

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19036

研究課題名(和文) 歯周炎におけるPD-1/PD-L1機構の関与解明：遺伝子治療の基盤構築を目指して

研究課題名(英文) Elucidation of the involvement of PD-1 / PD-L1 pathway in periodontitis: to build a foundation for gene therapy

研究代表者

今村 健太郎 (Imamura, Kentaro)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60755007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PD-L1のmRNA発現は、Porphyromonas gingivalisを感染させた上皮細胞において上昇していた。IFN- γ の発現は、非感染コントロールと比較して、P. gingivalisを感染させた上皮細胞との共培養で有意に阻害された。絹糸結紮歯周炎モデルでは、破骨細胞様細胞が観察され、Pd-L1のmRNAの発現は、結紮側で増加しました。破骨細胞様細胞の数とCat-KおよびC-fmsのmRNA発現は、PD-L1で処理したRAW 264.7細胞では減少した。PD-L1はT細胞の活性および破骨細胞の分化を調節することで歯周炎の発症に重要な役割を果たしている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント機構と歯周病の関連を明らかにした本研究では、歯周病原細菌の新たな免疫回避システムについての知見が得られた。さらに、歯周病の発症・進行に深く関与している破骨細胞分化への影響も明らかとなった。これらの知見は、歯周病の病態解明のみならず、今後の治療戦略においても貴重な情報が得られたと考えられている。

研究成果の概要(英文)：PD-L1 mRNA expression significantly induced in Ca9-22 cells infected with P. gingivalis compared to non-infected control. IFN- γ secretion was significantly inhibited in co-cultured with Ca9-22 cells infected P. gingivalis compared to non-infected control. In the periodontitis model, osteoclast-like cells were observed and Pd-L1 mRNA expression was significantly increased in the ligated side compared to the control side. The number of osteoclast-like cells and mRNA expression of Cat-K and C-fms was significantly decreased in RAW 264.7 cells treated with RANKL and PD-L1 compared to non-treated control. These results suggest that PD-L1 may play an important role in periodontitis via attenuating T cell activation and osteoclast differentiation.

研究分野：歯周療法学

キーワード：PD-1/PD-L1機構 Porphyromonas gingivalis ヒト歯肉上皮細胞 破骨細胞分化 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

歯周病原細菌は、様々な方法で宿主の免疫応答から逃れ、病原性を発揮する事が知られている。これまで我々は *Porphyromonas gingivalis* が宿主細胞に侵入し、免疫応答を回避するメカニズムについて研究を進めてきた。

近年、がん免疫においてプログラム細胞死-1 (programmed death-1, PD-1) /PD-リガンド-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 経路が、T細胞の機能抑制に重要な役割を果たしている事が注目されている。抗 PD-L1 抗体はがんの治療薬として、現在臨床試験が行われる段階まで研究が進んでいる。歯周病学の分野では、中等度歯周炎患者において PD-L1 の発現が上昇しているという報告はあるが、その詳細なメカニズムに関する基礎研究は行われていない。

2. 研究の目的

本申請研究では、*P. gingivalis* の歯周炎局所における PD-1/PD-L1 発現調整機構への関与を解明し、さらに PD-1/PD-L1 経路遮断による歯周組織破壊への影響を検討する事を目的とする。

3. 研究の方法

マウス実験的歯周炎モデルを用い、歯周炎を惹起させた絹糸結紮周囲の歯肉組織を採取し、PD-L1 の遺伝子発現変化を確認した。in vitro ではヒト歯肉上皮細胞株に *P. gingivalis* を感染させ、PD-L1 遺伝子発現量の変化や T細胞との相互作用を検討した。さらに、PD-L1 の破骨細胞分化に及ぼす影響についても検索を行った。

4. 研究成果

PD-L1のmRNA発現は、コントロールと比較して *P. gingivalis* を感染させた上皮細胞において有意に上昇していた (Fig.1)。

IFN- γ の発現は、非感染コントロールと比較して、*P. gingivalis* を感染

させた上皮細胞との共培養で有意に阻害された (Fig.2)。絹糸結紮歯周炎モデルにおいて、結紮側において破骨細胞様細胞が観察された (Fig 3a)。さらに、結紮

周囲の歯肉組織内のPd-11 の mRNAの発現は、コントロール

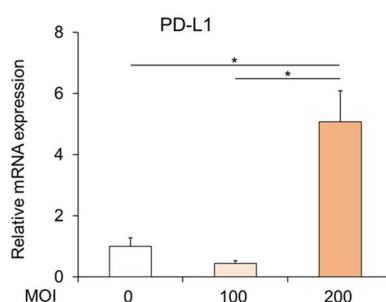


Fig. 1. Ca9-22 cells were cultured with *P. gingivalis*, and the expression of PD-L1 mRNA was assessed by qRT-PCR. * $p < 0.05$.

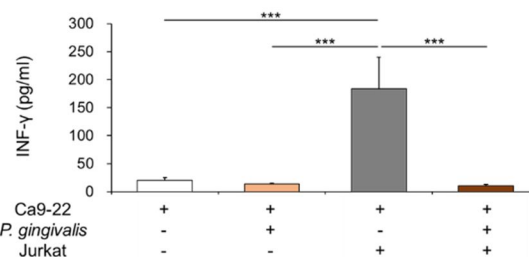


Fig.2. After Jurkat human T lymphocyte cells were infected with/without Ca9-22 cells *P. gingivalis*, the expression of interferon γ (IFN- γ ; as an activation marker of T cells) was measured by ELISA. *** $p < 0.001$.

側と比較し有意に増加していた (Fig 3b)。

in vitro において, RANKL およびPD-L1 (10 μ g/ml)で処理したRAW 264.7細胞における破骨細胞分化マーカー (C-fms) のmRNA発現は、コントロールと比較して有意に増加した(Fig 4)。高濃度では, Cat-K, C-fms共に有意な減少を示した。また, PD-L1 によって処理されたRAW 264.7細胞をTRAP染色し破骨細胞様細胞の観察を行った(Fig 5a)。定量すると10 μ g/ml のPD-L1で増加傾向を示した。

これらの結果より PD-L1はT細胞の活性および破骨細胞の分化を調節することで歯周炎の発症・進行に重要な役割を果たしている可能性が明らかとなった。

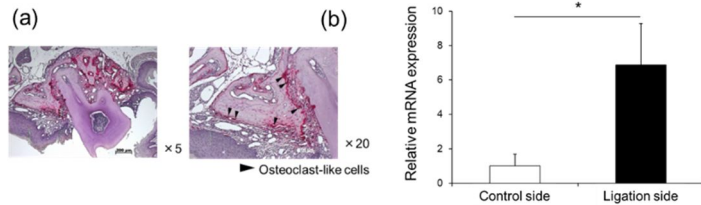


Fig. 3 a. Histological observation of the presence of TRAP-stained sections around the palate. b. The expression of Pd-1 mRNA in the gingival tissue was measured by qRT-PCR. * $p < 0.05$.

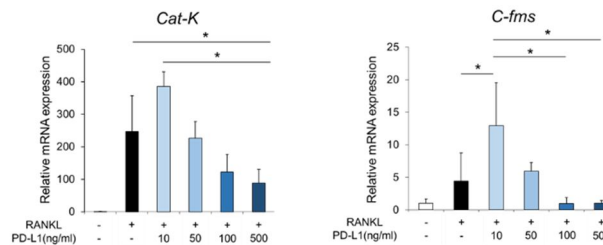


Fig.4. Effects of PD-L1 on osteoclast differentiation markers in RAW 264.7 cells treated with RANKL and various concentrations of PD-L1. a: Cathepsin K Cat-k, b: C-fms: * $p < 0.05$, versus RANKL treated group.

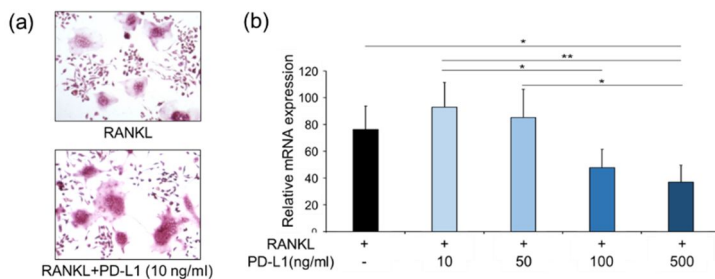


Fig. 5 Evaluation of the presence of osteoclast-like cells in vitro. a: TRAP-staining images of RAW 264.7 cells treated with RANKL and of PD-L1. b: Measurement of the number of osteoclast-like cells per well. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Nakane Saki, Imamura Kentaro, Hisanaga Rio, Ishihara Kazuyuki, Saito Atsushi	4. 巻 56
2. 論文標題 Systemic administration of cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA 4) Ig abrogates alveolar bone resorption in induced periodontitis through inhibition of osteoclast differentiation and activation: An experimental investigation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 972 ~ 981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12909	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今村健太郎
2. 発表標題 歯周炎におけるPD-1/PD-L1機構を介した破骨細胞分化調節の解明をめざして
3. 学会等名 第 310 回東京歯科大学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中根 咲, 今村健太郎, 喜田大智, 齋藤 淳
2. 発表標題 歯周炎による歯槽骨吸収におけるCTLA-4（細胞傷害性Tリンパ球抗原4）の役割および破骨細胞分化調節メカニズムの解明
3. 学会等名 日本歯科保存学会2021年度春季学術大会（第154回）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakane S, Imamura K, Ishihara K, Saito A
2. 発表標題 CTLA-4 reduces bone resorption through the inhibition of osteoclast differentiation.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中根 咲, 今村健太郎, 長野恭輔, 渡辺一夫, 石原和幸, 齋藤 淳
2. 発表標題 歯周炎モデルマウスの歯槽骨吸収におけるCTLA-4 の役割の解明
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------