

令和元年6月6日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11527

研究課題名(和文) 自然リンパ球による歯周炎症誘発機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Innate lymphocyte cells on the onset and progression of periodontitis.

研究代表者

小林 良喜 (KOBAYASHI, Ryoki)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：10609085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周疾患は歯周病原性最近と宿主細胞との相互作用により歯周組織の破壊が引き起こされる慢性炎症性疾患であり、生体は細菌に対する防御反応として様々な免疫応答を有している。近年、自然免疫系に関わる新たな細胞群として自然リンパ球(Innate lymphocytes cells; ILCs)が報告された。ILCsは抗菌応答、炎症応答や組織修復に関わることが報告されていることから、歯周病原性細菌による歯周炎の誘発と慢性化に至る機序についてILCsの関わりを細胞および分子レベルで検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病原性細菌と宿主細胞間の相互作用である免疫応答は自然免疫系と獲得免疫系に二分されているが、境界は不明瞭となり自然免疫系に関わる新たな細胞群として自然リンパ球(Innate lymphocytes cells; ILCs)がある。ILCsは腸管上皮細胞の修飾作用により免疫応答や常在菌叢へ働きかけることで腸内環境での有用性が下部消化器系を中心に多数報告されている。本研究は、口腔内(歯周組織)に局在するILCsの同定・解析することはILCsの役割の解明だけでなく、歯周疾患に対する予防法・治療法の解明につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)： Periodontal disease is a chronic inflammatory disease in which periodontopathic bacteria interact with host cells to destroy periodontal tissue. The host defenses have various immune responses as a protective response against bacteria. Recent studies have identified novel lymphocytes subsets named innate lymphoid cells (ILCs). ILCs are present in a wide variety of epithelial compartment and occupy an intermediate position between the innate and acquired immune system. ILCs play essential roles in protection against various invading microorganisms including multicellular parasites, and the maintenance of homeostasis and repair of epithelial layers. In this study, identifying and analyzing ILCs localized in the periodontal tissue can be expected to lead not only to the elucidation of preventive methods and treatment for periodontal diseases.

研究分野：口腔免疫

キーワード：自然リンパ球 Innate lymphocyte cells 歯周炎モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性菌である *Prophyromonas gingivialis* (Pg) や *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (Aa) は様々な病原因子を産生することで生体の防御機構を回避し、歯周ポケットに定着・増殖しバイオフィルムを形成することで、持続的な炎症・免疫反応を惹起させると考えられる。しかしながら、宿主側の炎症・免疫反応が誘発するメカニズムについては依然として不明な点が多い。生体は侵入した微生物に対して、微生物の構造パターンを認識し排除する自然免疫応答と、特異的な抗原を認識し T 細胞や抗体による排除を行う獲得免疫応答を使い分けることで、感染防御を行なっている。呼吸器や消化器を覆う粘膜面は外界と接触面を有することで外来抗原や微生物の侵入口であり、生体は侵入を未然に防ぐために粘膜上皮バリア機能や粘膜上皮下に多数の免疫細胞を保有することで感染初期応答の重要な働きを担っている。口腔は呼吸器と消化器の機能を合わせ持ち、生体の入り口として様々な外来抗原が暴露していると考えられる。中でも口腔常在菌のなかで歯周病原性細菌の割合は少数であるが、歯周ポケット内に定着・増殖することで持続的に誘導される炎症は慢性化されることで、口腔内疾患（歯肉炎・歯周炎）を惹起させるだけでなく、様々な全身疾患のリスクファクターとなることが指摘されている。また、近年、自然免疫機構と獲得免疫機構の中間的性格をもつ免疫細胞として注目されている自然リンパ球 (Innate lymphocyte cells, ILCs) は、粘膜組織などに存在していることが報告され、外来抗原や微生物の侵入に対して速やかに反応し、生体防御の初期から関与していることが知られている (Sawa S., Nat Immunol. 2011)。そこで、歯周病原性細菌の歯肉粘膜組織を介した炎症誘発と歯槽骨吸収に至る機序を ILCs の役割を中心に解明するという着想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究では歯周病原性細菌の口腔内接種により生じた歯肉炎症巣における炎症誘発機序を解明するために、自然リンパ球 (Innate lymphocyte cells; ILCs) -1, -2, -3 型の動態や歯周炎を惹起させたマウスの歯肉粘膜組織から ILCs に関連する項目を細胞および分子レベルで解析し、炎症巣に局在する ILCs や炎症誘発や重篤化に関与する因子の同定することを目的とした。ILCs はサイトカインの発現パターンにより 1 型、2 型、3 型に分類され、それぞれ異なるサイトカインを産生することで、病原性微生物からの感染防御に働くことが報告されている。これまでに歯周病原性細菌による歯周病モデルマウスの検討から、感染初期に Th17 細胞が炎症歯肉組織に誘導され、その後 Treg 細胞が経時間的に増加していくことを報告している (Kobayashi R., et al. JDR 2011)。そこで、炎症歯肉組織に Th17 細胞と同じサイトカインや転写因子を持つ 3 型 ILC が Th17 や Treg 細胞の引き金になる細胞群であることを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 病理組織学的検討

歯周病原性細菌 (10<sup>e9</sup> cfu/100ul/mouse) をマウスの口腔内にピペットにより 14 日間連続接種させ、最終接種から 30 日後に安楽死させたのちに、歯肉組織を含む顎骨をパラフィン包埋して、免疫組織学的評価や、小動物用マイクロ CT 装置により歯槽骨の水平的骨吸収を観察により形態的評価により歯周炎を解析する。

### 2) 免疫学的検討

上記の方法により歯周炎を誘導させたマウスの歯肉組織から単核細胞 (Gingival mononuclear cells; GMCs) を単離し、フローサイトメトリーにより、自然リンパ球 (Innate lymphocyte cells; ILCs) を同定する。

また、ILCs のサブクラスを同定するために産生されるサイトカインを解析することで、歯肉炎症巣に局在する ILCs のサブセットを同定する。

## 4. 研究成果

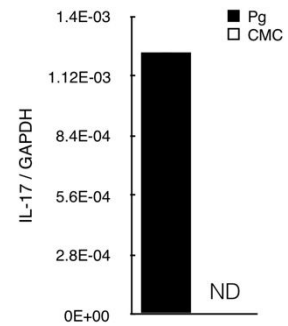
### Innate lymphocyte cells の同定

歯周炎症巣に局在する ILCs を同定するために、申請者らが確立した歯周病モデルマウスを応用して、最終接種から 30 日後に、安楽死させたマウスの歯肉組織から単核細胞 (GMCs) を単離し、抗マウス蛍光標識抗体を用いて ILCs の同定を試みた。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

ILCs を同定する細胞マーカーが多数存在したことから、安定した結果を得るまでに当初の予定よりも研究期間が必要となった。これまでに報告された学術文献から Lineage(neg)/CD45.2(pos)/CD90.2(pos)/IL-7R alpha(pos) により、解析が可能となった。上記の細胞マーカーによりフローサイトメトリーにより歯周炎マウスの歯肉組織と対照群の歯肉組織から単離した GMCs を用いて検討したところ、全 GMC 中の 1~3% の発現を認めたと、対照群との有意な変化を認めるには至らなかった。そこで、ILCs のサブセットによる差異を検討するためにサイトカインの発現をリアルタイム PCR 法により検討した。GMCs から上記の細胞マーカーを用いてセルソーターにより ILCs を単離し、total RNA を抽出した。歯周炎症巣に局在する ILC からは IFN-g、IL-22 の発現は認められなかったが、IL-17 が発現をしていることが示された(図1)。この結果から、歯肉炎症巣に局在する ILCs は 3 型であることが示唆された。

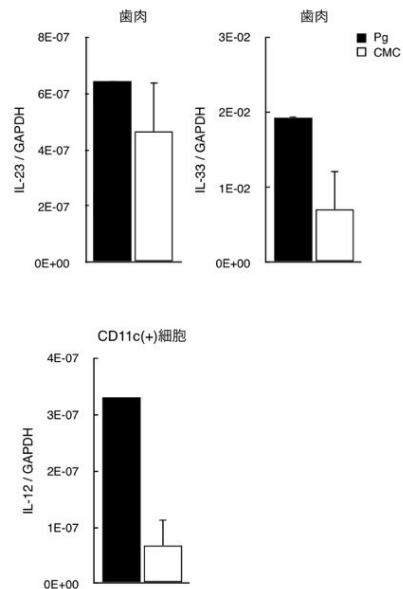
図1. サイトカインの発現



### ILC の誘導

ILC は外来抗原や微生物の侵入により粘膜上皮や免疫細胞から産生されるサイトカイン刺激により分化誘導される。そこで、Pg 菌により惹起された炎症歯肉組織や炎症巣に局在する GMCs から産生されるサイトカインについてリアルタイム PCR 法にて検討を行った。炎症歯肉組織から IL-23 と IL-33 の発現が認められた。また GMCs から抗 CD11c 抗体により単離した CD11c(+)細胞からは IL-12 の発現が認められた(図2)。これらの結果から、I 型や III 型 ILC を誘導するサイトカインの発現が認められた。この結果から、歯肉炎症巣に局在する ILCs は数的な変化は認められないが、サブクラスの変化が認められた。

図2. のサイトカインの発現



以上の結果から歯周病病原性細菌の口腔内接種により惹起された炎症歯肉局所には ILC が誘導されるが対照群に比べて、数的な変化は認められなかった。しかしながら、サイトカインの発現を検討した結果、機能的な分類をすることで 3 型 ILC が優位であることが示された。3 型 ILC は病原性微生物による傷害された上皮の修復や抗菌性ペプチドの産生を誘導することで、病原性微生物の侵入を防ぐことが報告されている (Moro K., Semi Immunopatho 2015)。ILCs の役割は免疫初期応答や獲得免疫機構の誘導など自然免疫系の役割が解明されてきている。歯周組織における ILCs は歯周病原性細菌による炎症誘発の初期応答に関与することが示唆された。しかしながら、サブセットの分化誘導するサイトカインの産生応答には不明な点もあることから、今後もさらなる検討を行うことで歯周疾患の発症への役割を解明する。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

Ryoki Kobayashi, Tomoko Kurita-Ochiai. Lactic acid bacteria regulate Foxp3+ Treg cells for prevent periodontal diseases. **第91回日本細菌学会学術大会** (福岡国際会議場, 福岡市) 平成30年3月27-28日

Ryoki Kobayashi, Tomoko Kurita-Ochiai., Lipid metabolism disorder induces both dysbiosis of Gut microbiota and alveolar bone loss. **第59回歯科基礎医学会学術大会** (松本歯科大学キャンパス, 長野県) 平成29年9月16-18日.

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

小林良喜. 発酵食の摂取による口腔免疫機構への誘導効果. **Joint Workshop of 2nd JST-SICROP and 6th Investigative Commission of Ortho-Organogenesis in OIST 2016** (沖縄科学技術院大学シーサイドハウス, 恩納村) 平成 28 年 12 月 7-9 日.

[ 図書 ] (計 0 件)

[ 産業財産権 ]

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年 :  
国内外の別 :

[ その他 ]

ホームページ等

<http://ryokikobayashi.strikingly.com>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。