

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791809

研究課題名（和文） 歯周病病態発症における免疫抑制補助シグナル分子B7-H1の役割

研究課題名（英文） Roles of an immunoregulatory molecule B7-H1 in pathogenesis of periodontitis

研究代表者

神村 洋介（KAMIMURA YOSUKE）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40549929

研究成果の概要（和文）：免疫抑制分子 B7-H1 を過剰発現している皮膚および歯肉上皮細胞は、刺激による細胞増殖能が亢進していた。皮膚の早期炎症応答は、上皮細胞上の B7-H1 発現により PD-1 依存性に抑制されたが、歯肉上皮における炎症応答は低下していた。*Prophyromonas gingivalis* (Pg) 菌 TDC60 株によって歯周病を誘導することができた。重度歯槽骨吸収を示す個体では、顕著な TDC60 特異的 IgG 抗体価の上昇が認められた。

研究成果の概要（英文）：Proliferative responses of keratinocytes in the skin and the gingiva that overexpressed an immunoregulatory molecule B7-H1 were accelerated. Early inflammatory skin responses were suppressed by B7-H1 on keratinocytes in a PD-1-dependent manner, but the inflammatory responses in the gingiva were impaired. A murine model of periodontitis was induced by a TDC60 strain of *Prophyromonas gingivalis*. Serum titers of TDC60-specific IgG were markedly elevated in the mice that exhibited severe alveolar bone loss.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1600000	480000	2080000
2011年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫・感染・炎症

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、口腔常在菌による菌性感染症であり、進行すると歯槽骨吸収を引き起こし、歯牙脱落の原因となる。歯周病の病態は細菌による組織霜害というより、宿主免

疫系と細菌との間に保たれている平衡状態が破綻することで生じるある種の免疫疾患とも考えることができる。

細菌に対する宿主免疫応答は、細菌を排除するための積極的な免疫応答を惹起するか、

細菌の排除を起こさない免疫寛容維持のバランスの上に成り立っている。過剰な免疫応答は、歯周病の病態発症を引き起こす。補助シグナル分子は、T細胞免疫応答において、免疫応答と免疫寛容をコントロールする重要な役割を果たしている。PD-1分子は、活性化T細胞に発現誘導される抑制性受容体であり、そのリガンドとしてはCD274 (B7-H1)とCD273 (B7-DC)の2分子の存在が報告されている。特に、B7-H1は樹状細胞・マクロファージなどの抗原提示細胞や活性化T細胞などの多くの免疫細胞に発現が認められるほか、炎症組織に存在する上皮細胞や内皮細胞、あるいは癌細胞などの多くの組織細胞上に発現が誘導され、免疫寛容誘導に積極的に関与していることが報告されてきた。

当研究室では、口腔扁平苔癬における角化上皮細胞や口腔粘膜扁平上皮癌細胞にもB7-H1発現が誘導されることを報告してきた。皮膚や口腔粘膜由来の培養角化上皮細胞や培養癌細胞上のB7-H1発現は、IFN- $\gamma$ に代表される様々な炎症性サイトカイン刺激により誘導される。我々は、角化上皮細胞に発現するB7-H1の機能を調べるために、ヒトケラチン14(K14)プロモーター制御下でB7-H1を角化上皮細胞に恒常的に高発現させたトランスジェニックマウス(K14/B7-H1Tg)を作成した。このマウスでハプテン誘導接触性過敏応答を検討したところ、上皮細胞に高発現しているB7-H1は、皮膚浸潤エフェクターT細胞機能の抑制に直接関与していることを明らかにすることを報告してきた。また、このトランスジェニックマウスでは、発癌物質であるメチルコラントレン皮内投与やTPA塗布によって誘導される早期皮膚炎症応答が抑制されることを見いだしており、B7-H1は

T細胞が関与しない自然免疫応答においても、制御的な働きをしていることが示唆されていた。これらの結果から、上皮細胞に発現誘導されるB7-H1は、T細胞依存性およびT細胞非依存性の免疫制御機構に関わっている可能性が考えられた。本研究では、早期炎症である歯肉炎と慢性炎症となった歯周病の病態形成におけるPD-1およびB7-H1分子の機能的な関与を明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

上記のような背景のもとに、本研究では、歯肉上皮細胞に発現するB7-H1および炎症歯肉にリクルートする好中球・マクロファージ・樹状細胞などの炎症性細胞に発現するB7-H1およびPD-1が歯肉炎および歯周病の病態発症にどのように関与しているかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験に用いたマウス

実験には、BALB/c, BALB/c RAG2<sup>-/-</sup>, BALB/c K14/B7-H1tg 雌マウスを使用した。

### (2) *Prophyromonas gingivalis* (Pg) 菌

ヒト歯周病患者より樹立された *Prophyromonas gingivalis* (Pg) 菌株である TDC60 を使用した。TDC 株は TSB-Y HM(+) 液体培地で嫌気培養し、歯肉への感染は 2%カルボキシメチルセルロース (CMC)-PBS に希釈し、 $1 \times 10^9$  CFU/50 ml を下顎大臼歯頰側に塗布した。

### (3) 早期皮膚および歯肉炎症の誘導

早期皮膚炎症応答は、TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, 10  $\mu$ g/200  $\mu$ l) の腹部皮膚塗布により誘導した。抗体阻害実験では、抗 B7-H1 抗体 (MIH5)

あるいは抗PD-1抗体(RMP1-14)を塗布前日から3日間連日腹腔内投与した。歯肉炎症は、TPA(1 μg/10 μl)あるいはTDC60菌 $1 \times 10^9$  CFUを片側下顎臼歯部頬側歯肉に塗布して誘導した。塗布後の歯肉組織を経時的に採取し、組織学的検索を行った。

#### (4) 組織学的解析

耳介皮膚あるいは下顎大白歯部歯肉組織をOCTコンパウンドに包埋後、新鮮凍結切片を作製し、抗B7-H1(MIH5)抗体を用いた免疫組織染色を実施した。また、同時に、緩衝ホルマリン固定後、パラフィン切片を作成し、H&E染色を行った。

#### (5) 歯周病の誘導

マウス口腔内常在菌を淘汰するためにカナマイシン(1 mg/ml)含有飲料水を1週間自由摂取させた。その1週間後にTDC60投与を開始した。両側の下顎大白歯頬側歯肉部に $5 \times 10^8$  CFU/25 μl ずつ隔日で3回TDC60塗布を実施した。その後毎週血清・歯肉溝浸出液(GCF)・唾液を取得後、7週後に、血清・歯肉溝浸出液・下顎臼歯部歯肉組織・下顎骨を採取し、それぞれTDC60特異的IgG抗体価測定、炎症性サイトカインの定量RT-PCR、歯槽骨吸収の測定に使用した。陰性対照群には、2%CMC-PBSのみを歯肉に塗布した。

### 4. 研究成果

#### (1) B7-H1tg マウス皮膚および歯肉上皮におけるB7-H1発現

B7-H1tgマウス皮膚および歯肉組織におけるB7-H1発現を新鮮凍結切片を用いて抗B7-H1抗体による免疫組織染色で確認した。その結果、コントロールの野生型マウスと比較して、B7-H1tgマウス皮膚および歯肉

上皮では、明らかに強いB7-H1発現が特に基底細胞層に認められた(図1)。

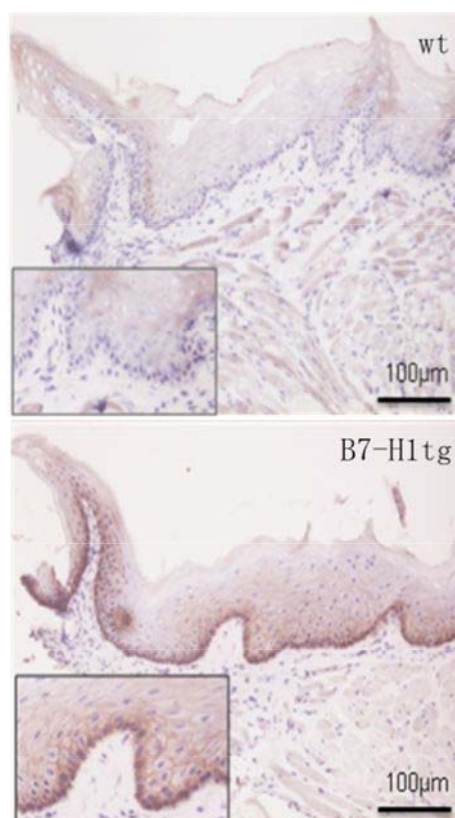


図1 歯肉上皮におけるB7-H1発現

#### (2) B7-H1発現上皮角化細胞の増殖亢進と早期炎症反応の抑制

未刺激皮膚では、野生型とB7-H1tg皮膚間で組織学的な違いはH&E染色では認められなかった。皮膚へのTPA塗布により、上皮細胞層の肥厚に示される角化細胞の顕著な増殖が誘導されたが、野生型とB7-H1tg間で明らかな差を認めなかった。しかしながら、野生型において顕著に認められる上皮下炎症性細胞浸潤は、B7-H1tgマウスでは明らかに抑制されていた(図2)。この抑制は、B7-H1あるいはPD-1に対する中和抗体投与で解除されたことから、この早期の炎症性細胞浸潤にはB7-H1-PD-1経路が関与していることが示唆された。しかしながら、この早期炎症におけるT細胞のリクルートはほとんどないこと、また、皮膚に常在する $\gamma\delta$ T細胞上にはPD-1発現を認めないことから、この早期炎症の制御

はT細胞非依存性のメカニズムであることが示唆された。

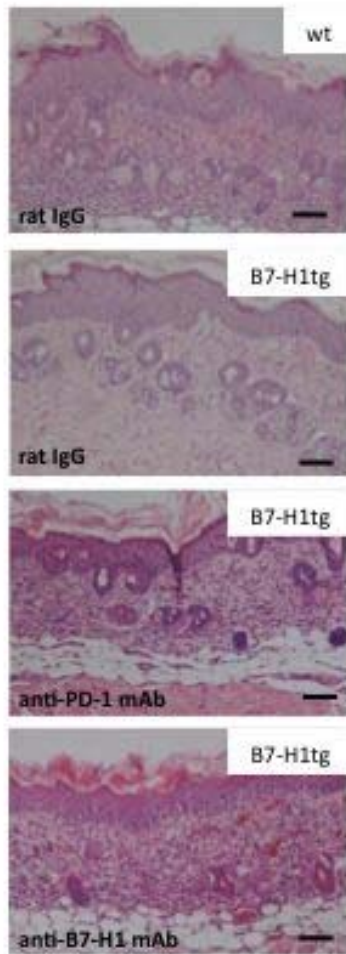


図2 B7-H1:PD-1依存的早期皮膚炎症の抑制

次に、TPAにより誘導される歯肉上皮細胞の活性化刺激にB7-H1発現が与える影響を検討した。TPA塗布前は、野生型とB7-H1tg歯肉で上皮細胞層の厚さや層の数には、明らかな違いを認めなかった。TPA塗布後24時間あるいは48時間で、上皮層の肥厚と個々の細胞肥大が共に認められたが、有棘層の数はB7-H1tgでは約2倍になっていた。しかしながら、炎症性細胞浸潤の増加をみとめることはできなかった。TDC60塗布においても、B7-H1tgマウス上皮に肥厚が認められたが、TPA塗布と比較しその変化は少なかった。同様に、炎症性細胞の増加は認められなかった。本結果が

ら、皮膚および歯肉上皮細胞の刺激による増殖反応はB7-H1tgで促進されていることが示された。また、皮膚と比較して、歯肉上皮では炎症性細胞の動員が抑制されている可能性が示唆された。

### (3) TDC60による歯肉炎および歯周病モデルの樹立

既存のマウス歯周病モデルのプロトコルを基に若干の改変を加えて、野生型BALB/cマウスを用いてTDC60菌塗布による歯周病誘導を試みた。7週後の歯槽骨吸収は、陰性対照群が $0.468 \pm 0.010$  mmに対して、TDC60群は $0.537 \pm 0.039$  mmであり、有意の歯槽骨吸収が認められた。TDC60群感染群では、さらに歯槽骨吸収が0.55 mm以上の重度群と以下の軽度群に2分できた。歯槽骨吸収重度群において、血清TDC60特異的IgG抗体価の顕著な上昇が認められた(図3)。これに対して、歯槽骨吸収軽度群では、抗体価の上昇はほとんど生じていなかった。経時変化では、感染開始後3-5週でTDC60-IgG抗体価はピークになっていた。

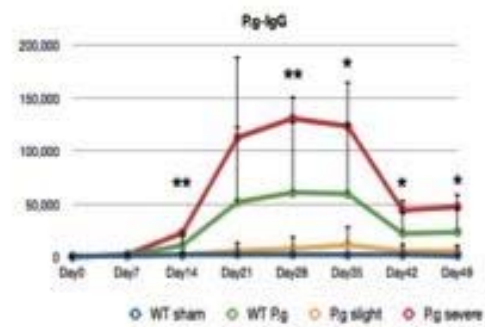


図3 血中TDC60特異的IgG抗体価

IgGサブクラス別解析では、TDC特異的IgG2b抗体価は、3-5週目がピークであり、TDC60特異的IgG1およびIgG2a抗体価は、それより遅れ6-7週目でピークとなっていた。T細胞およびB細胞の存在しないRAG2ノックアウトマウスを使用して同様の歯周病誘

導を試みたところ、歯槽骨吸収は起こらなかったことから、適応免疫系は歯周病の病態誘導に関与している可能性が示唆された。

TDC60 菌の排除に IgA による粘膜免疫機構が関与している可能性が考えられたので、血清および唾液中の TDC60 特異的 IgA 抗体価の測定を試みたが測定限界以下であった。好感度の TDC60 特異的 IgA 測定系の樹立が課題として残された。抗体価が上昇しない理由として、歯肉に塗布された菌が、嚥下により腸管粘膜経路で吸収され、経口免疫寛容が生じている可能性が考えられたので、この可能性を確かめるために TDC60 経口投与後に TDC60 による歯肉感染を行ったところ、経口投与後において TDC60 特異的 IgG 値の上昇が認められ、さらに TDC60 の歯肉感染により抗体価はさらに上昇した。従って、経口免疫寛容が関与している可能性は低いと考えられた。抗体価上昇群と非上昇群がどのような理由で起こるのかについても今後の検討課題として残された。期間内に予定の研究をすべて終了させることはできなかったが、現在、B7-H1tg マウス、B7-H1 ノックアウトあるいは B7-H1/PD-1 ダブルノックアウトマウスを用いての歯肉炎および歯周病誘導を計画しているところである。

#### 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 2 件)

- ① Cao Y, Zhang L, Kamimura Y, Ritprajak P, Hashiguchi M, Hirose S, Azuma M. B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin. *Cancer Res.* 71 (4):1235-43,

2011

- ② Cao Y, Zhang L, Ritprajak P, Tsushima F, Youngnak-Piboonratanakit P, Kamimura Y, Hashiguchi M, Azuma M. Immunoregulatory molecules B7-H1 (CD274) contributes to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 71: 4737-4741, 2011

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

神村 洋介 (KAMIMURA YOUSUKE)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40549929