

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390461

研究課題名 (和文) 新たなヘルパー T 細胞による口腔免疫調節機構と病態発現機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation of oral immunity and oral manifestation by a novel helper T cell subset.

研究代表者

菅原 俊二 (SUGAWARA SHUNJI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：10241639

研究成果の概要:本研究は、インターロイキン(IL)-17を産生する新たなヘルパーT細胞(Th17)による口腔免疫調節機構を解明することを目的とし、口腔乾燥を主症状とするシェーグレン症候群(SS)をモデル疾患として研究を行った。その結果、SSの小唾液腺組織ではIL-18が腺房上皮細胞に、IL-17が主に浸潤CD4陽性T細胞および導管上皮細胞に発現していた。また、IL-18はIL-17による唾液腺上皮細胞株からの炎症性サイトカインの産生を相乗的に促進し、Th17が口腔疾患の病態発現に重要な役割を果たしていることを示唆する研究成果が得られた。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学、口腔免疫学

1. 研究開始当初の背景

これまで、未分化のCD4⁺T細胞は抗原提示細胞により抗原刺激を受けた後、1型ヘルパーT細胞(Th1)あるいは2型ヘルパーT細胞(Th2)に分化して、免疫応答をコントロールするとされてきた。インターフェロン-γ(IFN-γ)を産生するTh1は細胞性免疫を、インターロイキン(IL)-4などを産生するTh2は体液性免疫を、それぞれ調節する。Th1への分化には転写因子T-betやSTAT-4の発現がキーとなり、Th2への分化には転写因子GATA-3やSTAT-6の発現がキーとなる。また、

免疫応答を負に抑制するCD4⁺CD25⁺制御性T細胞(Treg)の重要性も注目されている。Tregの分化には転写因子Foxp3が必須である。免疫応答や疾患において、Th1/Th2とTregによる免疫応答調節についての理論は定着したかにみえたが、現状では自己免疫・炎症性疾患などの病態発現を十分に説明できる理論を構築できないジレンマもあった。

2005年末より、IL-17を産生するCD4⁺T細胞はTh1やTh2とは異なる経路でCD4⁺T細胞から分化するとの報告が相次ぎ、新たなThサブセット(Th17)として確立された(Nature

441:166-168, 2006)。Th17の分化には転写因子STAT-3が関与する(Nature Rev Immunol. 6: 329-333, 2006)。また、Th1はIL-12により、Th2はIL-4により分化誘導されるが、Th17の分化にはIL-1、IL-6、TGF- β 2とIL-23が必須である(Nature Immunol. 7:557-559, 2006; J Exp Med. 1685-1691, 2006)。

Th17が産生するIL-17(IL-17Aともいわれる)は、IL-17AからIL-17Eという6つのメンバーから構成されるIL-17ファミリーの一つであり、主としてCD4⁺T細胞から産生される。IL-17受容体(IL-17R)はさまざまな組織に広く発現し、Th17から産生されたIL-17の刺激により細胞内の転写因子NF- κ BやTRAF6依存性のMAPKの活性化を介してさまざまな炎症性サイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼなどを産生し、病態発現に関与するが(Immunity 21:467-476, 2004)、不明な点も多い。

口腔粘膜や唾液腺の疾患の多くはT細胞の浸潤が特徴的である。その病態の発現にはTh1やTh2の関与が議論されている。しかしながら、現在でも必ずしも明確な答えが出せないのが状況である。これには、Th17の視点がなかったことが考えられる。

一方でわれわれは、ケラチン5(K5)プロモーター遺伝子とマウスIL-18遺伝子を導入したマウス(K5/IL-18Tgマウス)には生後6ヶ月前後から、唾液腺、涙腺、胸腺の腫脹、組織学的には重度のリンパ球浸潤が観察され、シェーグレン症候群患者の組織像と酷似していることを見出した。そのメカニズムを知るために、この唾液腺の遺伝子(mRNA)発現をマイクロアレイで解析した結果、野生型マウスの唾液腺と比較して、IL-17 mRNA発現が顕著に亢進するとの知見を得ている。

2. 研究の目的

このような学術的背景から、応募者は“口腔粘膜や唾液腺におけるIL-18の過剰発現は直接または間接的にTh17を誘導し、病態発現に関与している”との作業仮説を立てた。

本研究は、この仮説を実証することを目的に遂行した。

3. 研究の方法

(1) ヒトでの解析

臨床検体の採取と解析は、東北大学大学院歯学研究科研究倫理専門委員会の承認を得て行った。

① 臨床検体の採取

東北大学病院を受診した一次性SS患者(n = 10)、乾燥症候群患者(n = 10)および慢

性移植片対宿主病患者(GVHD, n = 10)と健康ボランティア(n = 3)から口頭と文書でインフォームドコンセントを得て、口唇腺を採取した。SS患者は厚生労働省の診断基準により確定診断した。

② 免疫組織化学染色

採取した臨床検体から凍結切片を作製し、抗ヒトIL-18モノクローナル抗体(mAb)25-2G(マウスIgG1; Medical & Biological Laboratories)、ウサギ抗ヒトIL-17ポリクローナル抗体(SANTA CRUZ Biotechnology)、ヤギ抗ヒトIL-17ポリクローナル抗体、抗ヒトIFN- γ mAb(マウスIgG2a; R&D Systems)、抗ヒトCD4 mAb SK3(マウスIgG1)、抗ヒトCD8 mAb SK1(マウスIgG1; BD Biosciences)で染色した。

③ 唾液腺細胞株

ヒト耳下腺細胞株(HSY)とヒト唾液腺腺房細胞株(AZA3)を使用した。

④ その他

抗ヒトIL-18 mAb/25-2Gを用いたウェスタンブロット、RT-PCR、フローサイトメトリー、サイトカイン定量のためのELISAなどを行った。

(2) マウスでの解析

マウス実験は、東北大学環境・安全委員会遺伝子組換え実験安全専門委員会と同動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

① マウス

C57BL/6マウス(野生型マウス)は東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設より入手した。K5/IL-18 Tgマウス(C57BL/6バックグラウンド)は星野友昭博士(久留米大学医学部)より、IL-17遺伝子欠損(KO)マウスは岩倉洋一郎教授(東京大学医科学研究所)より供与された。いずれのマウスも、実験期間中、室温24°C、規則的な明暗サイクルのもとで飼育し、マウス用飼料と水は自由に摂取させた。

② 組織染色

マウスより唾液腺(顎下腺および舌下腺)、胸腺、肝臓、肺、腎臓を摘出し、通法に従い10%中性緩衝ホルマリン液に24時間浸透固定した。アルコール脱水の後、キシレンを経由してパラフィン包埋し、その後3 μ mの薄切標本を作製した。各標本をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色し、組織学的解析を行った。

③ その他

血清中の自己抗体やサイトカインの定量はELISA法により行った。

4. 研究成果

(1) SSはTh17病である

SSは、口腔および眼の乾燥を主症状とする自己免疫疾患であり、唾液腺組織では導管周囲への著明なリンパ球浸潤と組織全体の破壊を特徴とするが、病態発現機序の詳細は不明である。SSの小唾液腺組織ではIL-18が腺房上皮細胞に、IL-17が主に浸潤細胞および導管上皮細胞に発現していた(図1)。健常者および免疫抑制剤投与下にある慢性GVHD患者の小唾液腺には検出されなかった(図3、JとK)。さらに、ウェスタンブロット解析によりSSの小唾液腺には活性型(18 kDa)と前駆体(24 kDa)のIL-18が発現していることが明らかとなった。

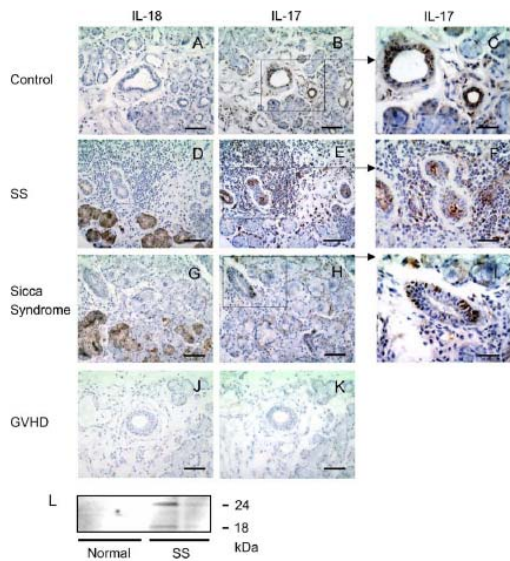


図1 SS患者の唾液腺でのIL-18とIL-17の発現

次に、唾液腺浸潤リンパ球のIL-17発現を検討した結果、多数浸潤しているCD4⁺T細胞の多くはIL-17を発現しており、数は少ないがCD8⁺T細胞もIL-17を発現していた(図2)。一方、浸潤T細胞のIFN- γ 発現は弱いものであった。

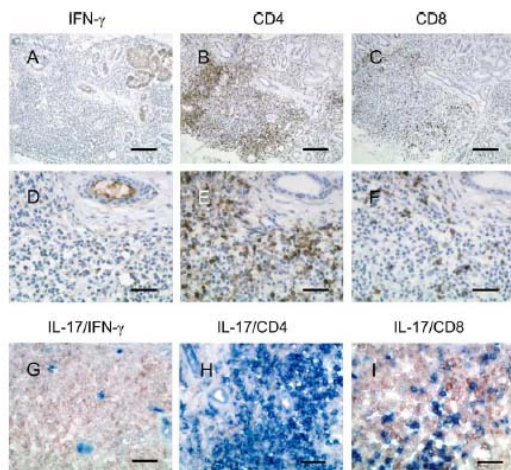


図2 SS浸潤T細胞のIL-17発現

唾液腺上皮細胞株HSYはIL-18RとIL-17Rを細胞膜上に恒常的に発現しており、IL-18はIL-17によるHSYからのIL-6とIL-8の産生を相乗的に促進した(図3)。

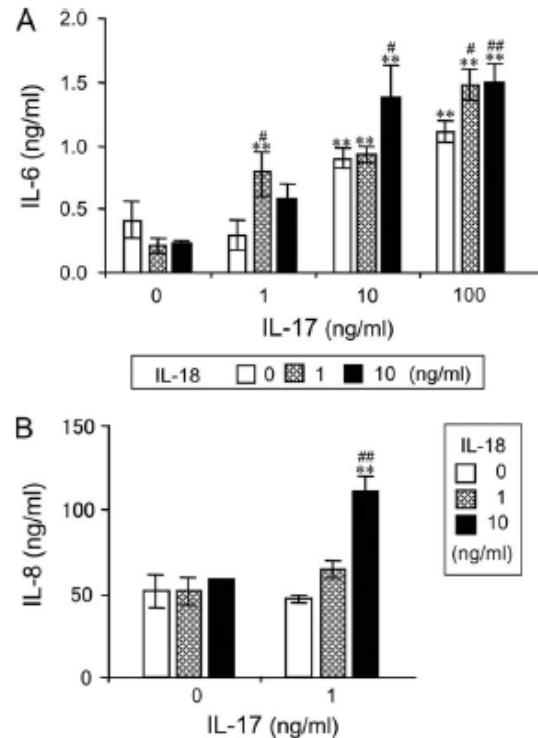


図3 炎症性メディエーター産生におけるIL-17とIL-18の相乗効果

これらの結果は、IL-18およびTh17が産生するIL-17が相乗的になどの炎症性メディエーターの産生を誘導し、SSの唾液腺の病態の発現・進行に重要な役割をしていることを示唆する。

(2) マウスでの解析

ケラチン5 (K5) プロモーターによりマウスIL-18を過剰発現するK5/IL-18トランスジェニックマウスは加齢に伴い唾液腺と顎下リンパ節の腫脹、脾臓と胸腺の肥大が認められた。肺、肝臓、腎臓にも組織変性とリンパ球浸潤が認められ、さらに、SSAやSSBなどの血清中の自己抗体が加齢に伴い上昇することから、本マウスはヒトSSと酷似した病態を呈することが明らかとなった。

唾液腺にはCD4陽性T細胞などのリンパ球浸潤が見られ、本マウスの脾細胞をT細胞刺激物質で刺激すると顕著なIL-17産生の亢進がみられ、Th17の関与が示唆された。さらに生後に抗CD25抗体を投与することにより制御性T細胞を生体内から除去すると、発症が

促進されることが判明した。

さらに、本マウスに *Propionibacterium acnes* 加熱死菌を腹腔内投与すると血中 IL-18 濃度に加え、唾液腺、口腔組織や胸腺内での IL-18 濃度が野生型マウスと比較して約 10 倍以上になることを見出した。これに伴い、唾液流出量の減少など SS 様病態の発症が早まることを明らかにした。この結果は、局所での IL-18 過剰産生と自己免疫疾患発症との強い因果関係があることを強く示唆する。

K5/IL-18 Tg マウスと IL-17 KO マウスを交配させ、K5/IL-18 Tg-IL-17 KO マウスを作成し、SS 様病態の発症を検討した。その結果、本ダブル遺伝子改変マウスは K5/IL-18 Tg マウスと比較して、唾液腺へのリンパ球浸潤の減少、唾液腺組織破壊の軽減などの症状の改善が観察された。この結果は、生体内において Th17 が口腔疾患の病態発現に関与することを示唆する。

われわれが開発した金属アレルギーマウスモデルを用いて、水溶性ビタミンであるピオチンの関与についても検討した。その結果、ピオチン欠乏は IL-1 産生促進により金属アレルギーの悪化を引き起こすことも明らかにした。

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 5 件)

- ① Kuroishi T, Kinbara M, Sato N, Tanaka Y, Nagai Y, Iwakura Y, Endo Y, Sugawara S. Biotin status affects nickel allergy via regulation of interleukin-1 β production in mice. *J. Nutri.* 139: 1031-1036, 2009. 査読有
- ② Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J. Immunol.* 181: 2898-2906, 2008. 査読有
- ③ Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, Sugawara S. Biotin deficiency up-regulates TNF- α production in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 83: 912-920, 2008. 査読有
- ④ Minami T, Kuroishi T, Ozawa A, Shimauchi H, Endo Y, Sugawara S. Histamine amplifies immune response of gingival fibroblasts. *J. Dent. Res.* 86: 1083-1088, 2007. 査読有
- ⑤ Nishioka T, Kuroishi T, Sugawara Y, Yu Z, Sasano T, Endo Y, Sugawara S. Induction of serum IL-18 with *Propionibacterium acnes*

and lipopolysaccharide in phagocytic macrophage-inactivated mice. *J. Leukoc. Biol.* 82: 327-334, 2007. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 菅原俊二. (シンポジウム、免疫制御の科学) 口腔粘膜疾患発症の分子機構とその制御. 第 62 回日本口腔科学会学術集会 (福岡) 2008 年 4 月 17、18 日
- ② Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, Sugawara S. Biotin deficiency up-regulates tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. The 95th Annual Meeting of the American Association of Immunologists, San Diego, USA, 2008 年 4 月 5-9 日
- ③ 佐藤恭子, 黒石智誠, 西岡貴志, 菅原由美子, 星野友昭, 菅原俊二. K5/IL-18 Tg マウスにおける唾液腺浸潤細胞の解析. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (東京) 2007 年 11 月 22 日
- ④ 酒井 梓, 菅原由美子, 黒石智誠, 笹野高嗣, 菅原俊二. シェーグレン症候群病態発現における IL-18 と IL-17 の関与. 第 35 回日本臨床免疫学会総会 (大阪) 2007 年 10 月 19、20 日
- ⑤ 酒井 梓, 菅原由美子, 黒石智誠, 笹野高嗣, 菅原俊二 (口演). IL-18 は IL-17 と共同してシェーグレン症候群患者唾液腺における病態発現に寄与する. 第 16 回日本シェーグレン症候群研究会 (京都) 2007 年 9 月 21 日
- ⑥ 西岡貴志, 黒石智誠, 菅原由美子, 笹野高嗣, 遠藤康男, 菅原俊二. Keratin 5 (K5)/IL-18 トランスジェニックマウスでの唾液腺障害の誘導. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007 年 8 月 31 日
- ⑦ 佐藤恭子, 黒石智誠, 西岡貴志, 菅原由美子, 菅原俊二. IL-18 Tg マウスにおける唾液腺浸潤リンパ球の解析. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007 年 8 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 俊二 (SUGAWARA SHUNJI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：1 0 2 4 1 6 3 9

(2) 研究分担者

黒石 智誠 (KUROISHI TOSHINOBU)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：3 0 4 0 0 2 6 1
菅原 由美子 (SUGAWARA YUMIKO)
東北大学・病院・助教
研究者番号：3 0 2 3 5 8 6 6

(3)連携研究者
なし