

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K11396
研究課題名(和文) 歯周炎発症におけるNLRP3 インフラマソームの関与

研究課題名(英文) NLRP3 Inflammasome in onset periodontitis

研究代表者

中村 弘隆 (NAKAMURA, Hirotaka)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：70346914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎の悪化における細菌成分の働きについては様々な報告があるが、免疫機構の働きについては完全に解明されていない。

我々はこれまでにE. coli LPSで感作したラットの歯肉溝内へ抗原として高濃度E. coli LPSを滴下すると、歯周ポケット形成や歯槽骨吸収が誘導されることを報告した。そこで、この実験的歯周炎モデルにT細胞が欠損しているヌードラットを用いて、歯肉溝接合上皮を介して起こる歯周組織破壊におけるT細胞の影響について検討した結果、アタッチメントロスや歯槽骨吸収などの歯周組織破壊には免疫複合体形成が強く関係していることが改めて示唆された。

研究成果の概要(英文)：The onset and progression of periodontitis involve bacterial infection and the immune response. T cells function in the immune response and reportedly induce bone resorption in inflammatory bone loss. However, the exact role of T cells in periodontal destruction remains unclear. Using our experimental model of periodontitis, we aimed to investigate the influence of T cells on periodontal destruction.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周炎 T細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は歯周ポケットの形成、歯槽骨吸収を特徴とする慢性炎症性疾患であり、これらの歯周組織破壊は細菌成分だけでなく、それに対する宿主の免疫応答によって発症、進行するとされている (Socransky et al. J Clin Periodontol 1984 Liu YC et al. Periodontol 2000)。歯周炎の悪化における細菌成分の働きについては様々な報告があるが、免疫機構の働きについては完全に解明されていない。

T細胞は免疫応答調整の中心をなす細胞であり、歯周組織破壊への関与についても多くの研究がなされている。T細胞の欠損したヌードラットでは正常ラットよりも骨吸収が進行し、ヌードラットに正常T細胞を移入すると骨吸収が抑制されたことから、T細胞は骨吸収制御に関係するとの報告がある (Yoshie et al. Infect Immun 1985)。一方、炎症性骨吸収においてT細胞は抗原提示により活性化し、RANKLやTNF- α を産生し骨吸収を誘導するという報告もあり (Jiang et al. Infect Immun 2002 Abu-Amer et al. J Clin Invest 1997)、我々も過去に *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) をマウス歯肉に注入した際、T細胞は歯槽骨吸収に促進的に働くことを報告している。しかし実際に歯肉溝を介した感染によって発症した歯周炎組織において、T細胞が実際にどのように働くかは明確ではない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに *Escherichia coli* LPS (*E. coli* LPS) を抗原として、特異抗体を交互にラット歯肉溝内へ滴下することにより、歯周ポケット形成が誘導されることを報告した (Kuramoto et al. J Periodontal Res 2012)。また *E. coli* LPS で感作したラットの歯肉溝内へ抗原として高濃度 *E. coli* LPS を滴下すると、歯周ポケット形成や歯槽骨吸収が誘導されることを報告した (Yoshinaga et al. J Periodontal Res 2012)。そこで本研究では、この実験的歯周炎モデルにT細胞が欠損しているヌードラットを用いて、歯肉溝接合上皮を介して起こる歯周組織破壊におけるT細胞の影響について検討した。

3. 研究の方法

実験動物

実験には9週齢の雄性のF344NJcl-rnu/+ラット、F344NJcl-rnu/rnuラットを使用しSPF環境下で飼育した。本実験は長崎大学先端生命科学研究所支援センター・動物実験施設の実験指針に従い承認を得た後に行われた。

実験デザイン

F344NJcl-rnu/+ラット(WT)、F344NJcl-rnu/rnuラット(Nu)各15匹をそれぞれ5匹ずつ、LPSで感作を行った感作群(I)、感作を行わなかった非感作群(nl)、無処置群(non)に分け、合計6群とした(I-WT群、nl-WT群、non-WT群、I-Nu群、nl-Nu群、non-Nu群)。感作群のラットは150 μ gの *E. coli* LPS(O111: B4; Sigma, St Louis, MO, USA)(LPS)を300 μ lのPBSとフロイント完全アジュバントに懸濁した溶液を腹腔内投与し、その28日後にブースターとしてPBSで希釈したLPSとフロイント不完全アジュバントの懸濁液を腹腔内投与した。非感作群はPBSとフロイント完全アジュバントを腹腔内に注入し、その28日後にPBSとフロイント非完全アジュバントの懸濁液を腹腔内に注入した。ブースターの1日後に当講座の過去の報告を改変してLPS・PBS滴下を行った(Yoshinaga et al. J Periodontal Res 2012)。簡潔には、イソフルラン全身麻酔下にてPBSで希釈したLPS(50 μ g/ μ L)をマイクロシリンジにて上顎右側第一臼歯口蓋側歯肉溝に滴下し、左側は対照としてPBSのみを滴下した。30分間に5分毎に3 μ Lずつ7回滴下を行い1クールとし、これを24時間ごとに20回繰り返した。20日間滴下後の1時間後にラットの屠殺を行った。

ELISA

血液サンプルを眼窩下静脈より感作前、ブースター前、滴下5日、10日、20日の時点で採取し過去の報告と同様に血清抗LPS IgG抗体レベルをELISA法にて測定した(Yoshinaga 2012, Nakatsu 2014, Takamori 2015, Noguchi 2016)。

切片作製

ラットは屠殺後に上顎骨を摘出し4%パラホルムアルデヒド溶液にて4で10時間固定後、10%EDTA溶液にて3週間脱灰し、AMeX法(Sato 1986)にてパラフィン包埋した。各ブロックから上顎第一臼歯頬口蓋断面にて、頬側根・口蓋側根が同時に認められる角度で4 μ m間隔の連続切片を作製した。

染色

作製した連続切片は10枚間隔でヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。また、破骨細胞同定のため、10枚間隔で酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)染色を行った。即ち、脱パラフィン後、naphthol AS-BI phosphate(Sigma, USA)を用い、さらに100 mmol/lのL(+)-酒石酸を添加した酒石酸耐性反応液(pH 5.0)にて37で30分間反応させた。水洗後ヘマトキシリンで核染色し

た。

免疫複合体検出のために、連続切片に抗 C1qB 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。即ち脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止のため、3% H₂O₂/メタノール溶液に 30 分間浸漬した。次にヤギ正常血清に 30 分間反応させ、非特異的結合を阻害した。一次抗体として、ウサギ抗 C1qB 抗体 (AVIVA Systems Biology, USA) を 4 で一晩反応させた。一次抗体反応後、PBS で洗浄し、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体 (Dako, Denmark) を滴下し、室温で 30 分間反応させた。切片を PBS で洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジン (Dako) に室温で 30 分間反応させた。再度 PBS で洗浄後、DAB 溶液で発色させ、ヘマトキシリンで核染色した。

IL-4 検出のために抗 IL-4 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。即ち脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止のため、3% H₂O₂/メタノール溶液に 30 分間浸漬した。次にヤギ正常血清に 30 分間反応させ、非特異的結合を阻害した。一次抗体として、ウサギ抗 IL-4 抗体 (ab9811, Abcam Company, USA) を 4 で一晩反応させた。一次抗体反応後、PBS で洗浄し、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体 (Dako, Denmark) を滴下し、室温で 30 分間反応させた。切片を PBS で洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジン (Dako) に室温で 30 分間反応させた。再度 PBS で洗浄後、DAB 溶液で発色させ、ヘマトキシリンで核染色した。

測定

HE 染色切片を用いて、アタッチメントロスとしてセメントエナメル境 (CEJ) から接合上皮 (JE) 歯根面付着部歯冠側端までを、歯槽骨レベルとして CEJ から歯槽骨骨頂部までの距離を計測した。距離の測定は組織写真をデジタルカメラにて撮影し、分析ソフト Image J (U.S. National Institutes of Health, USA) を用いて行った。また、接合上皮周囲の結合組織内の 50 μ m 四方の 4 つの単位領域内の炎症性細胞数を計測し単位面積当たりの炎症性細胞数を測定した。TRAP 染色切片を用いて、光学顕微鏡下にて骨頂部から 500 μ m の距離の骨面に接した TRAP 陽性多核細胞数を計測した。IL-4 免疫組織化学的染色切片を用いて、光学顕微鏡下にて接合上皮周囲の結合組織と歯槽骨表面上の結合組織の 50 μ m 四方の 8 か所の単位領域内の IL-4 陽性細胞数を計測し、単位面積当たりの IL-4 陽性細胞数を測定した。

統計分析

全ての統計分析は StatMate (ATMS Co. Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。感作群、非感作

群の血清抗体レベルについては Mann-Whitney Test を行い、有意水準を $P < 0.001$ で検討した。I-WT vs nl-WT、I-Nu vs nl-Nu、I-WT vs I-Nu、nl-WT vs nl-Nu 間のアタッチメントロス、炎症性細胞数、歯槽骨レベル、TRAP 陽性細胞数、IL-4 陽性細胞数の相違については Mann-Whitney Test を行い、有意水準を $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ で検討した。

4. 研究成果

血清中抗 LPSIgG 抗体レベル

血清中抗 LPSIgG 抗体レベルは感作群で滴下開始 5 日の時点で滴下前と比較して有意に上昇した一方で、非感作群では 5 日目の時点では有意差は見られなかった。感作群の抗体レベルは滴下 20 日まで維持されていた。非感作群では、滴下開始から 20 日までに徐々に上昇し、nl-WT 群で滴下前と比較して有意に上昇したが I-WT 群と比較して低いレベルであった。また、無処置群では抗体レベルの上昇は見られなかった (data not shown)。

病理組織学的所見

PBS 滴下側では 4 群とも無処置群と変化は認められず (data not shown)、接合上皮の根尖側端は CEJ 付近に位置しておりアタッチメントロスは観察されなかった。接合上皮内及び接合上皮結合組織中には炎症性細胞浸潤はほとんど見られず、歯槽骨表面には TRAP 陽性の破骨細胞は観察されなかった。LPS 滴下側では非感作群で軽度のアタッチメントロスが観察され、接合上皮内及び接合上皮結合組織には軽度の炎症性細胞浸潤がみられ、歯槽骨表面に TRAP 陽性の破骨細胞の発現が観察された。一方で、感作群ではより強いアタッチメントロスと炎症性細胞浸潤、歯槽骨表面に多数の TRAP 陽性の破骨細胞の発現が観察された。

組織計測学的所見

アタッチメントロス

アタッチメントロスは LPS 滴下側でのみ認められ、WT 群、Nu 群ともに非感作群と比較して感作群で有意に増加していた。非感作群の nl-WT 群と nl-Nu 群の比較では nl-WT 群で有意な増加がみられ、感作群の I-WT 群と I-Nu 群の比較では I-Nu 群で有意なアタッチメントロスの増加がみられた。

歯槽骨レベル

歯槽骨レベルは、全ての群で PBS 滴下側と比較して LPS 滴下側で有意に低下していた。WT 群、Nu 群ともに非感作群と比較して感作群で有

意に歯槽骨レベルの低下がみられた。非感作群の nl-Nu 群と nl-WT 群の比較では nl-WT 群で有意な歯槽骨レベルの低下が認められた一方で、感作群の I-WT 群と I-Nu 群の比較では I-Nu 群で有意な歯槽骨レベルの低下がみられた。

炎症性細胞数

炎症性細胞数は全ての群で、PBS 滴下側と比較して LPS 滴下側で有意な増加を認めた。WT 群、Nu 群ともに非感作群と比較して感作群で有意な炎症性細胞数の増加が観察された。非感作群の nl-WT 群と nl-Nu 群の比較では nl-WT 群で有意な炎症性細胞の増加を認めた一方で、感作群の I-WT 群と I-Nu 群の比較では I-Nu 群で有意な炎症性細胞の増加が観察された。

破骨細胞数

破骨細胞は PBS 滴下側では観察されず、LPS 滴下側でのみ観察された。Nu 群では感作群で有意な破骨細胞の増加がみられ、WT 群では有意差はなかったが感作群で破骨細胞数大きい傾向を示した。非感作群の nl-WT 群と nl-Nu 群の比較では nl-WT 群で有意な破骨細胞数の増加が認められ、感作群の I-WT 群と I-Nu 群の比較では I-Nu 群で有意な破骨細胞数の増加が認められた。

C1qB の免疫組織科学的所見

C1qB は PBS 滴下側では発現が認められず、LPS 滴下側でのみ観察された。nl-WT 群、nl-Nu 群では C1qB は接合上皮および接合上皮直下結合組織に発現がみられ、I-WT 群、I-Nu 群では接合上皮から結合組織、歯槽骨上までの大きな範囲で発現が認められた。

IL-4 陽性細胞数

IL-4 陽性細胞は PBS 滴下側ではほぼ観察されず、LPS 滴下側で多数観察された。WT 群、Nu 群ともに非感作群と比較して感作群で有意な IL-4 陽性細胞の増加がみられた。非感作群の nl-WT 群と nl-Nu 群の比較では有意差は見られなかったが、感作群の I-WT 群と I-Nu 群の比較では I-WT 群で有意な IL-4 陽性細胞数の増加が認められた。

考察

今回、感作群における血清抗 IgG 抗体レベルは、WT 群および Nu 群ともに5日目には上昇していた。非感作群では上昇傾向はみられたものの、滴下20日目まで有意な上昇はみられなかつ

た。

組織計測の結果を分析する際には、WT 群または Nu 群の LPS 感作群と非感作群を比較した。次に感作群または非感作群の WT 群と Nu 群とを比較した。その結果、アタッチメントロス、炎症性細胞浸潤、歯槽骨レベルの低下については、WT 群または Nu 群ともに、LPS 感作群の方が非感作群よりも有意に大きな値を示した。破骨細胞数については、Nu 群のみ感作群の方が非感作群よりも高い値を示した。一方、感作群の WT 群と Nu 群とを比較すると、アタッチメントロス、炎症性細胞浸潤、歯槽骨レベルの低下、破骨細胞数は Nu 群の方が WT 群よりも有意に大きかった。逆に非感作群の WT 群と Nu 群とを比較すると、アタッチメントロス、炎症性細胞浸潤、歯槽骨レベルの低下、破骨細胞数とともに、WT 群の方が Nu 群よりも有意に大きい傾向がみられた。

感作の有無による組織破壊の相違

アタッチメントロス、炎症性細胞浸潤、歯槽骨レベルについては、感作群の方が有意に高い傾向を示した。また破骨細胞数についても、Nu 群は感作群が有意に、WT 群では有意差はなかったが感作群の方が高い傾向を示した。これについては過去の報告と同様に、感作によって全身的に特異的抗体が産生され、そこに抗原である LPS を滴下することで歯肉溝接合上皮周囲での抗原と抗体が反応し免疫複合体を形成して歯周組織破壊を誘導したと考えられる (Kuramoto et al. J Periodontal Res 2012 Yoshinaga et al. J Periodontal Res 2012)。免疫複合体の構成要素である C1qB は補体分子であり免疫複合体を形成することで補体系の古典経路を活性化するとされている。C1qB を観察した結果、非感作群では C1qB は接合上皮表面や内部にのみ発現がみられたのに対して、感作群では接合上皮内部から周囲結合組織までより広範囲で発現がみられた。免疫複合体の形成によって古典経路が活性化され好中球走化性因子である、C3a や C5a が発現し好中球の浸潤が誘導される (Shushakova N et al. J Clin Invest 2002)。好中球は細菌に対して防御的に働くが産生する活性酸素やエラスターゼによって歯周組織破壊に関与することが報告されている (Janoff A et al. AnN Rev Med 1985 Altman et al. J Periodontal Res 1992 Weiss SJ et al. New Engl J Med 1989)。また補体成分の C3a や C5a は破骨細胞形成を誘導すること (Ignatius et al. J Cell Biochem 2011) や、好中球が炎症刺激によって TNF- α や RANKL を産生し骨吸収を誘導することも報告されている (Chakravarti et al. Blood 2009)。よって今回の実験でも感作による免疫複合体の形成が好中球などの炎症性細胞浸潤を誘導し歯周組織破壊に関与していると思われる。

T細胞の有無による組織破壊の相違

非感作の状態では、アタッチメントロス、炎症性細胞浸潤、歯槽骨レベルの低下、破骨細胞数はいずれもWT群の方がNu群よりも高かった。これに対し感作されている状態では、すべてのパラメーターについてNu群の方が全く逆にWT群よりも有意に大きかった。非感作の状態ではLPSを組織にinjectした実験では、T細胞は骨吸収に対して促進的に働く(Takayanagi et al. Nature 2000)。我々も過去に、マウス歯肉にLPSを頻回注入するとヌードマウスでは炎症性細胞浸潤や歯槽骨吸収が抑制されていたが、ヌードマウスに正常マウスのT細胞を移入すると回復ことを報告した(Ukai et al. J Periodontal Res 1996)。これはT細胞とB細胞が欠損したSCIDマウスにT細胞を移入しても同様であった(Yamaguchi M et al. J Periodont Res 2002)。一般に樹状細胞やマクロファージは、LPSの刺激を受けTNF- α 、IL-6、IL-12産生を増加しナイーブ(CD4⁺)T細胞をTh1細胞に誘導する(Verhasselt et al. J Immunol 1997, Winzer et al. J EXP Med 1997, Hacker et al. EMBO J 1999)。Th1細胞はIFN- γ 産生しマクロファージからのIL-1やTNF- α などの炎症性サイトカイン産生を誘導する(Arenzana-Seisdedos et al. J Immunol 1985 Vandooren et al. Arthritis Rheum 2009)。またRANKLを産生し、破骨細胞への分化誘導を行う(Garlet GP et al. J Dent Res 2010)。これらのことから今回の歯肉溝にLPSを滴下する実験でもおそらく同じ機序で、非感作の状態ではT細胞はマクロファージなどと協調的に働いて炎症細胞浸潤やそれに続く歯槽骨吸収を誘導し、ヌードラットではT細胞が欠損しているため炎症は促進されなかったと思われる。

一方感作した状態では、特異的抗体の存在が一つの特徴としてあげられる。抗原特異的抗体は抗原と免疫複合体を形成し、CD40を介してナイーブT細胞をTh2細胞へと分化誘導する(Macaulay et al. J Immunol 1997, Crawford et al. J Immunol 2006)。Th2細胞から産生されるIL-4は抗炎症性サイトカインであり、マクロファージからのTNF- α やIL-12の産生を抑制することが報告されている(Zissel et al. Eur Cytokine Netw. 1996)。さらに、補体成分の一部であるC1qはin vitroでLPS刺激による骨髄由来樹状細胞のIL-12産生を抑制しTh1細胞分化を抑制することが報告されている(Yamada et al. Eur J Immunol 2004)。実際に本研究におけるIL-4陽性細胞数を見ると、非感作群同士の比較では有意差は見られなかったが、感作群同士の比較ではI-Nu群と比較してI-WT群で有意に大きい結果であった。それ以外にもマウス実験的歯周炎において初期では炎症促進性であるTh1やTh17細胞の有意な流入がみられるが、炎症の後期ではTh2、Treg細胞が歯周組織に遊走し炎症の安

定化や歯槽骨喪失の減少がみられるという報告もある(Araujo-Pires AC et al. J Bone Miner Res. 2015)。本実験ではLPS感作LPS滴下と実験期間が比較的長期間であるため、LPS感作を受けたI-WT群ではLPS非感作であるnl-WT群と比較してTh2細胞の抗炎症性サイトカインであるIL-4が増加したのかもしれない。以上のことから、今回の実験におけるI-WT群では、T細胞は樹状細胞やマクロファージによってTh1細胞に分化誘導される一方で、免疫複合体の形成によって一部はTh2細胞へも分化誘導され、Th1、Th2細胞の両細胞によって炎症や骨吸収が調節されたと考えた。T細胞が欠損しているNu群では、Th1細胞、Th2細胞への分化誘導は起こらず、T細胞による調節がない状態で感作による免疫複合体形成が誘導する補体系の活性化、炎症性細胞浸潤やそれに続く歯槽骨吸収が促進され、結果としてI-Nu群の方がWT群よりも歯周組織破壊が強くなったものと考えた。この免疫複合体形成の影響は、nl-Nu群とI-Nu群間の比較からも明らかである。

T細胞の亜群の一つである制御性T細胞(Treg細胞)は抗炎症性サイトカインであるIL-10やTGF- β を産生し免疫反応を抑制すること(Dario A et al. Nat Rev Immunol 2008)や、炎症反応や破骨細胞形成を抑制することが報告されている(Garlet GP et al. J Clin Periodontol 2010)。Th2産生サイトカインであるIL-4刺激を受けたマクロファージがケモカインを産生することでTreg細胞の局所への遊走が誘導されること(Andrew DP et al. J Immunol 1998 Araujo-Pires A et al. J Bone Miner Res 2015)も報告されている。本研究結果にもTreg細胞の影響があることは十分考えられるので、我々はIL-10の免疫組織化学的染色を行ったが明確な検出が出来なかった。またそれ以外のTreg細胞のマーカーとしてはFoxP3が挙げられるが、免疫組織化学的染色の報告はない。しかしTreg細胞の歯周炎への関与については、重要であり更なる調査が必要だと思われる。

結論

今回の実験からアタッチメントロスや歯槽骨吸収などの歯周組織破壊には免疫複合体形成が強く関係していることが改めて示唆された。また、非感作の状態ではT細胞が存在することで歯周組織破壊が促進される一方で、感作された状態ではT細胞が存在することで歯周組織破壊が調節されていることが示唆された。T細胞による歯周組織破壊のメカニズムの解明については更なる研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

A histopathologic study of the controlling role of T cells on experimental periodontitis in rats.
Izumi Satoshi, Nakamura Hiroataka, Hara Yoshitaka. J.D.S. 2018 Jun;13(2):e1-e10. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.2hozon.nagasaki.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 弘隆 (NAKAMURA, Hiroataka)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号: 70346914