

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20694

研究課題名(和文) 歯周組織の免疫応答に対する口腔常在菌の影響の検討

研究課題名(英文) Impact of commensal flora on periodontal immune response to lipopolysaccharide

研究代表者

入江 浩一郎(Irie, Koichiro)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50509594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：常在菌は免疫応答に重要な役割を果たす。本研究では、歯周組織においてリポポリサッカライド(LPS)に対する免疫応答が、常在菌の有無によりどのように異なるのかを解明することとした。無菌であるgerm-free(GF)マウスと常在菌を保有するspecific-pathogen-free(SPF)マウスを用い、LPS塗布前、LPS(10mg/ml)を塗布3時間後、24時間後、および72時間後に、歯周組織を採取した。SPFマウスは、LPS塗布3時間後にCD4T細胞が多くなり、炎症関連因子の発現も上昇した。GFマウスでは、末梢血中および歯周組織上ともに炎症関連因子に大きな変化はなかった。

研究成果の概要(英文)：Commensal flora are involved in the appropriate development of the mature immune system. However, it is unclear how commensal flora contribute to immune responses against lipopolysaccharide (LPS). Experimental groups received topical application of Porphyromonas gingivalis LPS (10 µg/µl) into the palatal gingival sulcus. Sampling was performed before LPS application (baseline) and at 3, 24, or 72 hours after LPS application. SPF mice, but not GF mice, showed an increased number of CD4+ T cells in the periodontal tissue at 3 hours after LPS application, compared with the number at baseline. Expression of genes encoding tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-17A, and IL-10 was also significantly higher in the SPF mice than in the GF mice at 3 hours after LPS application. LPS-exposed SPF mice exhibited increased CD4+ T cell migration and increased expression of inflammatory and anti-inflammatory cytokine genes in periodontal tissue compared to LPS-exposed GF mice.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔常在菌 歯周組織 免疫応答 LPS

1. 研究開始当初の背景

口腔内には、多くの常在菌が共存している。申請者は、germ-free (GF) マウス (無菌マウス) と specific-pathogen-free (SPF) マウス (常在菌保有マウス) との比較研究において、口腔常在菌が歯周組織の免疫応答を向上させることを明らかにした。また、GF マウスと SPF マウスとの顎骨形態の比較から、口腔常在菌は歯槽骨の代謝を促進していることも明らかにした。これらの結果は、口腔常在菌が歯周組織の免疫系を適切に制御することにより、歯周組織の健康維持に貢献していることを示唆している。すなわち、口腔常在菌は歯周病の発症予防に貢献している可能性がある。しかし、歯周病病原菌由来の毒素に対する歯周組織の免疫応答において、口腔常在菌がどのような役割を果たしているのかは不明であった。そこで本研究では、口腔常在菌が歯周病病原菌に対する歯周組織の免疫応答にどのように関わるのかを解明することを目指す。

2. 研究の目的

歯周病病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来の毒素 (リポポリサッカライド、LPS) を GF マウスおよび SPF マウスに投与し、歯周組織の免疫応答を組織学的、生化学的に比較検討することを目的とする。

3. 研究の方法

8週齢の GF 雄性マウスと SPF 雄性マウスに、LPS 塗布前 (ベースライン時) (n=4)、また口蓋側臼歯部に LPS(10mg/ml) を塗布してから 3 時間後 (n=6)、24 時間後 (n=6)、および 72 時間後 (n=6) に、それぞれ歯周組織を採取した。免疫蛍光染色を用いて、歯周組織における CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の発現を評価した。また、リアルタイム PCR 法を用いて、Toll-like receptor (TLR)4、Tumor necrosis factor (TNF)-、Chemokine (C-X-C motif)

ligand 1(CXCL1)、および CXCL2 の mRNA 発現を分析した。さらに、免疫組織化学染色を行い、歯肉接合上皮および結合組織中の多核好中球を計数した。なお、統計分析には Mann-Whitney U 検定と Dunnett t 検定を用いた。

4. 研究成果

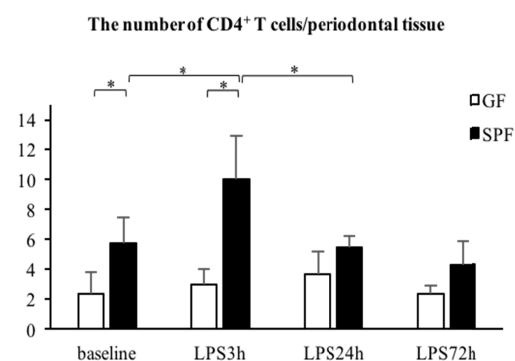
末梢血中において、SPF マウスの CD4 陽性 T 細胞はベースラインと比較して LPS 塗布 3 時間後で有意に減少した (p<0.05)。SPF マウスでは、ベースライン時と比べて、LPS を塗布してから 3 時間後に CD4 陽性 T 細胞数が有意に増加した (p<0.05) (図 1)。また、歯周組織における TNF- および CXCL1 の mRNA は、LPS 塗布 3 時間後に発現のピークを迎えた (図 2)。

一方、GF マウスでは、LPS 塗布前後で、CD4⁺T 細胞数に大きな変化はなかった。CXCL2 の mRNA は、LPS を塗布してから 3 時間後に発現のピークを迎えた。

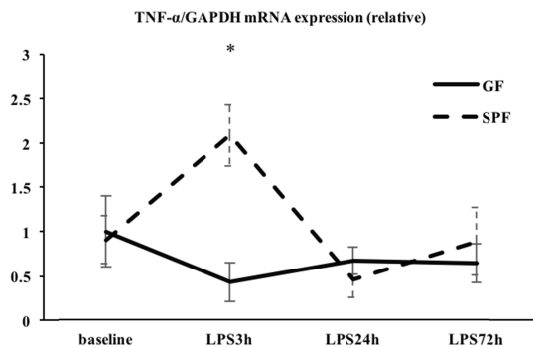
また、LPS 塗布前後のいずれの時点においても、GF マウスの歯肉接合上皮および結合組織中の多核好中球数は、SPF マウスと比べて有意に少なかった (p<0.05)。

SPF マウスは、LPS 塗布 3 時間後に CD4⁺T 細胞数が多くなり、TNF- および CXCL1 の発現も上昇した。一方、GF マウスではこれらの変化が認められなかった。

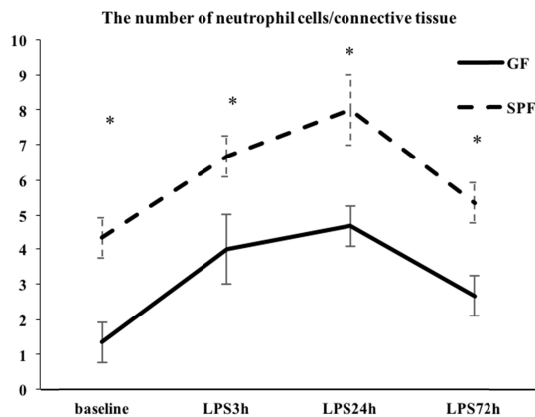
(図 1)



(図 2)



(図 3)



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Fukuhara D, **Irie K**, Uchida Y, Kataoka K, Akiyama K, Ekuni D, Tomofuji T, Morita M. Impact of commensal flora on periodontal immune response to lipopolysaccharide. *Journal of Periodontology*, 査読有, 2018, in press, DOI: 10.1002/JPER.17-0567

Irie K, Tomofuji T, Ekuni D, Fukuhara D, Uchida Y, Kataoka K, Kobayashi S, Kikuchi T, Mitani A, Shimazaki Y, Morita M. Age-related changes of CD4+ T cell migration and cytokine expression in germ-free and SPF mice periodontium. *Archives of Oral Biology*, 査読有, 87, 2018,

72-78, DOI:

10.1016/j.archoralbio.2017.12.007

Greer A, **Irie K**, Hashim A, Leroux BG, Chang AM, Curtis MA, Darveau RP. Site-Specific Neutrophil Migration and CXCL2 Expression in Periodontal Tissue. *Journal of Dental Research*, 査読有, 95, 2016, 946-952, DOI: 10.1177/0022034516641036.

〔学会発表〕(計 8 件)

福原大樹、**入江浩一郎**、内田瑶子、片岡広太、江國大輔、友藤孝明、森田学、LPSを塗布した歯周組織の免疫応答に対する常在菌の影響、第66回 日本口腔衛生学会・総会、2017年6月1日、山形テルサ(山形県山形市)

内田瑶子、**入江浩一郎**、福原大樹、片岡広太、江國大輔、友藤孝明、森田学、常在菌が骨芽細胞に与える影響について、第66回 日本口腔衛生学会、2017年6月1日、山形テルサ(山形県山形市)

Fukuhara D, **Irie K**, Uchida Y, Kataoka K, Ekuni D, Tomofuji T, Morita M, Impact of commensal bacteria on periodontal immune response against lipopolysaccharide, Penn Periodontal Conference 2017, 2017年6月29日, University of Pennsylvania, Philadelphia(USA)

Uchida Y, **Irie K**, Hattori T, Fukuhara D, Kataoka K, Ekuni D, Tomofuji T, Kubota S, Morita M, Commensal flora affects osteoblasts mineralization in mice, Penn Periodontal Conference 2017, 2017年6月29日, University of Pennsylvania, Philadelphia(USA)

内田瑶子、**入江浩一郎**、福原大樹、片岡広太、江國大輔、友藤孝明、森田学、口腔常在

菌が歯槽骨に与える影響について、第65回日本口腔衛生学会・総会、2016年5月28日、東京医科歯科大学（東京都文京区）

福原大樹、入江浩一郎、内田遥子、片岡広太、江國大輔、友藤孝明、森田学、歯周組織の加齢変化におけるCD4+ T細胞の影響、第65回日本口腔衛生学会・総会、2016年5月28日、東京医科歯科大学（東京都文京区）

Daiki Fukuhara, Koichiro Irie, Yoko Uchida, Kota Kataoka, Daisuke Ekuni, Takaaki Tomofuji, Manabu Morita, The impact of oral commensal flora on alveolar bone metabolism in mice, Innate Immunity in Host-Pathogen Interactions, 2016年6月29日, EMBO, Heidelberg(Germany)

Yoko Uchida, Koichiro Irie, Daiki Fukuhara, Kota Kataoka, Daisuke Ekuni, Takaaki Tomofuji, Manabu Morita, Effect of aging on inflammatory response in periodontal tissue, Innate Immunity in Host-Pathogen Interactions, 2016年6月29日, EMBO, Heidelberg(Germany)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

入江 浩一郎 （IRIE, Koichiro）
岡山大学病院・予防歯科・講師
研究者番号：50509594

(4)研究協力者

福原 大樹（Fukuhara Daiki）
内田 遥子（UCHIDA Yoko）