

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11663

研究課題名(和文) 歯周病病態形成における新規抑制性共刺激分子VISTA関与の解明

研究課題名(英文) Role of VISTA in periodontitis

研究代表者

大野 建州 (Ohno, Tatsukuni)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80435635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規抑制性共刺激分子VISTAの歯周病病態形成およびTh2型免疫応答への関与を明らかにするために、LPS誘導性歯周炎モデルまたはOVA誘導性気道炎症モデルへの抗VISTA抗体投与の影響を解析した。抗VISTA抗体投与はLPS歯肉内投与により誘導される歯肉組織中のTNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ 発現を増強させるとともに歯槽骨吸収を増悪させた。OVAチャレンジ時の抗VISTA抗体投与は肺胞洗浄液中のIL-5やIL-13濃度および所属リンパ節中のTh2細胞数を増加させ、肺炎症局所への好酸球浸潤や気道抵抗を増加させた。これらからVISTAは歯周炎やTh2型免疫応答を抑制的に制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、これまでに明らかにされていなかった歯周病病態形成過程の自然免疫応答やアレルギー応答に関与するTh2型免疫応答における共刺激分子VISTAの機能を明らかにすることができた。歯周病病態形成過程においてVISTAは炎症局所の急性炎症とともに慢性炎症によって誘導されると考えられる歯槽骨吸収を抑制的に制御していると考えられた。またTh2型応答であるアレルギー性気道炎症においてもVISTAはその病態を抑制的に制御していると考えられた。VISTAがこれら疾患の病態誘導を抑制的に制御していることから、VISTAを新たな標的分子としたこれら疾患に対する新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：VISTA is a novel immune checkpoint receptor and ligand that regulates T-cell activation. We investigated the functional involvement of VISTA in periodontitis using LPS-induced periodontitis model. Treatment with an anti-VISTA monoclonal antibody (mAb) enhanced the LPS-induced TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression in gingiva and alveolar bone resorption. We also investigated the functional involvement of VISTA in Th2 cell-mediated immune responses using an OVA-induced allergic asthma model. Treatment with the anti-VISTA mAb during allergen challenge, but not sensitization, significantly augmented AHR and BAL fluid eosinophilia. This treatment also increased the production of IL-5 and IL-13 in BAL fluid and the expression of IL-13 by CD4 $^{+}$  T cells in draining lymph nodes. These results suggest that VISTA is involved in the regulation of both LPS-induced immune responses and antigen specific Th2 cell generation, and regulates periodontitis pathology and asthmatic responses, respectively.

研究分野：免疫学 歯学

キーワード：VISTA 抑制性共刺激分子 歯周病 アレルギー性気道炎症 マウスモデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

T細胞免疫応答の進行過程には数々の免疫チェックポイントがあり、自己寛容の破綻や外来抗原に対する過剰な生体防御反応を抑制している。T細胞表面に発現する共刺激分子受容体はT細胞抗原受容体依存的なシグナルを正および負に増幅し、抗原特異的な活性化の強度を調節し免疫応答をコントロールすると同時に、抗原特異的な不応答状態を誘導し、免疫寛容やホメオスタシス維持に重要である。特に、CD28/B7ファミリーに属する抑制性共刺激分子のCTLA-4とPD-1は重要な免疫チェックポイントである。CTLA-4とPD-1と同様にCD28/B7ファミリー分子に属するVISTAは抑制性共刺激分子として2011年に報告された。VISTAはT細胞の他、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞にも発現しており、T細胞依存的な免疫応答を抑制的に制御している。PD-1やCTLA-4と大きく異なるVISTAの特徴として、抗原提示細胞上に抑制性の共刺激分子リガンドとして発現し、T細胞応答を抑制的に制御する機能とT細胞上に発現する抑制性の共刺激分子受容体として発現し、T細胞応答を抑制的に制御する2つの機能を持つことがあげられる。一方で、VISTAがリガンドとして機能する場合も受容体として機能する場合も結合する分子は不明である。疾患におけるVISTAの関与は、腫瘍接種、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、移植片対宿主応答(GVHR)、接触型過敏症皮膚炎(CHS)などマウス疾患モデルを用いてT細胞依存的な免疫応答を抑制的に制御していることが示されており、ヒト疾患でも同様のVISTAの関与が予想されている。一方で、T細胞依存的な免疫応答やT細胞に依存している免疫応答のなかであっても抗寄生虫応答やアレルギー応答の誘導などに重要であるTh2型免疫応答に関するVISTAの関与はほとんど明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

申請者はT細胞非依存的な疾患モデルであるLPS誘導性ショックマウスモデルにおいて申請者が作製した抗VISTA阻害抗体(MIH63)の投与によってマクロファージからのTNF $\alpha$ 産生が増強されるとともに、致死率が増加することを見出し、VISTAがT細胞依存的な免疫応答だけでなくT細胞非依存的な免疫応答も制御していることを報告した。歯周組織における免疫システムは、口腔常在菌を含む病原性微生物や有害外来物質を含む様々な外来抗原の曝露から組織を護り、それらはT細胞依存的な獲得免疫システムとマクロファージや樹状細胞などによって惹起されるT細胞非依存的な自然免疫システムの両方によって担われている。これらは、歯周病原性細菌の排除に有利に働く一方で、過度な免疫応答が誘導された場合には、組織破壊を主徴とする歯周炎を誘導すると考えられる。特に獲得免疫システムにおいてはPD-1がヒト慢性歯周炎における過剰な炎症を抑制している可能性が示唆されている。歯周組織免疫システムにおいて、自然免疫応答と獲得免疫応答を共に抑制的に制御が可能であるVISTAは、これらを効率よく制御し、歯周炎病態誘導過程において、生体に有利に機能している可能性があると考えられる。本研究ではこれまでにほとんど明らかにされていないVISTAのT細胞非依存的な免疫応答およびTh2型免疫応答における役割をそれぞれ、歯周病原性菌*P. gingivalis*由来LPS誘導性歯周炎マウスモデル、OVA(卵白アルブミン)誘導性気道炎症マウスモデルを用いて明らかにする。

### 3. 研究の方法

VISTAのT細胞非依存的な免疫応答における役割の解析では(1)LPS誘導性歯肉炎マウスモデルへの、(2)Th2型免疫応答における役割の解析ではOVA誘導性気道炎症マウスモデルへの抗VISTA抗体の投与効果を評価するとともに、それぞれの疾患モデル誘導において重要であると考えられる各種免疫細胞のVISTA発現を評価した。(1)LPS誘導性歯周炎モデルは、6週齢の野生型BALB/cマウスの下顎第1大臼歯第2大臼歯間の歯肉内へPg-LPS(20ug)を2回/週で3週間行って誘導した。LPS初回投与48時間後に歯周組織へ浸潤している炎症性細胞上のVISTA発現をフローサイトメトリーで解析した。また、各LPSの投与6時間前にコントロール抗体あるいは抗VISTA抗体(MIH63)(200ug)を腹腔内投与した。歯周組織炎症の評価として初回LPSの投与後48時間後に歯肉組織中の炎症性サイトカインTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-33のmRNA発現をリアルタイムPCRで測定した。歯槽骨吸収の評価として初回LPS投与から30日後に下顎第1大臼歯第2大臼歯間の歯槽骨頂とエナメル質セメント質境までの距離を測定し、LPS投与部位と非投与部位間で比較を行った。(2)アレルギー性気道炎症の病態に重要であると考えられるマクロファージ、好酸球、好塩基球、マスト細胞およびTh2細胞上のVISTA発現をフローサイトメトリーで解析した。OVA誘導性気道炎症モデルは、6週齢の野生型BALB/cマウスへ0、14日目にOVA(0.1mg)をAlumとともに腹腔内投与して感作を行い、28、29、30日目にOVA(0.2mg)を経鼻的に吸引させてチャレンジを行い誘導した。抗原感作相のVISTA機能の解析では、各感作時および各感作時から3、6日後に、エフェクター相のVISTA機能の解析では、初回OVAチャレンジ1日前および各OVAチャレンジ時にコントロール抗体あるいはMIH63(200ug)の腹腔内投与を行った。気道炎症の評価は、最終OVAチャレンジから1日後に気道抵抗の測定、肺組織のHE染色およびPAS染色によって行った。

### 4. 研究成果

(1)LPSの歯肉内投与後24時間の歯周組織に浸潤している炎症細胞中にはF4/80+マクロファージやCD11b+Gr1+好中球が存在していた。これら細胞はVISTAを高発現しており、LPSによって誘導される歯周病病態においてVISTAがこれら細胞の活性を制御することによって関与してい

る可能性が示唆された。LPS 歯肉投与前に行った MIH63 投与はコントロール抗体投与と比較して、LPS 投与後 48 時間における歯肉組織中の炎症性サイトカイン TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-33mRNA 発現を増強させた。さらに、MIH63 投与はコントロール抗体投与と比較して、30 日後の歯槽骨吸収を増大させていた (図 1)。抗原提示細胞上あるいは T 細胞上の VISTA がそれぞれの細胞機能を抑制するという過去の報告と、我々が過去に報告した DNFB ハプテン誘導性接触性皮膚炎モデルの病態が MIH63 投与によって増強されるという結果を合わせると、MIH63 は VISTA に対して阻害抗体として機能していると考えられる。したがって、LPS 誘導性歯周炎モデルにおいて MIH63 投与が歯肉炎症局所の炎症性サイトカイン発現と歯槽骨吸収を増大させたことから、歯周炎病態過程における少なくとも Pg-LPS に誘導される自然免疫応答を抑制していることが示唆される。本研究によって得られた結果は、VISTA が T 細胞依存的な免疫応答を負に制御しているというこれまでの報告に、VISTA が TLR を介した自然免疫応答も負に制御しているという新たな知見を加えるものである。さらに歯周病治療において VISTA による自然免疫応答制御を標的とした新たな治療法の開発につながる可能性も考えられる。

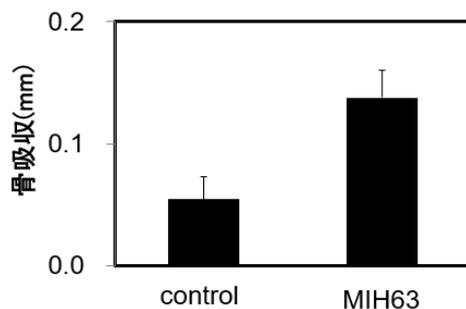


図1 MIH63投与による歯槽骨吸収の増大

(2)アレルギー性気道炎症は主に Th2 型の免疫応答である。このような応答において重要であると考えられる免疫細胞のうち好塩基球やマスト細胞は VISTA を発現していなかった。一方でマクロファージ、好酸球およびナイーブ T 細胞は VISTA を発現していた。しかしながらナイーブ T 細胞を IL-4 存在下に CD3 刺激を加え Th2 細胞に分化させると VISTA の発現は消失した。OVA 誘導性気道炎症モデルを用いた解析では、抗原感作時と抗原チャレンジの MIH63 投与を行い VISTA の機能解析を行った。感作時の MIH63 投与では、感作後の所属リンパ節中の IL-13 陽性 CD4T 細胞の割合を増加させるとともに脾臓細胞による OVA 抗原特異的な IL-5 や IL-13 などの Th2 型サイトカイン産生を増強させ、逆に Th1 型サイトカインである IFN-g 産生を減少させた。しかしながら、抗原感作時の MIH63 投与は抗原チャレンジ後の気道抵抗や肺胞洗浄液中の好酸球浸潤に影響をほとんど与えなかった。一方で、抗原チャレンジ時の MIH63 投与は気道抵抗を増加させるとともに、肺胞洗浄液中の好酸球数を増加させた。さらに肺組織の病理組織的解析では、MIH63 は肺炎症局所への炎症性細胞浸潤を増強させる (図 2) とともに粘液産生を亢進させていた。前述のように MIH63 は阻害抗体として機能することから、OVA 気道炎症モデルにおいて VISTA は感作相とエフェクター相においてともに Th2 型免疫応答を抑制する機能をもっているが、病態誘導においては特にエフェクター相において機能していることが示唆される。また、Th2 細胞が VISTA をほとんど発現していないが、好酸球やマクロファージが VISTA を発現していることから、抗原特異的な気道炎症応答のエフェクター相ではこれら細胞上の VISTA が病態誘導の抑制に機能している可能性が考えられる。本研究によって得られた結果は、VISTA が T 細胞依存的な免疫応答のうち、これまでに報告されている抗腫瘍免疫応答や自己免疫疾患といった Th1 あるいは Th17 型免疫応答に加え、Th2 型免疫応答も抑制的に制御していることを新たに示すものである。

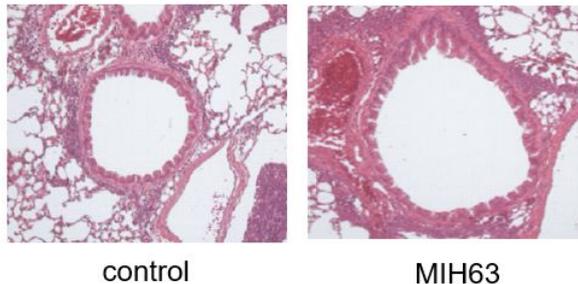


図2 MIH63投与による炎症性細胞浸潤の増強

本研究で得られた結果は、VISTA が自然免疫応答および Th2 型免疫応答においても抑制性共刺激分子として機能し、これら免疫応答が関与する疾患の病態誘導の制御に関与していることとともに、その治療法の新たな標的になりうることを示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kunishige T, aniguchi H, Ohno T, Azuma M, Hori J	4. 巻 60
2. 論文標題 VISTA Is Crucial for Corneal Allograft Survival and Maintenance of Immune Privilege	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 4958-4965
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-27322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohno T, Zhang C, Kondo Y, Kang S, Furusawa E, Tsuchiya K, Miyazaki Y, Azuma M.	4. 巻 30
2. 論文標題 The immune checkpoint molecule VISTA regulates allergen-specific Th2-mediated immune responses.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 3-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxx070.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----