を経て、ビニールアイソレーター飼育区域利用マニュアルを作成して申請を行い、実験動物センターの承認を4年目にして得たが、COVID-19 により動物実験に制限がかかったため、計画が途中でストップした。HF マウスのプロジェクトは断念し、腸炎マウスモデルで、口腔細菌叢を移入する実験系に変更し進行させている。

2-2. 口腔および腸内細菌叢が疾患に及ぼす影響

口腔および腸内細菌叢の構成異常 (*dysbiosis*) は宿主免疫恒常性の破綻を引き起こし、外来の病原細菌に対する感染抵抗性が減弱すると同時に、炎症性腸疾患をはじめとする様々な自己免疫疾患の発症に関与する。口腔や腸内の常在菌である *Klebsiella pneumoniae*

(クレブシエラ) は、**dysbiosis** により腸疾患の発症に寄与する可能性が示唆されているが、そのメカニズムは解明されていない。そこで口腔および腸内細菌が疾患に及ぼす影響を解析するため、慶應義塾大学との共同研究により、胆管の炎症を伴う自己免疫性疾患である原発性硬化性胆管炎 (PSC) に注目して解析を進めた。PSC 患者由来および健常者由来クレブシエラをオルガノイド大腸上皮に感染させると、PSC 由来クレブシエラはアポトーシスの誘導を介し、大腸上皮に孔形成することが明らかとなった。一方、健常者クレブシエラに孔形成能は認められず、クレブシエラの孔形成能と疾患との関連が示唆された。さらに様々なクレブシエラ株を用い、孔形成能とゲノムの相関解析により、孔形成能を有するクレブシエラは病原因子分泌装置である 6 型分泌装置遺伝子群を保持することが明らかとなった。そこで、孔形成能を有するクレブシエラの 6 型分泌装置欠損株を作製し、野生株との腸管上皮細胞に対するアポトーシス誘導能を比較したところ、6 型分泌装置欠損株感染ではアポトーシス誘導能が低下していることが認められた。以上より、クレブシエラによる PSC 発症には、**dysbiosis** に加え、菌が 6 型分泌装置依存的にアポトーシス誘導を介して腸上皮に孔形成し、腸上皮バリア機能を破綻させることが重要であることが示唆された。

3. 口腔環境制御のための基盤技術の確立 (咬合機能矯正学分野・小児歯科学分野・生涯口腔保健学分野・分子免疫学分野・皮膚科学分野・学外施設との共同研究)

3-1. 口腔粘膜における免疫寛容機構解明と制御法開発

舌下粘膜 CD206 陽性マクロファージは、抗原提示に関与する MHC クラス II や共刺激分子 CD80/86 の発現が低いことから、T 細胞に対する抗原提示能は低いと推察された。そのため、この CD206 陽性マクロファージが免疫寛容にかかわる可能性について、樹状細胞 (DC) に働きかけて、間接的に T 細胞応答を制御する可能性を考えた。そこで、抗原刺激を加えた樹状細胞と CD206 陽性マクロファージを共培養したところ、対照群 (CD206 陰性マクロファージ) と比較して、DC から産生される IL-12 量が少なく、DC 上の MHC クラス II 及び CD86 の発現強度が低かった。すなわち、樹状細胞による T 細胞の活性化を間接的に抑制することで、免疫寛容を誘導することが示唆された。

PD-L1 は、炎症に伴って免疫細胞の他に非免疫細胞や癌細胞に発現し、活性化 T、B 細胞上の受容体 PD-1 を介して、これら細胞の機能を抑制する。分子免疫学分野ではこれまでに、上皮細胞特異的 PD-L1 発現マウス (K14/PD-L1 tg) を作製し、ハプテン誘導性接触過敏症モデルにおいて、ケラチノサイト発現する PD-L1 が、皮膚に浸潤するエフェクター CD8⁺ T 細胞に直接作用して、皮膚炎を制御することを示した。歯周組織においても、歯周病原菌感染により PD-L1 発現が誘導されることや、PD-L1 発現が歯周炎の重症度と逆相関するとの報告があるが、実際に歯周炎が起こる過程で、PD-L1 が関わ

っているかどうか不明であった。そこで、歯周炎発症における歯肉上皮細胞上 PD-L1 の機能的役割について検討した。野生型(wt)マウス及び上皮細胞特異的 PD-L1 遺伝子導入

(K14/PD-L1 tg)マウスに 9-0 縫合糸を施した ligature モデルを作製し、急性期 (1 週間後) 及び慢性期 (7 週間後) に解析した。その結果、tg マウスでは wt マウスに比べ、急性期において、歯肉に浸潤する炎症細胞数や、歯肉における炎症性サイトカイン産生量が少なく、慢性期における歯槽骨吸収が軽度であったことから、歯肉上皮細胞上の PD-L1 が歯周炎を抑制することが明らかとなった。

3-2. 歯牙再植モデルでの NF- κ B デコイ・PLGA ナノ粒子核酸医薬の効果

幼若永久歯の再植時における炎症は、様々な術後合併症を引き起こす。術後の炎症抑制を目的に NF- κ B デコイ (アンジェス株式会社より提供) の効果を検討するため、ラットの上顎右側切歯の再植モデルを用いて、核酸医薬導入に効率的な PLGA ナノ粒子を DDS 分子として用い、NF- κ B デコイ含有 PLGA ナノ粒子 (ホソカワミクロン株式会社より提供) を再植前の歯根に塗布し検討したところ、再植後の歯根膜における初期炎症、歯槽骨吸収、および歯根吸収を顕著に抑制した。また、再植後の歯髄内の石灰化物の形成の抑制効果、ならびに歯根形成能の維持に寄与することが明らかになった。

3-3. オゾンウルトラファインバブル水 (OUFBW) の効果

オゾンウルトラファインバブル水 (OUFBW) は歯科の分野において歯周治療に応用し著効が得られたことが報告されているが、歯周炎等によって失われた歯周支持組織の再生を促進するといった報告はない。OUFBW が歯周支持組織の再生に寄与するような機能を持つか調べるために、初代細胞の歯根膜細胞 (hPDLFs) と歯肉上皮がん細胞 (Ca9-22) に対して OUFBW を作用させ、その効果を詳細に解析した。

その結果、OUFBW は細胞内での活性酸素種 (ROS) の産生を介して、酸化ストレスを誘導後、MAPK カスケードを活性化することを見出した。さらに、OUFBW は酸化ストレスに感受性のある c-Fos および NRF2 の活性化 (核内移行) も引き起こすことが判明した。また、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った結果、OUFBW の作用によって、酸化ストレス制御遺伝子、および MAPK カスケードの多数の遺伝子の発現が亢進していた。以上の結果から、OUFBW の刺激により産生された ROS が酸化ストレスを誘導した後、MAPK カスケードが活性化され、c-Fos や Nrf2 の核内移行が亢進することが明らかになった。この研究成果は、OUFBW に含有されたオゾンに対する細胞応答の分子メカニズムに関して新しい知見である。

3-4. ウルトラファインバブル水 (UFBW) の応用可能性の検討

外傷歯の治癒を促す治療法の探索のため、酸素ウルトラファインバブル (UFB) 水が外傷歯に及ぼす影響を評価する実験系の策定を行った。In vivo における評価として、ラ

ットの脱落・再植歯に歯髄変性を生じさせるモデルを作製し、このモデルに酸素 UFB 水を作用させることで生じる現象の観察を予定した。特に、脱臼・脱落歯に生じる歯髄の循環障害（酸素の欠乏状態）による歯髄変性を HIF1 α の動態を軸に評価し、併せてマイクロ CT を用いた 3 次元的な形態計測、病理組織や免疫組織化学の手法を用いた評価、歯髄や歯周組織における遺伝子発現の解析を検討している。加えて、*In vitro* における評価として、口腔外傷による循環障害を低酸素環境と仮定し、低酸素培養における歯髄細胞の挙動と、この培養条件において、酸素 UFB 水で作製した培地を使用したときの細胞の生存や機能を評価する実験を策定中である。