

Porphyromonas gingivalis がヒト口腔粘膜上皮細胞に与える影響の 3次元構築モデルによる解析

笠 孝 成¹ 内 田 邦 敏² 岡 村 和 彦³
八 田 光 世² 山 崎 純^{2,4} 坂 上 竜 資¹

¹福岡歯科大学口腔治療学講座歯周病学分野

²福岡歯科大学細胞分子生物学講座分子機能制御学分野

³福岡歯科大学生体構造学講座病態構造学分野

⁴日本大学生物資源科学部獣医学科獣医薬理学

抄録

目的：口腔粘膜上皮細胞は、細菌および細菌から産生されるさまざまな毒素からの曝露に対して重要なバリアとして機能している。歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) は、上皮組織におけるバリア機能の破綻を生じさせることにより歯周病の進行に深く関与し易感染性の状態を生み出すと考えられているが、上皮組織にどのような影響を与え、どのようにしてバリア機能が壊されるかの詳細なメカニズムについてはわかっていない。そこで本研究では、*P. g.* がヒト口腔粘膜上皮細胞に与える影響について検討を行った。

材料と方法：ヒト口腔粘膜上皮細胞株とラット線維芽細胞からなる3次元構築モデルを作製し、*P. g.* ATCC33277 菌粉砕物を上皮層に滴下する群としない群としてそれぞれ培養した。その後、上皮細胞の気相液相境界面培養 (Air-Lift) を行い、4~8日間培養後に3次元構築モデルサンプルを回収し、HE染色および免疫組織染色法を用いて形態観察を行った。また上皮のみを回収し、DNAマイクロアレイ解析およびqRT-PCR法を用いて遺伝子発現の解析を行った。さらにバリア機能を評価するために、Air-Lift 6日目のサンプルを用いてTERおよびFITC-dextranによる解析を行った。

結果：*P. g.* 菌粉砕物を滴下すると、Air-Lift 6日目に有意な上皮層の厚みの増加を認めた。マイクロアレイパルスウェイ解析の結果、細胞周期および細胞間接着に関連する遺伝子発現の変化を認めた。細胞周期において *CDKN1A* mRNA 発現量の有意な低下を認め、免疫組織染色においてKi67陽性細胞数の割合が有意に増加した。細胞間接着において、E-cadherin染色強度および染色面積の有意な低下を認めた。組織の電気的抵抗値は有意に低下し、dextranによる組織の物質透過性試験の結果は有意に増加した。

結論：3次元構築モデルにおいて、ヒト口腔粘膜上皮細胞は、*P. g.* への曝露により細胞増殖が亢進するとともに細胞間隙が拡大し、細胞間接着タンパク質が減少する。これによって、上皮バリア機能が低下し、歯周病変の重症化に関与すると考えられる。

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*, 3次元構築モデル, ヒト口腔粘膜上皮細胞

責任著者連絡先：坂上竜資

〒814-0193 福岡市早良区田村2-15-1 福岡歯科大学口腔治療学講座歯周病学分野

TEL: 092-801-0411 (内線633), FAX: 092-871-9494, E-mail: sakagami@college.fdcnet.ac.jp

受付: 2019年12月18日/受理: 2020年1月9日

DOI: 10.11471/shikahozon.63.144

緒言

歯周炎は細菌の感染によって誘発される炎症性疾患であり、日本人が歯の喪失を招く最大の原因となっている。さらに、炎症に起因するサイトカイン、炎症性物質、細菌ならびに細菌産物が、糖尿病や心臓血管疾患、早産や低体重児出産、アルツハイマー病、呼吸器疾患、関節リウマチなどのさまざまな疾患に関与する可能性が報告されている^{1,2)}。

歯周炎の進行においては、歯と歯周組織に付着したバイオフィルムが主原因となっており、歯周ポケットの形成と歯槽骨の吸収を引き起こす。*Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) は歯周病原菌の一つであり、LPSと組織分解酵素であるgingipainを有し、歯周ポケットの上皮にも侵入することが認められている。歯周炎における組織破壊は、細菌やLPSなどの外来刺激に対する生体側の過剰な炎症反応という側面もあり、細胞が放出する酵素によって自己組織の破壊が進行し、破骨細胞の活性化を通して歯槽骨吸収が進行する。

歯肉溝上皮は常に細菌感染にさらされており、生体におけるバリア機能の最前線に位置している。上皮組織は一般に、基底層・有棘層・顆粒層・角化層からなる分化した4層から構成されるが、歯肉溝上皮は角化の程度が弱い錯角化の状態にある。歯周炎の進行に伴って歯周ポケットが形成されると、上皮の一部は脱落して潰瘍面を形成し、上皮細胞の間隙が拡がって白血球などが遊走しやすい環境が生まれる。細胞間隙の拡大は細菌にとっての侵入経路にもなると考えられるが詳細はまだわかっていない。

歯周炎進行のメカニズム解明においては、細菌刺激に対する生体側の防御反応についても調べる必要がある。白血球やリンパ球などの免疫細胞による防御のほかに、接合上皮と歯肉溝上皮細胞のターンオーバーが早く防御に寄与することが報告されている³⁾。しかし、上皮細胞における細胞間隙の拡大やターンオーバー亢進を*in vitro*において再現性をもって観察するためには、基底層から角化層にいたる上皮の多層構造をつくる必要があった。われわれは、ヒト口腔粘膜上皮細胞を線維芽細胞の上で3次元培養することによりこの課題の解決を図った。

本研究では、3次元構築したヒト口腔粘膜上皮に対する*P. g.*の影響を明らかにすることを目的とし、遺伝子の発現解析、病理組織学的解析、免疫染色によるタンパク発現解析、バリア機能の評価を行うこととした。

材料および方法

1. ヒト口腔粘膜上皮細胞

ヒト口腔粘膜上皮細胞株 OKF6/TERT-2 は Rheinwald 博士の許可を得て、大阪大学の西田・笹本両博士から供与を受けた。細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で、25 μg/ml bovine pituitary extract (BPE, Thermo Fisher Scientific, USA)、0.2 ng/ml human epidermal growth factor (hEGF, Thermo Fisher Scientific) と 0.4 mmol/l CaCl₂ を添加した keratinocyte-SFM (Thermo Fisher Scientific) にて継代培養した。

2. *Porphyromonas gingivalis* 粉砕物

P. g. ATCC33277 を 100°C で 15 分間熱処理し、T10 Basic ULTRA-TURRAX ホモジナイザー (IKA Japan) にて粉砕した。菌体粉砕物は PBS (-) に懸濁して使用した。

3. ヒト口腔粘膜上皮モデルの作製

Wistar ラット (7 日齢) をイソフルラン (FUJIFILM Wako Pure Chemical) にて麻酔し、口蓋粘膜を摘出した。デイスパーゼ (FUJIFILM Wako Pure Chemical) 処理により粘膜固有層を単離し、10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) にて培養した。組織片から遊離した線維芽細胞を新しい培地で 2~3 日間培養した後、3 回継代培養を行った。セルカルチャーインサート (10.5 mm-diameter Falcon cell culture insert, Corning, USA) を用いて線維芽細胞 (2.4 × 10⁶ 細胞) を I 型コラーゲン (Nitta Gelatin) ゲル 5 ml に包埋し、1% FBS (Thermo Fisher Scientific) および hEGF を添加した DMEM 培地にて培養した。翌日、OKF6/TERT-2 細胞をコラーゲンゲル上に播種し、1% FBS、0.05% hEGF、0.2% BPE、0.1% ヒドロコルチゾン、0.2% インスリン、0.2% トランスフェリン、0.1% アスコルビン酸、0.1% ホスファチジルエタノールアミン、および 1.8 mmol/l CaCl₂ を添加した DMEM および Epi-Life 培地混合物 (1:1) にて培養を行った。ゲル上の細胞がコンフルエントになった後、気相液相境界面培養 (Air-Lift) にて分化誘導した。Air-lift 直後、実験群は上皮に *P. g.* 粉砕物の懸濁液 (10 μg/ml または 30 μg/ml) 30 μl を滴下し、対照群は PBS (-) を用いた。その後、4、6 日または 8 日間培養し、解析を行った。本実験における実験動物の使用は、福岡歯科大学動物研究委員会の承認の下 (承認番号 17034) で行った。

4. 組織学的および免疫組織化学的解析

ヒト口腔粘膜上皮モデルを 10% ホルマリン溶液で固定後にパラフィン包埋し、ミクロトームにて 3 μm の連続切片を作製した。サイトケラチン 13 (CK13) および

Table 1 Primer sequence

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	RT-PCR size
human GAPDH (RT, qRT)	ATGATTCCACCCATGGCAAATTC	TGATGATCTTGAGGCTGTTGTCA	297 bp
human CDKN2D (qRT)	CATCTGGCAGTTCAAGAGGGT	AGCCACAAACTGTGCTCCTC	295 bp
human CDKN1A (qRT)	AAAGGCCCGCTCTACATCTT	ATGCCCAGCACTCTTAGGAA	185 bp
human CDK1 (qRT)	CATGGATTCTTCACTTGTAAAGGT	TCCACTTCTGGCCACACTTC	228 bp
human CCNB1 (qRT)	CCAAATCAGACAGATGGAAAT	GCCAAAGTATGTTGCTCGA	129 bp
human CDKN2A (qRT)	GCCCAACGCACCGAATAGT	CGATGGCCCAGCTCCTCAG	261 bp
human CCNA1 (qRT)	ACCCAAGAGTGGAGTTGTG	GGAAGGCATTTTCTGATCCA	197 bp
human CCNA2 (qRT)	CGCTGGCGGTACTGAAGTC	GAGGAACGGTGACATGCTCAT	120 bp
human Occludin (qRT)	CCTATAAATCCACGCCGGTTC	CAAAGTTACCACCGCTGCTG	102 bp
human Claudin1 (qRT)	CTGGGAGGTGCCCTACTTTG	ACACGTAGTCTTTCCCCTG	106 bp
human CDH1 (qRT)	GCCTCTGAAAAGAGAGTGGAAAG	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG	131 bp

サイトケラチン 14 (CK14) の免疫蛍光染色は、切片をウサギモノクローナル抗 CK13 抗体 (1:250, Abcam PLC, UK) とマウスモノクローナル抗 CK14 抗体 (1:100, Leica Biosystems Nussloch, Germany) を 4°C で一晩反応させた。続いて Alexa 488 (1:800, Thermo Fisher Scientific) と結合したヤギ抗ウサギ IgG 抗体とヤギ抗マウス IgG 抗体-Alexa 594 コンジュゲート (1:800, Thermo Fisher Scientific) を室温で 1 時間反応させ、同時に DAPI (1:800, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) にて核を染色した。Fluoromount (コスモバイオ) にて切片を封入し、蛍光観察した。Ki67 および E-cadherin の免疫組織染色は、切片をマウスモノクローナル抗 Ki67 抗体 (1:200, Leica Biosystems Nussloch, Germany) またはマウスモノクローナル抗 E-cadherin 抗体 (1:100, Becton Dickinson and Company, USA) にて 4°C で一晩、さらに EnVision+ System-HRP labelled polymer anti-mouse (DAKO, Denmark) を室温で 35 分間反応させた後、DAB 法にて発色させた。蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence, BS-2040FT; BioTools), 共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss Micro Imaging, Germany) にて観察し、画像データを取得した。染色像の定量解析は、ImageJ ソフトウェア (NIH) を使用して行った。E-cadherin 抗体を用いた DAB 染色は、ImageJ ソフトウェアを使用し、色相によるフィルタリング後、全サンプルの明度の上限を 255, 下限を 0, 閾値を 120 と設定し陽性部位の蛍光強度および蛍光面積の解析を行った。

5. 網羅的遺伝子発現解析 (DNA マイクロアレイ)

Air-lift 4 日後にヒト口腔粘膜上皮モデルの上皮から、NucleoSpin RNA キット (MACHEREY-NAGEL, Germany) を使用して total RNA を精製した。ゲノムワイドな発現プロファイリングは Agilent Low-Input Quick-Amp Labeling Kit と SurePrint G3 Human Gene Expres-

sion Microarray 8x60K v3 を用いて行った。cRNA を増幅、標識した後、マニュアルに従って 60K Agilent 60-mer オリゴマイクロアレイにハイブリダイズさせ、Agilent スキャナーで検出した。相対ハイブリダイゼーション強度とバックグラウンドハイブリダイゼーション値は、Agilent Feature Extraction Software (9.5.1.1) を使用して計算した。各プローブの raw シグナル強度とフラグは、アジレントが推奨する手順に従って、ハイブリダイゼーション強度 (gProcessedSignal) とスポット情報 (gIsSaturated など) から計算した。Bioconductor ソフトウェア [B] の「preprocessCore」ライブラリパッケージ [P] を使用した分位アルゴリズムにより、すべてのサンプルの raw シグナル強度を標準化した。発現が上昇または減少した遺伝子を特定するために、対照群 (*P. g.* なし) と実験群 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *P. g.* あり) の各プローブの標準化されたシグナル強度から Z スコア [Z] および比率 (non-log scaled fold-change) を計算した。発現変動遺伝子は、上昇した遺伝子: Z スコア ≥ 2.0 および比率 ≥ 1.5 倍、また減少した遺伝子: Z スコア ≤ -2.0 および比率 ≤ 0.66 という基準を用いて定義した。

6. 定量的 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) を用いて total RNA から cDNA を合成した。定量的 PCR 反応は特異的プライマー (Table1) および TB Green (Takara Bio) を使用し、thermal cycle CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, USA) にて増幅、検出した。遺伝子発現レベルは相対検量線法にて計算し、GAPDH を内部標準とした。

7. 経上皮電気抵抗値の測定

経上皮抵抗 (TER) は、epithelial volt-ohm meter (TEER Measuring System; Kanto Chemical) を使用した。機器の仕様は、出力 5 μA , 1 kHz ± 0.2 Hz で、サン

プリング周期は60 Hzである。対照群および実験群ともにAir-Lift 6日後に、上皮と外側培地の間の電気抵抗値を測定した。

8. 細胞間隙透過性の測定

対照群および実験群 (Air-lift 6日後) の上皮表面に1 mg/ml FITC-dextran (4 kDa) 5 μ lを滴下し、10, 20, 30分後に外側の培地を回収した。蛍光強度は、Microplate reader (励起485 nm および蛍光535 nm; 1420 ARVO MX: PerkinElmer, USA) で測定した。FITC-dextran濃度は、連続希釈法より得られた検量線から計算した。

9. 統計学的解析

データは平均±標準誤差で示した。2群間の検定はunpaired *t*-testを行った。多重検定はOriginPro 9 (OriginLab, USA) を使用し、一元配置分散分析に続いてpost-hoc Bonferroni検定を行った。p<0.05を統計的に有意であると定義した。

結 果

1. *Porphyromonas gingivalis* に感染した3次元ヒト口腔粘膜上皮モデルの構築

口腔粘膜上皮に対する*P. g.*感染の影響を調べるため、ヒト口腔粘膜上皮細胞株であるOKF6/TERT-2細胞と線維芽細胞との共培養による3次元(3-D)構築モデルを作製した。ヒト線維芽細胞株ではヒト口腔粘膜上皮細胞の重層化が観察されなかったため、ラット口蓋粘膜から単離・培養した線維芽細胞を使用した。Fig. 1Aの左に示すように、対照群の3-D構築モデルではAir-Lift 4~8日目に上皮細胞の重層化が認められた。さらに免疫蛍光染色法により、モデルの基底層と基底上層にそれぞれ未分化上皮マーカーCK14と非角化重層扁平上皮の分化マーカーCK13が発現することを確認できた(Fig. 1Aの左下)。実験群(10または30 μ g/ml *P. g.*)のモデルでは対照群と比べて上皮層が厚く、細胞間に間隙(矢印)が認められた(Fig. 1Aの中央および右側)。また、CK14が基底層と基底上層に発現しており、CK13の発現が低下していた(Fig. 1Aの右下)。Fig. 1Bに示すようにAir-Lift 4日目のモデルでは実験群と対照群の上皮層の厚さに有意な差は認められなかったが、Air-Lift 6日目の30 μ g/ml *P. g.*において対照群と比べて有意な肥厚が確認された。また、Air-Lift 8日目30 μ g/ml *P. g.*の上皮層の厚さは6日目よりも上皮層が剥離したことにより薄くなっていた。

2. ヒト口腔粘膜上皮の細胞周期に対する*Porphyromonas gingivalis*の影響

*P. g.*が上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を明らか

にするため、全49,177遺伝子の発現プロファイルをDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、対照群と比較して30 μ g/ml *P. g.*の上皮では831遺伝子が発現低下しており、398遺伝子の発現が増加していた。次に、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway databaseにより発現が変動した全遺伝子群について生命現象や分子ネットワークとの関連性を解析したところ、細胞周期に関連していた(Fig. 2AおよびTable 2)。特に、細胞周期の進行に中心的な役割を果たすCyclinA (CycA)、CyclinB (CycB) およびCyclin依存性キナーゼ1 (CDK1) 遺伝子の発現が*P. g.*により増加することが示唆された(Fig. 2B)。それらを確認するために、real-time RT-PCR法によりCDK1、CyclinA1 (CCNA1)、CyclinA2 (CCNA2)、CyclinB1 (CCNB1) のmRNA発現レベルを定量的に解析した(Table 2)。その結果、CyclinA1 (CCNA1)、CyclinA2 (CCNA2) のmRNA発現レベルは増加傾向を認めた(Fig. 3A)。またCyclinを負に調節する因子であるCDKN1A (p21) は有意に低下しており、CDKN2D (Ink4d) についても低下する傾向が示された(Fig. 3A)。そこで細胞周期進行のマーカーであるKi67について免疫染色により検出したところ、Fig. 3BおよびFig. 3Cに示すように、全上皮細胞に対するKi67陽性細胞数は実験群(30 μ g/ml *P. g.*)の基底層で有意に増加した。

3. ヒト口腔粘膜上皮のバリア形成に対する*Porphyromonas gingivalis*の影響

次に、バリア形成において重要な役割を担っている細胞間接着に関連する遺伝子の発現レベルを確認した。Tight junctionに關与するOccludin (OCLN) およびClaudin1 (CLDN1) のmRNA発現レベルは、対照群と実験群(30 μ g/ml *P. g.*)の間で有意な差は認められなかった(Fig. 4A)。Adherens junctionに關与するE-cadherin (CDH1) のmRNA発現レベルは、実験群(30 μ g/ml *P. g.*)において低下する傾向であった(Fig. 4A)。さらに、E-cadherin抗体による免疫組織染色の染色強度および染色面積を定量的に解析したところ、実験群(30 μ g/ml *P. g.*)で有意に低下しており(Fig. 4B, C, D)、E-cadherinのタンパク質発現は*P. g.*の感染により低下した。最後に、*P. g.*の感染が上皮のバリア機能に及ぼす影響を検討した。Tight junctionの機能をTERにより評価したところ、Fig. 5Aに示すように、実験群(30 μ g/ml *P. g.*)で有意に低下した。さらに、FITC-dextranにより上皮における細胞間隙の透過性を測定した。上皮を透過したFITC-dextranの量は、実験群(30 μ g/ml *P. g.*)で大幅に増加した(Fig. 5B)。

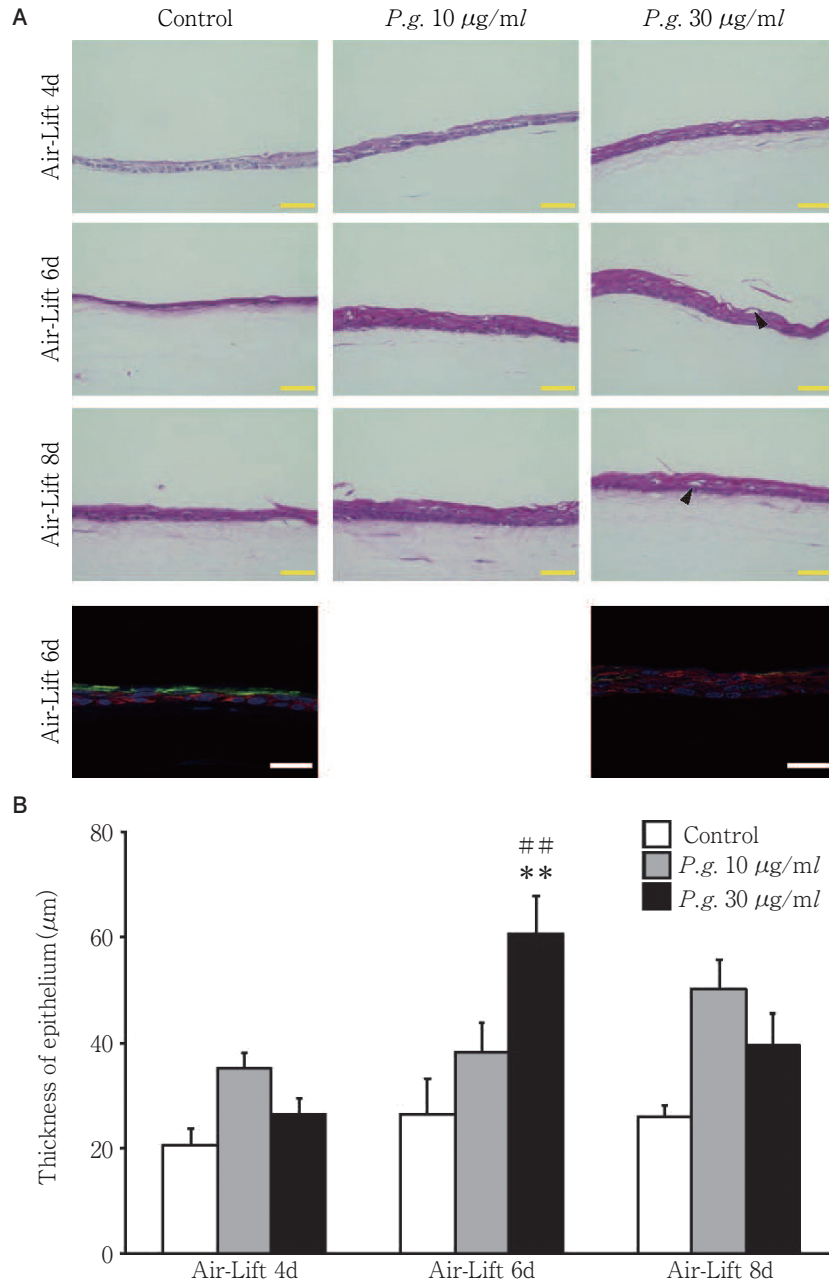


Fig. 1 Histological and immunofluorescence analysis of the three-dimensional constructed model using human oral mucosal epithelial cells

(A) Top three row : Hematoxylin and eosin staining of constructed model 4, 6 or 8 days after Air-Lift with or without *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*). Bottom row : Immunohistochemistry of constructed model 6 days after Air-Lift with or without 30 $\mu\text{g/ml}$ *P.g.* Green and red fluorescence indicate cyto-keratin 13 and cyto-keratin 14, respectively. Blue fluorescence indicates cellular nuclear by DAPI staining. Scale bar : 50 μm . (B) Quantitative analysis of thickness of epithelium layer in constructed model 4, 6 or 8 days after Air-Lift with or without *P.g.* Each column represents the mean + S. D. from 6 samples. Statistical significance was assessed using ANOVA followed by a two-tailed multiple *t*-test with Bonferroni correction. * : $p < 0.01$ vs Control, ## : $p < 0.01$ vs Air-Lift 4d 30 $\mu\text{g/ml}$ *P.g.*

Table 2 Summary of the expression of genes related to cell cycle from microarray analysis

GeneSymbol	Description	Accession No.	Zscore	Ratio
<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase	NM_000051	1.132	1.602*
<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase	NM_000051	0.631	1.299
<i>ATR</i>	ATR serine/threonine kinase	NM_001184	1.058	1.448
<i>ATR</i>	ATR serine/threonine kinase	NM_001184	1.225	1.454
<i>BRCA1</i>	Breast cancer 1, early onset, variant 2	NM_007300	2.322*	2.032*
<i>EP300</i>	E1A binding protein p300	NM_001429	0.460	0.870
<i>MDM2</i>	MDM2 proto-oncogene, variant 1	NM_002392	-3.658*	0.328*
<i>MDM2</i>	MDM2 proto-oncogene, variant 1	NM_002392	1.046	1.377
<i>WEE1</i>	WEE1 G2 checkpoint kinase, variant 1	NM_003390	-1.023	0.733
<i>CDC25A</i>	Cell division cycle 25A, variant 1	NM_001789	1.637	1.761*
<i>CDC25B</i>	Cell division cycle 25B, variant 1	NM_021873	1.159	1.427
<i>CDC25C</i>	Cell division cycle 25C, variant 1	NM_001790	1.724	1.813*
<i>CDC34</i>	Cell division cycle 34	NM_004359	-0.731	0.803
<i>CHEK1</i>	Checkpoint kinase 1, variant 2	NM_001114121	1.530	1.698*
<i>CHEK2</i>	Checkpoint kinase 2, variant 2	NM_145862	1.024	1.531*
<i>CHEK2</i>	Checkpoint kinase 2, variant 3	NM_001005735	1.369	1.608*
<i>CHEK2</i>	Checkpoint kinase 2, variant 3	NM_001005735	1.183	1.510*
<i>CHEK2</i>	Checkpoint kinase 2, variant 3	NM_001005735	1.488	1.674*
<i>CCNB1</i>	Cyclin B1	NM_031966	2.136*	1.922*
<i>CCNB1</i>	Cyclin B1	NM_031966	2.075*	1.884*
<i>CDK1</i>	Cyclin-dependent kinase 1, variant 1	NM_001786	2.263*	1.995*
<i>CDK1</i>	Cyclin-dependent kinase 1, variant 4	NM_001170406	2.292*	5.552*
<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, variant 2	NM_078467	-0.335	0.904
<i>CDKN2D</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D, variant 1	NM_001800	-0.488	0.864
<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha, variant 1	NM_001924	-0.428	0.887
<i>PLK1</i>	Polo-like kinase 1	ENST00000562272	1.686	1.790*
<i>PLK1</i>	Polo-like kinase 1	ENST00000570220	2.045*	2.346*
<i>PRKDC</i>	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide, variant 1	NM_006904	1.733	1.698*
<i>PRKDC</i>	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide, variant 1	NM_006904	1.255	1.547*
<i>RPS6KA1</i>	Ribosomal protein S6 kinase, 90 kDa, polypeptide 1, variant 1	NM_002953	1.162	1.427
<i>RPS6KA1</i>	Ribosomal protein S6 kinase, 90 kDa, polypeptide 1, variant 1	NM_002953	1.084	1.570*
<i>TP53</i>	Tumor protein p53, variant 1	NM_000546	0.492	1.225
<i>TP53</i>	Tumor protein p53, variant 8	NM_001126118	1.496	1.865*
<i>YWHAH</i>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta	NM_003405	1.387	1.530*
<i>YWHAQ</i>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta	NM_006826	0.287	1.095
<i>YWHAQ</i>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta	NM_006826	-0.191	0.946

考 察

口腔上皮は、細菌や細菌から産生される毒素からの曝露に対して保護を必要とする生理学的に重要な境界面である。しかし、バリア機能がどのように保たれ、病原微生物の曝露に対して上皮の機能がどのように変化するかについての詳細なメカニズムはまだわかっていない。

本研究は、3次元構築したヒト口腔粘膜上皮に対する *P. g.* の影響を明らかにすることを目的として実施した。まず *P. g.* の刺激に対して、ヒト口腔粘膜上皮細胞の形態変化、マイクロアレイ解析による遺伝子発現の網羅的解析を行った。次に細胞周期関連遺伝子と細胞間接着関連遺伝子の発現、細胞周期と細胞間接着にかかわるタンパクの免疫染色を行った。さらに、バリア機能の変化を評価する目的で、このモデルにおける細胞間隙透過性を

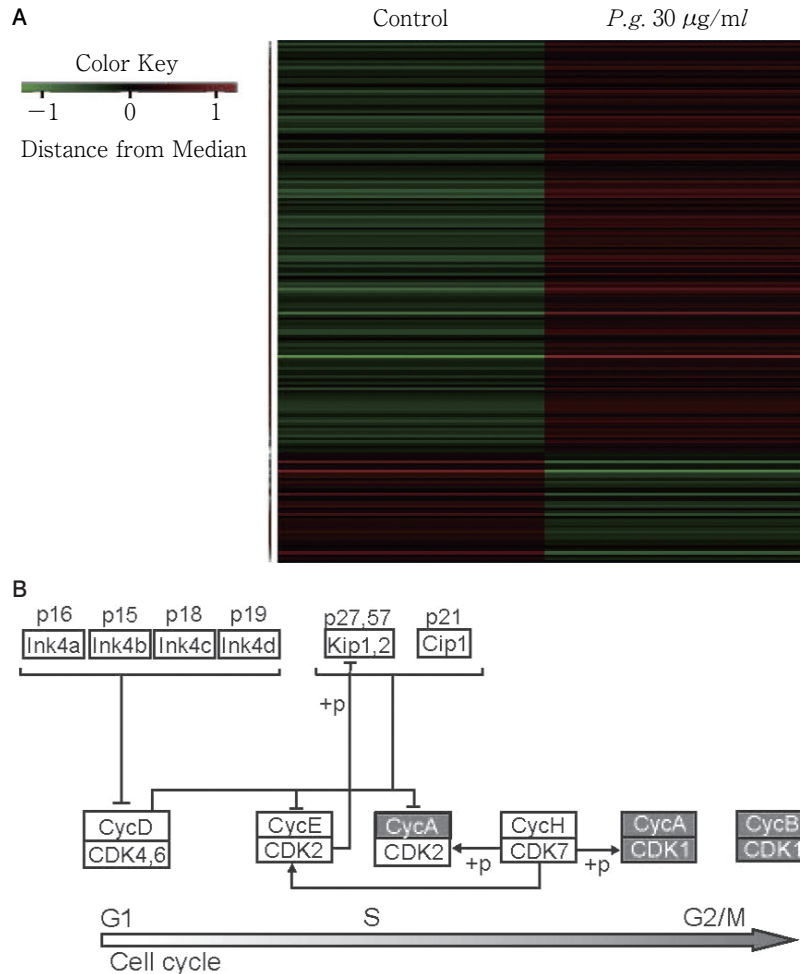


Fig. 2 Effects of *Porphyromonas gingivalis* on the expression of genes related to cell cycle progression in human oral mucosal epithelium

(A) Clustering diagram of gene trees and heatmap of the gene related to cell cycle progression in human oral epithelium with or without 30 µg/ml *P.g.* Red and green blocks represent genes whose expression levels were higher or lower than in the control, respectively. (B) Schematic representation of a part of the cell cycle pathway. Red represents statistically significant upregulation. Cyc : Cyclin, CDK : Cyclin Dependent Kinase

電氣的抵抗値と物質透過性によって測定した。

P. g. は、100°Cで15分間熱処理後に超音波による粉碎したものを用いた。*P. g.* によって生成された gingipain は、宿主組織への侵入につながり、組織分解に重要な役割を果たすと考えられる⁴⁵⁾。しかし加熱処理により gingipain, collagenase などのタンパクはすべて失活したと考えられる。LPSの失活には250°Cで30分間熱処理が必要なので、本実験で用いた粉碎物におけるLPS活性は残っていると考えられた。データとしては示していないが、実際に使用した*P. g.* 粉碎物におけるLPS力価を定量したところ、*P. g.* 粉碎物 1 mg/ml は、152 EU/mlであった。

ここから 30 µl (4.56 EU に相当) を上皮の上に滴下したが、これらは徐々に外液にも浸透したと考えられる。一般的に培養液中の LPS 基準許容濃度は、0.03 EU/ml 以下と記載されている。ヒトの体外人工受精においては、培地の LPS 濃度が 10 EU/ml を超えると受精率が低下するとの報告もあり⁶⁾、今回の実験に使用した濃度は細胞に影響を与えるレベルであったと考えられる。このことにより、本実験における現象の作用機序には LPS が深く関与していると考えられている。

歯周ポケット内には、多くの嫌気性細菌が生息している。歯周病原細菌には、Red complex と呼ばれる *Por-*

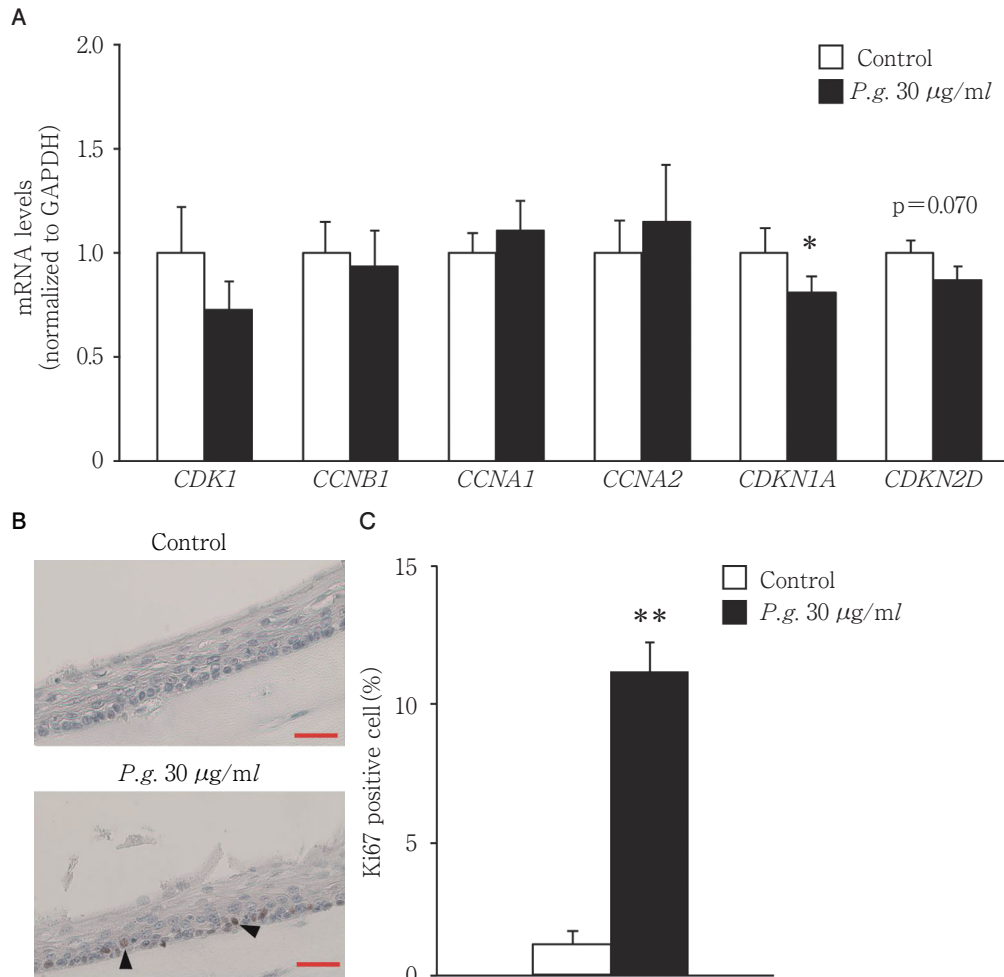


Fig. 3 The enhancement of cell cycle progression by *Porphyromonas gingivalis* in human oral epithelium

(A) Quantitative real-time PCR measurements of Cyclin dependent kinase 1 (Cdk 1), Cyclin B1 (Ccnb 1), Cyclin A1 (Ccna 1), Cyclin A2 (Ccna 2), p21 (Cdkn 1a) and p19-inK4d (Cdkn 2d) mRNA levels in human oral mucosal epithelium from constructed model at air-lift day 4 with or without 30 µg/ml *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*). Y-axis indicates mRNA expression levels normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean+S.D. from 8 samples. Statistical significance was assessed using unpaired *t*-test. * : $p < 0.05$ vs Control. (B) The representative image of DAB staining for Ki67, a marker for cell cycle progression, and hematoxylin staining in constructed model with or without 30 µg/ml *P.g.* The arrowheads indicate the Ki67 positive cells. Scale bar : 50 µm. (C) The percentage of Ki67 positive cells in human oral mucosal epithelium from constructed model with or without 30 µg/ml *P.g.* Each column represents the mean+S.D. from 7 samples. Statistical significance was assessed using unpaired *t*-test. ** : $p < 0.01$ vs Control.

phyromonas gingivalis, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis*が存在する。ほかの菌体からのLPSの働きをみるのが考えられるが、今回は慢性歯周炎患者で最も高頻度に検出される歯周病原菌である *P.g.* のLPSを検索することとした。

P.g. のLPSはほかのグラム陰性桿菌に比べて、活性

が低いことが知られている^{7,8)}。*P.g.* のLPSをフェノール抽出して、あるいは購入して実験を進めることも可能であるが、今回は菌体粉砕物にて代用した。

上皮系細胞の培養にあたっては、多層の細胞構造を構築する目的で、3次元培養法を適応した。実験開始時には、ヒト線維芽細胞株とヒト口腔粘膜上皮細胞株にて3

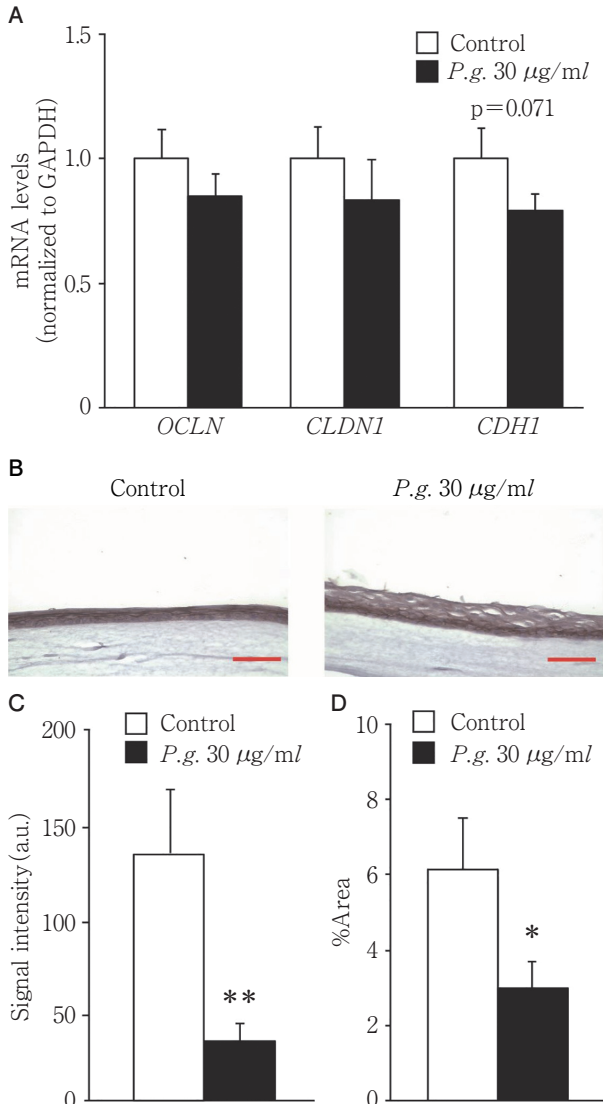


Fig. 4 The impairment of adhesion by *Porphyromonas gingivalis* in human oral epithelium

(A) Quantitative real-time PCR measurements of occludin (Ocln), claudin1 (Cldn 1), E-cadherin (Cdh 1) mRNA levels in human oral mucosal epithelium from 3-D constructed model at air-lift day 6 with or without 30 µg/ml *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*). Y-axis indicates mRNA expression levels normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean+S.D. from 8 samples. (B) The representative image of DAB staining for E-cadherin and hematoxylin staining in constructed model with or without 30 µg/ml *P.g.* Scale bar : 50 µm. (C and D) The signal intensity (C) and area percentage (D) of E-cadherin positive signal in human oral mucosal epithelium from constructed model with or without 30 µg/ml *P.g.* Each column represents the mean+S.D. from 12 samples. Statistical significance was assessed using unpaired *t*-test. * : *p*<0.05, ** : *p*<0.01 vs Control.

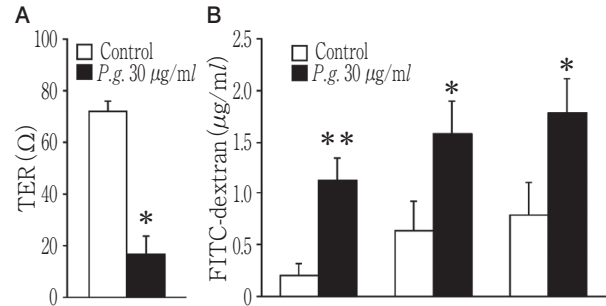


Fig. 5 The impairment of barrier function by *Porphyromonas gingivalis* in human oral epithelium

(A) Transepithelial Electrical Resistance of 3-D constructed model at air-lift day 6 with or without 30 µg/ml *P.g.* Each column represents the mean+S.D. from 5 samples. Statistical significance was assessed using unpaired *t*-test. * : *p*<0.05 vs Control. (B) Permeability of FITC-dextran from the surface of epithelium to outside medium. 5 µl of 1 mg/ml FITC-dextran (4 kDa) was applied on to the surface of 3-D constructed models at air-lift day 6. Y-axis indicates the concentration of FITC-dextran permeated to outer medium through epithelium. Each column represents the mean+S.D. from 4-5 samples. Statistical significance was assessed using unpaired *t*-test. * : *p*<0.05 vs Control. ** : *p*<0.01 vs Control.

次元培養を試みたが、口腔上皮細胞の分化を認めなかった。そこで、線維芽細胞のソースは幼若ラット初代培養の口蓋粘膜とし、上皮を口腔粘膜由来のヒト上皮細胞株としてハイブリッド化した。このような3次元構築口腔粘膜モデルは報告されていない。われわれは培養時間と菌の濃度を変えて、最適条件にてモデルを構築した。コラーゲンに混ぜた線維芽細胞から上皮層に放出される因子の存在が、安定的な上皮層基底膜の確立と上皮の分化に貢献したと考えられる⁹⁾。上皮細胞は、裏打ちする線維芽細胞の影響を受けて分化することが知られている¹⁰⁾。本実験モデルでは口蓋由来の線維芽細胞を用いているため、口蓋粘膜に類似した特徴を生じる可能性もあるが組織像において角化層は認めなかった。一般に歯周ポケットの内縁上皮は接合上皮の基底部分から形成され、その由来はほかの口腔上皮とは異なると考えられている。内縁上皮と外縁上皮を裏打ちしている線維芽細胞については、由来に違いがあるのかよくわかっていない。このような状況で、歯周ポケットを想定した実験モデルの確立は難しいと考えられた。本研究は限られた条件のなかで、線維芽細胞に裏打ちされた上皮が細菌感染にどのように反応するかをみる目的で行った。

菌体粉砕物を含むPBS溶解液の滴下は、線維芽細胞層

上に上皮播種を行ってから3日前後、基底層が形成されたのを確認し、Air-Liftした直後に行った。予備実験にてAir-Lift 3日目に滴下を行ったところ、Air-Lift 6日目に上皮有棘層から顆粒層にかけての剥離を認めたため、よりコントロールされたデータを得るために今回の実験プロトコルを採用することにした。

上皮は、外部環境と身体との境界面を構成し、外部環境からの感染や温度、機械的刺激、酸などの有害な刺激に対するバリアとして重要な役割を果たしている¹¹⁻¹³。また上皮は、基底層・有棘層・顆粒層・角化層からなる分化した層から構成されるが、表皮の表面を覆う疎水性バリアで構成される角化層は、バリア機能に特に重要な役割を果たしている¹⁴。常に細菌感染にさらされる歯肉溝上皮は、角化の程度が弱い錯角化の状態にあり、ターンオーバーが早いことが認められている。*In vitro*で行った本実験では、口腔上皮、特に歯肉溝上皮と歯肉外縁上皮の表面における*P. g.*の影響を知ることを想定した。

*P. g.*の粉砕物の滴下による上皮細胞への影響を知る目的で、滴下した群としない群の上皮細胞からそれぞれのmRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行って遺伝子発現を網羅的に検討した。その結果、細胞周期、細胞接着、ケラチノサイトの分化にかかわる遺伝子の変化が認められた。そこで、real-time RT-PCR法により、細胞周期に関する遺伝子をみたところ、CyclinA1 (*CCNA1*)、CyclinA2 (*CCNA2*)の増加傾向、*CDKN2D* (*Ink4d*)の低下傾向、*CDKN1A* (*p21*)の有意な低下を認め、いずれの遺伝子の変化も細胞分裂の亢進を裏付ける結果となった。DNAマイクロアレイでは、遺伝子発現プロファイルの比較により発現量に差がある遺伝子を検出したが、その発現量の差についてはreal-time RT-PCR法にて定量的に解析した。しかし、real-time RT-PCR法では、同群のサンプル間でバラつきがあったためにCyclinA1 (*CCNA1*)、CyclinA2 (*CCNA2*)は統計的有意差がつかなかったと考えられる。また*P. g.*の粉砕物の滴下によって、Air-Lift 6日目の細胞間接着に関与する遺伝子では、Occludin (*OCLN*)とClaudin1 (*CLDN1*)は有意差を認めなかったが、E-cadherin (*CDH1*)は低下傾向を示した。データは示していないがAir-Lift 4日目の上皮細胞においても同じ傾向を示した。上皮を単層にて培養した既報では、*P. g.*菌が上皮に影響して上皮細胞間接着をゆるめ、E-cadherinタンパクレベルの低下があるとされている¹⁵。本実験においては、モデル系の上皮は全面均等に重層化していない場合もあり、上皮すべてからタンパク質を抽出して解析するWestern Blottingは適当でないと考えられる。*P. g.*の粉砕物の滴下によって、細胞周期が亢進する遺伝子が働か細胞間接着については遺伝子レベルにおける影響は軽微であると考えられた。

*P. g.*の粉砕物の滴下による細胞周期の亢進は、免疫組織学的にも示された。細胞周期進行のマーカーであるKi67について免疫染色を行うと、Ki67陽性細胞数は活発な細胞増殖をする基底層および傍基底細胞層で有意に増加していた。このことは*P. g.*の感染により、上皮細胞の細胞分裂が進行する可能性を示している。

細胞間接着はTight junctionやAdherens junctionを含み、上皮によるバリア機能に不可欠な構造である。口腔上皮は、角化層の発現は低く、クローディンなどの密着結合タンパク質の発現が低くなっていることが報告されている¹⁶。E-cadherinはAdherens junctionに関与するが、E-cadherinのタンパク質発現は*P. g.*の感染により低下することが免疫組織化学染色による定量的解析で示された。細胞周期の亢進は細胞接着能の低下を招くことが報告されており¹⁷、本実験の所見とも一致している。

これらのデータは、*P. g.*の感染がヒト口腔粘膜上皮のバリア機能を低下させる可能性があることを示唆している。本実験の病理組織学的観察において、*P. g.*の粉砕物を滴下した群では滴下しない群に比べて上皮層が厚くなり、細胞間隙の拡大と空胞変性が認められた。

そこで上皮のバリア機能を客観的に測定する目的で、電気的抵抗値の測定と細胞間隙の物質透過性試験を行った。その結果、*P. g.*の粉砕物を滴下した群ではしない群に比べて電気的抵抗値が有意に低下し、細胞透過性が有意に増加しており、病理組織ならびに免疫組織化学染色の所見を裏付ける結果となった。

以上の結果は、*P. g.*は上皮バリア機能の破綻を招き、病変の重症化に関与することを示す。われわれは、これがどのようなメカニズムによるのかいまだ正確なデータはもち合わせていない。*P. g.*の粉砕物による影響が、粉砕物中のLPSによるものであるならば、上皮細胞と線維芽細胞におけるTLR4の関与が疑われるので、TLR4阻害剤投与による効果の検証をする必要がある。

今後、歯周病細菌に対する生体のバリア機能がどのように保たれ、細菌とその産物による曝露に対して生体側の機能がどのように変化するかについてのさらに詳細なメカニズムを解明し、治療法の改善に結び付けたいと考えている。

結 論

ヒト口腔粘膜上皮細胞と線維芽細胞による3次元構築モデルにおいて、ヒト口腔粘膜上皮細胞は、*P. g.*への曝露により細胞増殖が亢進するとともに細胞間隙が拡大し、細胞間接着タンパク質が減少する。これによって、上皮バリア機能が低下し、病変の重症化に関与すると考えられる。

謝 辞

この論文の執筆にあたり、細胞作製者である James G Rheinwald 博士、細胞の供与をしてくださった大阪大学医学部眼科の西田幸二教授、研究にあたり親身にご助言頂いた、当教室の吉永泰周准教授と口腔医療センターの金子高士教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Amar S, Han X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. *Med Sci Monit* 2003; 9: RA291-299.
- 2) Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, Markt J, McGowan D, Kerr GS, Redman RS, Reimold A, Griffiths G, Beatty M, Gonzalez SM, Bergman DA, Hamilton BC 3rd, Erickson AR, Sokolove J, Robinson WH, Walker C, Chandad F, O'Dell JR. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 1090-1100.
- 3) Skougaard MR. Cell renewal, with special reference to the gingival epithelium. *Adv Oral Biol* 1970; 4: 261-288.
- 4) Takeuchi H, Sasaki N, Yamaga S, Kuboniwa M, Matsusaki M, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1. *PLoS Pathog* 2019; 15: e1008124.
- 5) Katz J, Yang QB, Zhang P, Potempa J, Travis J, Michalek SM, Balkovetz DF. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Infect Immun* 2002; 70: 2512-2518.
- 6) Fishel S, Jackson P, Webster J, Faratian B. Endotoxins in culture medium for human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 108-111.
- 7) Ogawa T, Uchida H, Amino K. Immunobiological activities of chemically defined lipid A from lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology* 1994; 140: 1209-1216.
- 8) 池田康男, 原 宜興, 加藤伊八. *Porphyromonas gingivalis* 由来のリボ多糖が誘発するマウス歯肉の炎症ならびに歯槽骨吸収に関する病理組織学的研究. *日歯周誌* 1994; 36: 519-530.
- 9) 高木順之, 三橋善比古, 石川博康, 橋本 功. 表皮細胞の分化と増殖に及ぼす線維芽細胞の影響. *日皮会誌* 1993; 103: 747.
- 10) 日高庸行. 辺縁部歯周組織への遊離類粘膜移植に関する実験病理組織学的研究. *日歯周誌* 1984; 26: 433-465.
- 11) Presland RB, Jurevic RJ. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ* 2002; 66: 564-574.
- 12) Bryant DM, Mostov KE. From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 887-901.
- 13) Bonazzi M, Cossart P. Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection. *J Cell Biol* 2011; 195: 349-358.
- 14) Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 1999; 31: 5-19.
- 15) Katz J, Sambandam V, Wu JH, Michalek SM, Balkovetz DF. Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation on epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun* 2000; 68: 1441-1449.
- 16) Saito I, Watanabe O, Kawahara H, Igarashi Y, Yamamura T, Shimono M. Intercellular junctions and the permeability barrier in the junctional epithelium. *J Periodontol Res* 1981; 16: 467-480.
- 17) Fukushima H, Ogura K, Wan L, Lu Y, Li V, Gao D, Liu P, Lau AW, Wu T, Kirschner MW, Inuzuka H, Wei W. SCF-mediated Cdh1 degradation defines a negative feedback system that coordinates cell-cycle progression. *Cell Rep* 2013; 4: 803-816.

Analysis of the Influence of *Porphyromonas gingivalis* on the Human Oral Mucosa with a Three-dimensional Construct Model

RYU Takanori¹, UCHIDA Kunitoshi², OKAMURA Kazuhiko³,
HATTA Mitsutoki², YAMAZAKI Jun^{2,4} and SAKAGAMI Ryuji¹

¹Section of Periodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College

²Department of Physiological Science and Molecular Biology, Fukuoka Dental College

³Department of Morphological Biology, Fukuoka Dental College.

⁴Department of Veterinary Medicine, Nihon University College of Bioresource Sciences

Abstract

Purpose: Oral epithelial cells have an important barrier function against bacteria and bacterial toxic substances. *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*), a periodontopathic bacteria, is thought to be closely related to the development and aggravation of periodontitis by destruction of the epithelial barrier function. However, the detailed mechanism of how *P. g.* affects epithelial cells and destroys the barrier function of the epithelium is still unknown. In this experiment we investigated the influence of *P. g.* on oral epithelial cells.

Methods: A three-dimensional construct model composed of human oral epithelial cells and rat fibroblasts was established and two groups, with and without ground *P. g.* ATCC33277, were prepared. The epithelial cell layer was later air-lifted. Samples were collected at 4 to 8 days after incubation, then HE staining and immunohistological staining were performed for morphological observation. DNA microarray analysis and gene expression analysis using qRT-PCR were conducted on the collected epithelium. At air-lift day 6, samples were used for TER and FITC-dextran analyses to evaluate the barrier function.

Results: A significant increase of the epithelial thickness was found in ground *P. g.* models at Air-Lift day 6. Microarray pathway analysis revealed that the level of genetic expression related to cell cycle and cell adhesion had changed. As for cell cycle, the expression level of Cdkn1a mRNA was significantly reduced and immunohistological staining showed the number of Ki67 positive cells was significantly increased. As for cell adhesion, a significant reduction of staining intensity and a decreased area of E-cadherin were confirmed. The electrical resistivity of tissue was significantly lowered and the permeability of tissue was significantly increased with dextran permeability assay in the ground *P. g.* models.

Conclusion: The three-dimensional construct model revealed that cell proliferation increases, intracellular space increases, and cell adhesion protein reduces when human oral epithelium is exposed to *P. g.*, resulting in lowered barrier functions and aggravated periodontal pathology.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, three-dimensional construct model, human oral epithelial cells