

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11676

研究課題名(和文) 歯周炎における調節性T細胞のシグナル伝達

研究課題名(英文) Regulatory T-cell signaling in periodontitis

研究代表者

大西 智和 (Tomokazu, Ohnishi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：30244247

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)：JNKの特異的脱リン酸化酵素であるDual specific phosphatase 16 (DUSP16) のドミナントネガティブ(dn) をT細胞特異的に発現し、JNKの活性を増強するトランスジェニックマウス(dnDUSP16-Tg)を用い、実験的歯周炎を施したところ、野生型マウスに比べ歯槽骨の吸収が抑制された。また、実験的歯周炎を起こした歯周組織には免疫系を抑制する制御性T細胞(iTreg)の存在が認められた。dnDUSP16-Tgマウスの脾臓リンパ球を解析したところ野生型マウスに比べiTregの割合が多く、TGF- β によって容易にiTregの分化が進むことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯肉炎を含めると歯周病は30歳以上の日本国民の2/3以上が罹患している最も多い成人病の一つである。歯を失う原因として最も多いのが歯周病の一つである歯周炎である。歯周炎は歯周ポケットの歯周菌により誘導された歯肉炎が進行し、過剰な免疫反応が歯槽骨を含む歯周組織の破壊が起こす疾患である。よって、その免疫を制御する制御性Tリンパ球への分化と歯周炎の進行の指標である歯槽骨吸収の関係性を探ることは有意義なことである。特に本研究では制御性Tリンパ球への分化をシグナル分子であるJNKの脱リン酸化酵素が歯槽骨破壊と関連することを示した。

研究成果の概要(英文)：We generated transgenic mice (dnDUSP16-Tg) that express the dominant negative (dn) of Dual specific phosphatase 16 (DUSP16), a specific dephosphatase of JNK, in a T cell-specific manner to increase the activity of JNK. dnDUSP16-Tg was subjected to experimental periodontitis, and the loss of alveolar bone was suppressed compared to wild-type mice. In addition, the presence of regulatory T cells (iTreg), which suppress the immune system, was found in periodontal tissues with periodontitis. Analysis of spleen lymphocytes from these mice showed that the ratio of iTreg was higher than that of wild-type mice, and TGF- β facilitated the differentiation of iTreg.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯周炎 FOXP3 JNK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周ポケットに損じする歯周菌により誘導された歯肉炎が進行し慢性化によって免疫応答が過剰になると歯槽骨を含む歯周組織の破壊が進み歯周炎に至る。歯肉炎から歯周炎へ移行する免疫応答のトリガーの一つとして、ブレーキ役である誘導型制御性T細胞(iTreg)の分化阻害により免疫反応の抑制が外れてしまうことが考えられる。iTregは免疫抑制性サイトカインであるTGF- β やIL-10を分泌し、Th1やマクロファージなどからの炎症性サイトカインの分泌を抑制する。これらの炎症性サイトカインは直接または骨芽細胞などが発現するreceptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)を介し破骨細胞を活性化する。RANKLを発現するTh1細胞と強い炎症誘導能を持つTh17の役割が注目されたが、歯肉溝滲出液中のIFN- γ の濃度は歯周炎の進行と逆相関すること、IL-17が実験的歯周炎の進行に抑制的に働くなどの報告から定説が得られていない。逆に注目されるのがiTregの役割であり、iTreg分化阻害による過度の免疫応答が歯周炎の発症に関わる可能性が指摘されている。実際に臨床的にも、iTreg細胞由来のIL-10の減少が歯周炎の重症度と関係することが報告されている。また近年、Th1, Th2, Th17そしてiTreg以外にもケラチノサイトのバリア機能を増強するTh22細胞の減少が歯周炎の病態と関連するとの報告もあるが、詳細は不明である。よって、本研究では歯周炎を制御するTh細胞としてiTregに注目した。

2. 研究の目的

ヘルパーT細胞分化には様々な情報伝達分子の関与が知られているが、JNK等のキナーゼ活性に注目した。その理由は、TGF- β などによる制御性T細胞(Treg)分化誘導には、古典的なSmad2/3によるシグナルの他にJNKを介する経路が必須であり、リン酸化によって活性化されたJNKがiTregのマスター制御因子あるFoxP3を介してiTreg分化を誘導することが報告されているからである。Dual Specificity Phosphatase 16(DUSP16)は、脱リン酸化によって特異的にJNKを不活化する[1]。点変異導入によって酵素活性を欠失させたドミナントネガティブ(dn)型DUSP16をT細胞特異的に発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作成したところ、T細胞特異的にJNK活性が亢進した[2]。本研究ではこのマウスを用いDUSP16が関わるiTregの分化と歯周炎の進行の関係性を探った。

3. 研究の方法

(1) 実験的歯周炎の誘導:

5週齢のマウスに麻酔を行い、上顎第一臼歯を0.2mmのステンレスワイヤーを用い結紮を行うことで、歯周ポケットが人工的に形成され口腔内細菌がプラークを形成することで歯周炎が惹起される。明らかな歯槽骨の吸収が認められるのは5日後からである。歯槽骨吸収はマイクロCT(Skyscan, Bruker)にて解析した。

(2) 免疫組織染色

マウス上顎を24時間浸漬によるホルマリン固定し、EDTAにて1週間脱灰後、パラフィン包埋を行う。脱パラフィンを行った後、抗マウスFOXP3抗体や抗マウスオステオポンチン抗体にて反応後、3'-Diaminobenzidineにて染色を行い、ヘマトキシリンに手カウンター染色を行う。

(3) FACS解析:

安楽死後のマウスより脾臓および胸腺を採取し、それぞれ脾細胞および胸腺細胞を採取する。

抗 FOXP3 抗体および抗 CD4 抗体にて蛍光染色した後、CyAn ADP analyzer (Beckman Coulter)にて FACS 分析を行う。Flowing Software 2 にてデータ解析を行う。

(4) 脾細胞及び胸腺細胞培養実験 :

C57BL/6 マウスおよび dnDUSP16 マウスより胸腺細胞及び脾細胞を採取する。1.0 x 10⁷ 細胞/ml の濃度で 10%FCS を含んだ RPMI 1640 培地に培養し、TGF- β や IL-2 にて刺激を 2 時間から 24 時間行い、total RNA を調製する。cDNA に逆転写後、遺伝子の発現をリアルタイム PCR にて計測する。それぞれの値は Rpl13a の mRNA を用いて標準化する。

4 . 研究成果

(1) 歯周リンパ球 DUSP16 不活化による歯槽骨吸収抑制

まず、T 細胞特異的 dnDUSP16-Tg マウスを用い上顎第一臼歯に実験的歯周炎を誘導した。1 週間後、上顎骨をマイクロCTにて解析すると、野生型マウスに比べて結紮を施した第一臼歯周囲の歯槽骨吸収が著しく減弱していた。そして、その上顎を 0.5M EDTA 脱灰・3%ホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、iTreg 細胞のマーカーで有り特異的転写因子である FOXP3 を検出するため、抗 FOXP3 抗体を用い免疫組織化学的に染色を行った。その結果、dnDUSP16-Tg マウスに実験的歯周炎を誘導した歯周組織にて陽性細胞の存在を認めた。このことは、dnDUSP16-Tg マウスの実験的歯周炎を伴った歯周組織における iTreg 細胞の存在を示唆するものである。

(2) DUSP16 不活化による iTreg 分化促進

次に、1 次リンパ組織である胸腺のリンパ球と、2 次リンパ組織である脾臓のリンパ球において、DUSP16 ドミナントネガティブによる DUSP16 の不活化がどのように iTreg の分化に影響を与えるか確かめた。それぞれのリンパ球を採取し、Foxp3 の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。脾臓のリンパ節におけるリンパ球は iTreg 細胞のマーカーである Foxp3 mRNA 発現は dnDUSP16-Tg マウスでは野生型に比べて 2 倍近く増加していた。しかし、胸腺においては殆ど変化がなかった。また、Th17 細胞に特異的に発現する転写因子である ROR γ t の mRNA の発現を調べたところ脾臓のリンパ球においても変化はなかった。さらに免疫の抑制に働く Programmed cell death-1 (PD-1)や cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4)についてもそれら mRNA の発現を調べたところ、CTLA4 については殆ど差がなかったが、PD-1 については逆に抑制されていることが認められた。よって、T 細胞特異的 dnDUSP16-Tg マウスにおける実験的歯周炎による歯槽骨吸収抑制は iTreg 細胞の増加が要因の一つであることが考えられる。

そこで、胸腺細胞及び脾臓細胞の iTreg の細胞の分布を、FACS を用いて調べた。野生型マウス及び dnDUSP16-Tg マウスから胸腺細胞と脾臓細胞を採取し、ホルマリン固定後界面活性剤処理を行い、蛍光ラベルされた抗 CD-4 抗体と抗 FOXP3 抗体を用い染色した。FACS にて分析を行った後、リンパ球画分のみ解析を行った。その結果、胸腺細胞においては殆ど差がなかったが、dnDUSP16-Tg マウスからの脾臓細胞では CD4⁺, FOXP3 の iTreg に相当する細胞が約 2.5 倍の上昇が認められた。この結果はリアルタイム RT-PCR による mRNA 発現の結果と一致するものである。

(3) DUSP16 不活化による TGF- β 刺激誘導 iTreg 分化能増強

DUSP16 のドミナントネガティブが TGF- β 刺激による iTreg 分化にどのように影響を与えるか調べるため、未分化の T 細胞が多いと考えられる胸腺のリンパ球に TGF- β 刺激を行った。その結果、dnDUSP16-Tg マウスからの胸腺細胞では 2 ng/ml の TGF- β においてさえ Foxp3 の発現増強が認められた。しかし、野生型では 20 ng/ml の刺激によってわずかであるが発現増強が認められた。

以上の DUSP16 不活化による TGF- β 刺激誘導 iTreg 分化能増強を、さらに FACS において確認を行った。胸腺リンパ球に 2 ng/ml TGF- β にて刺激を 12 時間行った。その結果、dnDUSP16-Tg マウスからの胸腺細胞では TGF- β によって FOXP3+, CD4+ の iTreg 細胞画分の割合が増加した。また、JNK の特異的阻害剤である SP600125 による阻害が認められた。この結果は、dnDUSP16 によって活性が増強された JNK を JNK 特異的阻害剤が抑制により、FOXP3+, CD4+ の iTreg 細胞画分の割合増加が抑制されたことを示している。

(4) DUSP16 不活化による TGF- β 刺激誘導免疫抑制系のサイトカイン分泌刺激

iTreg 細胞は IL10 IL-35 TGF- β という免疫抑作用のあるサイトカインを分泌しヘルパー T 細胞に対し抑制作用を示す。そこで、DUSP16 のドミナントネガティブが TGF- β 刺激によるこれらのサイトカインの分泌にどのように影響を与えるか調べた。因みに、IL-35 は IL-12A と Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI-3) の複合体であるのでそれぞれの発現を調べた。その結果、dnDUSP16-Tg マウスの供せ員細胞では EBI-3 mRNA の発現がリアルタイム RT-PCR 解析によって増強されることが判明したが、野生型マウスにおいては認められなかった。よって、DUSP16 不活化による TGF- β 刺激誘導免疫抑制系のサイトカインは IL-35 において認められた。

結論

申請者らが作成した dnDUSP16-Tg マウスでは、iTreg 分化を促進する JNK シグナルが活性化しているため、このマウスにおける歯周炎モデル実験の結果は iTreg の分化亢進により過剰な免疫反応が抑制されたことによる可能性がある。そこで、本研究では iTreg 分化促進が DUSP16DN-Tg マウスにおける実験的歯周炎の抑制の原因であり DUSP16DN-Tg マウスにおける iTreg の分泌する免疫抑制系のサイトカインの発現の亢進がその原因になり得ることが示された。

参考文献

1. Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Johnson, T. R., Kraft, A. S. & Yoshikai, Y. (2001) A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase is an important negative regulator of lipopolysaccharide-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in mouse macrophage cell lines, *Mol Cell Biol.* **21**, 6999-7009.
2. Musikachoen, T., Bandow, K., Kakimoto, K., Kusuyama, J., Onishi, T., Yoshikai, Y. & Matsuguchi, T. (2011) Functional involvement of dual specificity phosphatase 16 (DUSP16), a c-Jun N-terminal kinase-specific phosphatase, in the regulation of T helper cell differentiation, *J Biol Chem.* **286**, 24896-905.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kusuyama J, Nakamura T, Ohnishi T, Albertson BG, Ebe Y, Eiraku N, Noguchi K, Matsuguchi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Low-intensity pulsed ultrasound promotes bone morphogenic protein 9-induced osteogenesis and suppresses inhibitory effects of inflammatory cytokines on cellular responses via Rho-associated kinase 1 in human periodontal ligament fibroblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.28727	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 Kusuyama J, Amir MS, Albertson BG, Bandow K, Ohnishi T, Nakamura T, Noguchi K, Shima K, Semba I, Matsuguchi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 JNK inactivation suppresses osteogenic differentiation, but robustly induces osteopontin expression in osteoblasts through the induction of inhibitor of DNA binding 4 (Id4).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201802465R	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 Kusuyama J, Ohnishi T, Bandow K, Amir MS, Shima K, Semba I, Matsuguchi T.	4. 巻 474
2. 論文標題 Constitutive activation of p46JNK2 is indispensable for C/EBP induction in the initial stage of adipogenic differentiation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 3421-3437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20170332	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 Kusuyama J, Kamisono A, ChangHwan S, Amir MS, Bandow K, Eiraku N, Ohnishi T, Matsuguchi T.	4. 巻 233
2. 論文標題 Spleen tyrosine kinase influences the early stages of multilineage differentiation of bone marrow stromal cell lines by regulating phospholipase C gamma activities.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 2549-2559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.26130	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 Kusuyama J, Nakamura T, Ohnishi T, Eiraku N, Noguchi K, Matsuguchi T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Promotes BMP9-Induced Osteogenesis and Suppresses Inflammatory Responses in Human Periodontal Ligament-Derived Stem Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Trauma	6. 最初と最後の頁 S4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/01.bot.0000520897.92470.70.	査読の有無 無
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 Kusuyama J, Bandow K, Ohnishi T, Hisadome M, Shima K, Semba I, Matsuguchi T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Osteopontin inhibits osteoblast responsiveness through the down-regulation of focal adhesion kinase mediated by the induction of low-molecular weight protein tyrosine phosphatase.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1326-1336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E16-10-0716	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tomokazu Ohnishi, Norika Chiba, Nahoko Eiraku, Amir Subhan, Tetsuya Matsuguchi
2. 発表標題 Inhibition of keratinocyte response to interferon-g by ultraviolet-B irradiation is mediated through ER-stress
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomokazu Ohnishi, Joji Kusuyama, Nahoko Eiraku, Muhammad Subhan Amir, Tetsuya Matsuguchi
2. 発表標題 Inhibition of glycolysis disturbs ubiquitin-proteasome system in primary osteoblasts
3. 学会等名 日本生化学会 日本分子生物学会 合同大会
4. 発表年 2017年

〔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
研究分担者	松口 徹也 (Matsuguchi tetsuya) (10303629)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	
研究分担者	柿元 協子 (Kyoko Kakimoto) (40274849)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	
研究分担者	楠山 譲二 (Joji Kusuyama) (70596105)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	