

機関番号：32665
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21792131
 研究課題名 (和文) 歯周病における酪酸の歯肉線維芽細胞を介した T 細胞機能障害の機序解明
 研究課題名 (英文) Mechanisms of T cell function disorder in periodontal diseases by butyrate and gingival fibroblast
 研究代表者
 山田 潔 (YAMAD KIYOSHI)
 日本大学・歯学部・助教
 研究者番号：30313076

研究成果の概要 (和文)：歯周病原細菌が産生する短鎖脂肪酸である酪酸が歯周病組織内の免疫応答を障害する機構において、歯肉線維芽細胞(GF)に着目した。酪酸に耐性を示す正常 GF が酪酸依存的な T 細胞の細胞死を抑制する一方で、酪酸による細胞死に感受性の高い歯周病患者由来 GF は、T 細胞の酪酸依存的な細胞死をも抑制できない可能性が示唆された。さらに、GF 非依存的な T 細胞に対する酪酸の作用として、ヘルパー T 細胞サブセットごとに異なったサイトカイン産生応答の修飾があることが明らかとなった。これらは、歯周病において歯周組織内免疫応答を障害する歯周病原細菌あるいは酪酸のあらたな作用機序であると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：This study focused on the effect of gingival fibroblasts (GF) on impairment of immune responses in periodontal tissues caused by butyrate secreted from periodontopathic bacteria. It was suggested that GF which was prepared from periodontal diseases patients and sensitive to butyrate-dependent cell death failed to inhibit the butyrate-dependent cell death of T cells. On the contrary, butyrate-resistant healthy GF suppressed the cell death of T cells. Moreover, butyrate modified cytokine production from helper T cell subsets independently of GF. These results may imply additional mechanisms by which periodontopathic bacteria and butyrate impair the immune responses in periodontal tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学、歯肉線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周病原細菌はリポ多糖 (LPS)、線毛、プロテアーゼ、短鎖脂肪酸 (SCFA) といった多様な毒性因子を産生する。SCFA による免疫細胞への為害作用として、申請者が所属

する研究室において、SCFA の一つである酪酸がマウスおよびヒト由来の様々な T 細胞にアポトーシスを誘導することが明らかにされている。また、この酪酸誘導性アポトーシスについては、Fas 非依存的な caspase の活

性化および活性酸素やセラミドの生成を伴うこと、サイトカインや細胞間接着分子を介した歯肉線維芽細胞 (GF) との相互作用によって阻害されることも報告されている。このように、歯周病原細菌が産生する酪酸が T 細胞のアポトーシスを誘導することが歯周病発症に深く関与すること、健全な歯周組織においては酪酸による T 細胞のアポトーシスが GF によって精緻に制御・抑制されていることが示唆されてきた。しかしながら、酪酸存在下での健全者由来 GF (HGF) および歯周病患者由来 GF (PGF) による T 細胞応答制御の違いについては不明である。実際に、HGF と PGF においては遺伝子の発現パターンが大きく異なることも当研究室において明らかにされており、GF の機能変化が歯周病発症に深く関与している可能性が考えられる。一方で、腸管粘膜においては常在菌が産生する酪酸は抗炎症的に働くことも報告されており、APC の一つである樹状細胞の分化あるいは機能を酪酸が修飾することによって、T 細胞の応答が制御されている可能性が考えられている。しかしながら、歯周病発症における APC の関与については、不明な点が多い。申請者はこれまでの研究で、マウス腸管粘膜に局在する多様な免疫細胞を用いて、抗原あるいは菌体成分に対する免疫応答について *in vitro*、*in vivo* 両方の側面から研究を行ってきた。これらの研究の経緯から、上記の未解明の問題に対するアプローチが可能であると考えるに至った。

2. 研究の目的

歯周病原細菌が産生する短鎖脂肪酸 (SCFA) の一つである酪酸が歯周病組織内で免疫応答をどのように変調し、発症に関与するかは不明な点が多い。本研究では歯肉線維芽細胞 (GF) に着目し、GF の酪酸に対する応答異常が T 細胞応答を直接的あるいは間接的に障害することによって、T 細胞応答の制御が修飾される可能性について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯周病原菌株は 5% ウシ血清・ヘミン・メナジオン添加 BHI 培地で 48 時間嫌気培養し、培養上清を回収した。菌培養上清中の各 SCFA 量はガスクロマトグラフにて測定した。ヒト細胞は RPMI 培地または DMEM 培地を

用いて培養した。マウスヘルパー T 細胞 (Th) は、BALB/c マウスの脾臓由来 CD4 T 細胞を各分化誘導の至適条件下で培養することにより得た。回収した Th を抗 CD3 抗体で 24 時間刺激培養後、酪酸ナトリウム (SB) 存在下で、さらに 24-48 時間培養した。SB または菌培養上清添加後の細胞生存率は MTS 法により、アポトーシスは DNA 断片化を指標として解析した。

(2) HGF 株および PGF 株を SB 存在下で、24 時間培養した。培養後、位相差顕微鏡像を撮影した。細胞を溶解し、細胞質内の断片化した DNA を抽出後、アガロース電気泳動を行った。また、細胞質内の断片化 DNA 量と全 DNA 量の比から DNA 断片化率を算出した。フィブロネクチン発現はフローサイトメトリーにより、サイトカイン発現はリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

Jurkat T 細胞は SB 存在下で、14 時間培養した。洗浄後、コンフルエントになるように培養していた GF 株とともに、SB 非存在下でさらに 10 時間培養した。培養後、浮遊している T 細胞を回収した。さらに培地を添加し、緩やかにピペッティングすることにより、付着している T 細胞を回収した。回収した細胞数を計数し、付着率を算出した。また、SYTOX Green で染色後フローサイトメトリーにより、回収した T 細胞における死細胞数を算定した。

(3) Th1、Th2 および Th17 は、BALB/c マウスの脾臓由来 CD4 T 細胞を各分化誘導の至適条件下で培養することにより得た。回収した Th を抗 CD3 抗体で再刺激し、SB 存在下にて、各時間培養した。培養後、MTS 試験により細胞活性を、DPA 試験によりアポトーシス依存的な DNA 断片化を、ELISA 法により上清中のサイトカイン量を解析した。また、Annexin V による死細胞染色と細胞内サイトカイン染色を行い、フローサイトメトリーにより測定した。

4. 研究成果

(1) 免疫担当細胞における酪酸依存的な細胞死の解析

ヒト Jurkat T 細胞を異なる濃度の酪酸ナトリウム存在下で 24 時間培養した結果、酪酸濃度依存的な細胞生存率の低下、アポトーシスに伴う染色体 DNA の断片化が認められた。この酪酸依存的な細胞死は、抗原提示細

胞として機能する単球/マクロファージのヒト細胞株でも同様に認められた。また、酪酸を産生する歯周病原性嫌気性菌の培養上清を添加しても、細胞死が同様に誘導された。マウス脾臓 T 細胞由来のヘルパー T 細胞 (Th1、Th2) に対しても、酪酸は細胞死とサイトカイン産生抑制を誘導した。一方で、正常 GF 株や口腔上皮細胞株では、酪酸による細胞死誘導は顕著には認められなかった。これらの結果から、T 細胞および抗原提示細胞となるマクロファージは酪酸により直接的な傷害を受けるが、正常 GF では顕著な細胞死は誘導されないことが示唆された。

(2) 線維芽細胞における酪酸感受性と免疫応答の修飾

健常者 (HGF 株) あるいは歯周病患者 (PGF 株) から単離された GF 株では、酪酸による細胞死に違いがあることが報告されている。そこで、酪酸による細胞死に感受性が高い PGF 株と、低感受性の HGF 株を酪酸で刺激し、遺伝子発現の変化を比較した。その結果、線維芽細胞増殖因子 (FGF) とその受容体 (FGFR) のいくつかの遺伝子において、HGF 株と PGF 株で、恒常的な発現量あるいは酪酸依存的な発現量変化に違いがあることが明らかとなった。これらのサイトカインおよび受容体遺伝子の発現異常が、HGF/PGF の酪酸に対する応答性や免疫応答に及ぼす作用の違いに関与する可能性が考えられた。

Jurkat T 細胞の酪酸依存的な細胞死は HGF 株との付着によって抑制されるが、酪酸感受性の高い PGF 株では抑制されることが示唆された。また、PGF では HGF に比べて、酪酸処理 Jurkat T 細胞の付着率が低く、付着した T 細胞のアポトーシス抑制作用も低かった。この細胞死抑制効果の違いは、細胞外マトリクスやサイトカインの発現差を反映していることが示唆された。

(3) マウスヘルパー T 細胞のサイトカイン産生に及ぼす酪酸の影響

マウス脾臓細胞から *in vitro* で分化誘導して得られた Th1、Th2 および Th17 サブセットにおける酪酸依存的な細胞死と、酪酸がサイトカイン産生に及ぼす影響について検討した。各濃度の酪酸存在下、24 時間、抗 CD3 抗体で Th1、Th2、Th17 を再刺激した。Th2 による IL-4 産生は 1.25-5 mM の酪酸添加によって濃度依存的に強く抑制された。一方、

Th1 による IFN- γ と Th17 による IL-17A の産生は 2.5-5 mM の高濃度において抑制されたが、1.25 mM での産生はコントロール群よりも上昇した。さらに、0.3-1.25 mM の濃度の酪酸では死細胞の割合に顕著な増加は認められなかった。一方、Th2 による IL-4 産生は濃度依存的に抑制され、Th1 による IFN- γ と Th17 による IL-17A の産生は上昇した。こうした酪酸のサイトカイン産生への影響は、フローサイトメトリーによるサイトカイン産生細胞の割合、Th におけるサイトカイン mRNA 発現の解析でも同様に認められた。

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 6 件)

- ① Y. Mikami, S. Motoki, M. Lee, K. Yamada, K. Ochiai, H. Masaki, E. Watanabe, N. Watanabe, M. Somei, M. Takagi (2011) Inhibitory effects of a tryptamine derivative on UV-induced apoptosis in MC3T3-E1 mouse osteoblasts. J Pharmacol Sci, 115, 214-220. (査読有)
- ② H. Ikeda, M. Miyatake, N. Koshikawa, K. Ochiai, K. Yamada, A. Kiss, M. J. Donlin, W. M. Panneton, J. D. Churchill, M. Green, A. M. Siddiqui, A. L. Leinweber, N. R. Crews, L. A. Ezerskiy, V. R. Rendell, M. M. Belcheva, C. J. Coscia. (2010) Morphine modulation of thrombospondin levels in astrocytes and its implications for neurite outgrowth and synapse formation. J Biol Chem, 285, 38415-38427. (査読有)
- ③ 田村宗明, 山田 潔, 菊地邦好, 勝田公雄, 落合邦康. (2010) アルコール系殺菌剤の改良とその抗菌効果について. 日大歯学 84, 75-79. (査読有)
- ④ M. Jin, H. Satsu, K. Yamada, N. Hisada, M. Totsuka, M. Shimizu. (2010) Permeation of disaccharides derived from chondroitin sulfate through human intestinal Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. Biosci Biotechnol Biochem 74, 1243-1249. (査読有)
- ⑤ M. Jin, T. Iwamoto, K. Yamada, H. Satsu, M. Totsuka, M. Shimizu. (2010) Disaccharide derived from chondroitin

sulfate A suppressed CpG-induced IL-6 secretion in macrophage-like J774.1 cells. *Cytokine* 51, 53-59. (査読有)

- ⑥ K. Yamada, K. Sato, S. Morishita, S. Kaminogawa, M. Totsuka. (2009) Establishment of a primary culture method for mouse intestinal epithelial cells by organ culture of fetal small intestine. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 1849-1855. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 今井健一, 山田 潔, 田村宗明, 岡本 尚, 落合邦康 (2010) 感染症における微生物間相互作用-酪酸産生常在菌による潜伏感染 HIV-1 の再活性化. 第 93 回日本細菌学会 関東支部総会, 京王プラザホテル (東京)
- ② 今井健一, 山田 潔, 田村宗明, 落合邦康 (2010) 酪酸産生菌による潜伏感染 HIV-1 の再活性化. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, タワーホール船堀 (東京)
- ③ 山田 潔, 落合智子, 落合邦康 (2010) 酪酸感受性の異なる歯肉線維芽細胞の T 細胞アポトーシス抑制作用に及ぼす影響. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, タワーホール船堀 (東京)
- ④ 齋藤秀雄, 田村宗明, 山田 潔, 落合邦康 (2010) カテキンの *Candida albicans* の二形性に関与する細胞内シグナルに及ぼす影響. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, タワーホール船堀 (東京)
- ⑤ 今井健一, 山田 潔, 田村宗明, 岡本 尚, 落合邦康 (2010) Effects of butyric acid-producing bacteria on reactivation of latent HIV-1. 14TH INTERNATIONAL CONGRESS of IMMUNOLOGY, 神戸国際展示場 (神戸)
- ⑥ 吉田綾子, 山田 潔, 八村敏志, 指原紀宏, 池上秀二, 清水 誠, 戸塚 護 (2010) Analysis of regulatory CD4+ T cell subsets induced by oral administration of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 in orally tolerized D011.10 mice. 14TH INTERNATIONAL CONGRESS of IMMUNOLOGY, 神戸国際展示場 (神戸)
- ⑦ 落合邦康, 今井健一, 山田 潔, 田村宗明, 岡本 尚 (2010) 腸内細菌代謝産物による潜伏感染 HIV-1 の再活性化. 第 14 回腸内細菌学会, 京都大学百周年時計台記念館「百周年記念ホール」(京都)
- ⑧ 山田 潔, 落合智子, 落合邦康 (2010) 酪酸による Th1 および Th2 細胞のアポトーシス誘導とサイトカイン産生抑制. 第 83 回日本細菌学会総会, パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑨ 田村宗明, 齋藤秀雄, 山田 潔, 落合邦康

(2010) *Candida albicans* に対するカテキンジェルの病原性抑制効果. 第 83 回日本細菌学会総会, パシフィコ横浜 (横浜)

- ⑩ 吉田綾子, 山田 潔, 八村敏志, 指原紀宏, 池上秀二, 清水 誠, 戸塚 護 (2009) *Lactobacillus gasseri* OLL2809 の経口投与による D011.10 マウスの経口免疫寛容誘導の強化. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪国際会議場 (大阪)
- ⑪ 山田 潔, 落合智子, 落合邦康 (2009) 酪酸による Th1 および Th2 細胞アポトーシス誘導性とサイトカイン産生への影響. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター (新潟)
- ⑫ 山田 潔, 落合智子, 落合邦康 (2009) 歯周病原菌の産生する短鎖脂肪酸の分析とヒト細胞アポトーシスに及ぼす影響. 第 82 回日本細菌学会総会, 名古屋国際会議場 (名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 潔 (YAMADA KIYOSHI)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 30313076