

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249082

研究課題名(和文)口腔組織特異的免疫応答と免疫寛容の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms in oral tissue-specific immune responses and tolerance

研究代表者

東 みゆき (Azuma, Miyuki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90255654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,700,000円、(間接経費) 11,010,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞(DC)と上皮細胞によって誘導される口腔免疫応答を解析し、以下のユニークな特徴を明らかにした。1) 皮膚と比較すると口腔粘膜DC分布は劣る。2) 舌下粘膜DC分布は、頬や舌背と比べて少ない。3) 初回抗原塗布後の粘膜下DCの集積には遜色がない。4) 反復抗原塗布で舌下粘膜DCは枯渇し、樹状突起を欠くマクロファージ様の円形細胞出現率が高くなる。5) 歯髄DCは、抗原捕捉後に所属リンパ節に遊走し、成熟した細胞表面発現型をもつ。6) 歯肉と舌背粘膜の有棘細胞のみにB7-H1の恒常的発現が認められる。7) 歯肉上皮上のB7-H1はP.g菌によって誘導される歯肉炎症および歯槽骨吸収を抑制する。

研究成果の概要(英文)：We investigated oral immune responses induced by oral mucosal or dental pulpal DCs and epithelial cells, and found following new observations; 1) The density of oral mucosal DCs was clearly lower. 2) The density of sublingual DCs was markedly lower than those of buccal mucosa and dorsal surface of the tongue. 3) A comparable recruitment of submucosal DCs (smDCs) in the sublingual mucosa (SLM) was induced at an early phase after an initial hapten painting. 4) Repeated antigen painting onto SLM induced exhaustion of smDCs and conversion of macrophage-like smDC that possess less dendrites and round morphology with high levels of CD11b and CD206. 5) Dental pulp DCs migrated into regional lymph nodes after cusp trimming and possess mature phenotype. 6) Prickle cells in gingiva and dorsal surface of tongue constitutively expressed an immune regulatory molecule B7-H1. 7) B7-H1 that was overexpressed in gingival keratinocytes inhibited P.g-induced gingival inflammation and alveolar bone loss.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫学 歯学 樹状細胞 口腔粘膜 歯髄 歯肉 免疫制御

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫研究の進展は、Toll 様受容体に代表されるような微生物認識システムとそれによるシグナル伝達が、引き続き抗原特異的適応免疫応答に多大な影響を与えることを明らかにしてきた。このことは、生体防御の最前線である皮膚および粘膜に存在する樹状細胞の重要性が格段に高まることを意味する。病原微生物に対する免疫応答システムは、有害な病原体を免疫応答により積極的に排除する抵抗性（レジスタンス）と些細な病原体を無視し、不必要な免疫応答（炎症）による組織障害をできるだけ少なくする寛容（トレランス）の間で葛藤している。口腔免疫システムにおいても、多くの共生細菌叢と病原性細菌に曝された環境下において、巧妙なレジスタンスとトレランスの制御が行われていることが予想されるが、その分子メカニズムは不明である。齲蝕・歯髄炎・歯周病に代表される口腔感染症は、急性炎症による病原体の排除が起こらずに慢性化したトレランス優位の免疫応答によって引き起こされた一種の免疫病とも考えることができる。

## 2. 研究の目的

本研究では、病原体の認識に最初に関わる口腔粘膜・歯肉・歯髄に存在する樹状細胞と上皮細胞、また、これら細胞によって誘導される免疫応答の分子メカニズムを補助シグナルとサイトカインに焦点をあて機能解析し、口腔組織特異的な免疫応答と免疫寛容の制御メカニズムを解明することを目的とした。口腔粘膜 3 部位（頬粘膜・舌下粘膜・歯肉）と歯髄の口腔 4 部位に分けて、細菌性抗原や外来生蛋白質抗原に対して口腔樹状細胞に誘導される免疫応答をマウスモデルにおいて解析していく。口腔粘膜 3 部位は、解剖学的および機能的な違いから、樹状細胞の分布および機能に相違があることが推察される。本研究では、臨床に密接に結びつく重要なテーマとして以下の 3 テーマを掲げた。

### (1) 舌下免疫療法における免疫制御機構

舌下粘膜はアプローチのしやすさから、舌下ワクチンや舌下免疫療法 (Sublingual Immunotherapy, SLIT) の抗原投与部位になっているが、免疫賦活と免疫寛容という相反する 2 つの目的に舌下粘膜を利用することの免疫学的な利点と欠点については明確に解析されていない。スギ花粉症、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどの治療法としての SLIT 効率を上げるために、舌下粘膜樹状細胞に焦点をおきその特殊性を解析する。

また、舌下粘膜経路で抗原が塗布された場合の抗原特異的な免疫応答における免疫抑制チェックポイント分子 PD-1/B7-H1 経路の関与を解析した。

### (2) 歯肉炎から歯周病への進展機構

歯周病原細菌に対する免疫応答を経時的に解析することで、歯肉粘膜由来で抗原が侵入した場合の応答について、時間軸を追いながらその変化を解析する。歯周病原細菌に対するトレランスメカニズムを免疫抑制分子機能に焦点をあて解析する。

### (3) 齲蝕および歯髄炎の自然治癒機構

マウス歯髄炎モデルを樹立し、象牙細管を介して侵入した細菌由来因子に対して、歯髄に存在する少なくとも 2 種類の樹状細胞が歯髄に存在し、咬頭切削刺激により樹状細胞は切削側歯髄象牙質境界に移動し、細胞表面の共刺激分子発現を変化させることを報告してきた。本研究ではそれをさらに発展させ、歯髄樹状細胞が、抗原捕捉後、所属リンパ節に遊走し、適応免疫応答を惹起させる可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 抗原の局所塗布前後における皮膚および口腔粘膜樹状細胞の分布およびフェノタイプの変化を組織学的に解析する。また、局所皮膚あるいは口腔粘膜から抗原を捕捉し所属リンパ節に遊走した樹状細胞をフローサイトメトリーを用いて解析する。抗原の反復塗布により樹状細胞分布およびフェノタイプがどのように替わるかを調べる。マウススギ花粉症モデルを樹立し、そのモデルにおいて舌下免疫療法を行い、その効果を調べるとともに、舌下粘膜および所属リンパ節における樹状細胞の機能的な変化を調べる。

(2) ヒト重度歯周病患者より分離した高病原性の *P.gingivalis* (P.g) 株 (TDC60) の歯肉塗布によって誘導されるマウス歯周炎モデルを樹立した。歯肉上皮に免疫チェックポイント分子 B7-H1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスあるいは B7-H1 欠損、PD-1/B7-H1 欠損マウスを用いて、急性期および慢性期における歯周組織の病理学的解析および炎症性サイトカン発現、*P.g* 菌に対する抗体価および歯槽骨吸収を測定した。

(3) すでに樹立している咬頭切削による歯髄炎モデルを用いて、咬頭切削後の所属リンパ節における変化を調べた。特に、紫光照射により、緑から赤に細胞が変換する KikGR ノックインマウスを利用して、咬頭切削 2 時間後に切削咬頭歯髄に紫光照射を行い、さらに 14 時間後の所属リンパ節細胞における KikRed 陽性細胞をフローサイトメーターを用いて多重染色解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 舌下粘膜樹状細胞は、頬粘膜樹状細胞と比較して、主たる 3 サブセットの樹状細胞;

CD207+MHC class II+ランゲルハンス細胞 (LC)、CD207-MHC class II+ 粘膜下樹状細胞 (smDC)、CD207+MHC class II+ smDC のすべてにおいて、分布密度が低かった。FITC ハプテン抗原塗布後は、6時間をピークに樹状細胞が粘膜下にリクルートし、その密度は頬粘膜と比較して劣るものではなかった。しかしながら、24時間後には、舌下粘膜樹状細胞はほとんどいなくなっていた。FITC の反復塗布では、smDC のリクルートが頬粘膜と比較して有意に低下していた。また、舌下粘膜では、樹状突起の少ない円形のマクロファージ様細胞が固有層深層において頻度高く認められた。これらの細胞は、CD11c の発現が低く CD11b と CD206 を強く発現していた。以上のことから、舌下粘膜における樹状細胞分布は、頬粘膜と比較して少なく、反復抗原塗布は、舌下粘膜樹状細胞を枯渇させ、局所の樹状細胞フェノタイプを転換させることが見いだされた。

(2) アジュバントや精製抗原を使用しない自然発症に類似した臨床症状を呈するマウススギ花粉症モデルを新規に樹立した。このモデルにおいて、実際にスギ花粉エキスを使用した SLIT を実施した。SLIT により、くしゃみおよび鼻掻きなどの臨床症状、鼻粘膜肥厚、鼻粘膜や肺胞洗浄液における好酸球浸潤が抑制された。また、スギ花粉刺激による脾 T 細胞からのサイトカイン産生 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-10) を抑制し、所属リンパ節の CD11c 陽性 DC における MHC class II および共刺激分子 CD86 と B7-H1 発現を有意に抑制していた。FITC 反復抗原塗布で認められたのと同様に、SLIT 後の舌下粘膜において、粘膜下樹状細胞の枯渇と CD11b を高発現するマクロファージ様の円形細胞優位の状態が認められた。

(3) PD-1 欠損 (KO) マウスでは、感作前後における血清 IgE 値が高かったが、感作後のスギ花粉特異的 IgG1 および IgG2a は低値であった、くしゃみや鼻掻きなどの臨床症状および好酸球浸潤は有意に低下しており、花粉症の発症が抑えられていた。KO マウスでは、末梢血、脾臓、所属リンパ節における濾胞 T 細胞 (CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Tf) 比率が高く、Foxp3<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>(Tfr) および Foxp3<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T (Tref) 比率が有意に増加していた。PD-1 が、制御性 T 細胞の分化・誘導に影響を与え、アレルギー応答においても関与していることが示唆された。

(4) 口腔粘膜における B7-H1 発現を検討したところ、歯肉および舌背粘膜の有棘細胞にのみ未刺激状態における B7-H1 発現が認められた。TPA の皮膚および頬粘膜塗布により B7-H1 発現は誘導されたが、この場合は基底細胞層、顆粒層を含むすべての上皮細胞に発現が誘導された。B7-H1 を角化上皮細胞に過剰発現している K14/B7-H1tg マウスでは、P.g

菌塗布により誘導される7日後の急性期の歯肉炎症が組織学的に抑制されると同時に、炎症性サイトカイン発現も抑えられていた。これに対して、B7-H1/PD-1 ダブルノックアウト (WKO) マウスでは、急性期炎症が増強されていた。P.g 塗布7週後の慢性期炎症を評価する歯槽骨吸収の評価では、WKO マウスでは、野生型と同様に歯槽骨吸収がみられたが、B7-H1tg マウスでは、抑制されていた。P.g 菌特異的 IgG1 および IgG2a 産生は、野生型と比較し両者で有意に低地であった。歯肉上皮細胞に過剰発現する B7-H1 は局所急性炎症を制御し、歯槽骨吸収を抑えることが示唆された。

(5) 咬頭切削16時間後の所属リンパ節において、KikGR マウスの使用により KikRed 陽性の歯髓から遊走したと考えられる細胞の主なフェノタイプは、

CD11c<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>Ly6G<sup>low</sup>F4/80<sup>+</sup>と CD11c<sup>med</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>であり、前者が輸入リンパ管から遊走した歯髓 DC で、後者は血液循環を介して流入した顆粒球であると思われた。前者の歯髓 DC は、MHC class II, CD86, B7-DC を強く発現していることから、成熟 DC であることが示唆された。歯髓 DC が所属リンパ節に遊走することで、引き続く歯髓内細菌等に対する適応免疫応答が惹起される可能性が示された。

## 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14件)

Bhingare AC, Ohno T, Tomura M, Zhang C, Aramaki O, Otsuki M, Tagami J, Azuma M. Dental pulp dendritic cells migrate to regional lymph nodes. *J Dental Res* 93:288-293, 2014 DOI: 10.1177/0022034513518223

Sunthamala N, Pientong C, Ohno T, Zhang C, Bhingare A, Kondo Y, Azuma M, Ekalaksananan T. HPV16 E2 protein promotes innate immunity by modulating immunosuppressive status. *BiochemBiophys Res Commun* 446:977-82, 2014. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.042.

Ueno T, Yeung MY, McGrath M, Yang S, Zaman N, Snawder B, Padera RF, Magee CN, Gorbatov R, Hashiguchi M, Azuma M, Freeman GJ, Sayegh MH, Najafian N. Intact B7-H3 signaling promotes allograft proliferation through preferential suppression of Th1 effector responses. *Eur J Immunol* 42: 2343-53, 2013 doi:10.1002/rji.201242501

Van der Werf N, redpath SA, Azuma M, Yaguita H, Taylor MD. Th2 cell-intrinsic hypo-responsiveness determines susceptibility to helminth infection. *PLOS Pathogens*

62:2859-60, 2013 doi:10.2337/bd12-1475  
Pauken KE, Jenkins MK, Azuma M. Fife BT. PD-1, but not PD-L1, expressed by islet-reactive CD4+ T cells suppresses infiltration of the pancreas during type 1 diabetes. *Diabetes* 62:2859-60, 2013doi: 10.2337/db12-1475  
Hashiguchi M, Inamochi Y, Nagai S, Otsuki N, Piao J, Kobori H, Kanno Y, Kojima H, Kobata T, Azuma M. Human B7-H3 binds to Triggering receptor expressed on myeloid cells-like transcript 2 (TLT-2) and enhances T cell responses. *Open J Immunol* 2:9-16, 2012. DOI 10.4236/oji.2012.21002  
Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tani A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death-1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* 209:935-945, 2012. DOI 10.1084/jem.20112741  
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, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2217  
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. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0527  
Hams E, McCarron ML, Amu S, Yagita H, Azuma M, Chen L, Fallon PG. Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. *J Immunol* 186 (10): 5648-55, 2011doi: 10.4049/jimmunol.1003161  
Aramaki O, Chalermarp N, Otsuki M, Tagami J, Azuma M. Differential expression of co-signal molecules and migratory properties in four distinct subsets of migratory dendritic cells from the oral mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 413:407-413, 2011. DOI: org/10.1016/j.bbrc.2011.08.099 (2.406)  
Matsumoto K, Kan-O K, Eguchi-Tsuda M, Fukuyama S, Asai Y, Matsumoto T, Moriwaki A, Matsunaga Y, Tsutsui H, Kawai T, Takeuchi O, Akira S, Yagita H, Azuma M, Nakanishi Y, Inoue H. Essential Role of B7-H1 in Double-stranded RNA-induced Augmentation of an Asthma Phenotype in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 45:31-9, 2011.doi: 10.1165/rcmb.2009-0450OC

D'Addio F, Riella LV, Mfarrej BG, Chabtini L, Adams LT, Yeung M, Yagita H, Azuma M, Sayegh MH, Guleria I. The link between the PDL1 costimulatory pathway and TH17 in fetomaternal tolerance. *J Immunol* 187(9): 4530-41, 2011doi: 10.4049/jimmunol.1002031

Ritprajak P, Hashiguchi M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Azuma M. Antibodies against B7-DC with differential binding properties exert opposite effects. *Hybridoma* 31: 40-47, 2012. DOI 0.1089/hyb.2011.0087

〔学会発表〕(計 24 件)

Bhingare A, Ohno T, Zhang C, Tomura M, Azuma M. Determination of migratory dendritic cells in regional lymph nodes using “Kaede” transgenic mice. 第 42 回日本免疫学会 2013.12.11-13 幕張

Ohno T, Zhang C, Azuma M. T cell-dependent and -independent regulatory roles of a new inhibitory molecule VISTA. 第 42 回日本免疫学会学術集会 2013.12.11-13 幕張

Zhang C, Kang S, Ohno T, Azuma M. Unique features of sublingual mucosal dendritic cells. 第 42 回日本免疫学会 2013.12.11-13 幕張

張晨陽、大野建州、東みゆき. 抗原塗布後における舌下粘膜樹状細胞の特徴. 第 55 回歯科基礎医学会 2013.9.20-22 岡山

Bhingare A, 大野建州、張晨陽、東みゆき. Kaede トランスジェニックマウスを利用した歯髄から所属リンパ節に遊走する樹状細胞の同定. 第 55 回歯科基礎医学会 2013.9.20-22 岡山

Zhang C, Yagishita S, Tomoda T, Kang S, Azuma M. Establishment of a simple method for Japanese cedar pollinosis and sublingual immunotherapy in mice. 15th ICI, 2013.8.22-27, Milan, Italy.

Ohno T, Zhang C, Yagita H, Azuma M. Co-stimulatory effects of PD-1 in sublingual mucosa-mediated CD4<sup>+</sup> T cell responses. 15th ICI, 2013.8.22-27, Milan, Italy.

Zhang C, Ohno T, Azuma M. Unique features of sublingual mucosal dendritic cells after antigen application. 15th International Congress of Immunology (ICI), 2013.8.22-27, Milan, Italy.

Maekawa S, Ohno T, Kobayashi H, Nakagawa I, Izumi Y, Azuma M. Protective roles of co-inhibitory molecule B7-H1 in gingival inflammation. 2<sup>nd</sup> Meeting of the International Association of Dental

Research-Asia Pacific Region (IADR-APR),  
2013.8.21-23, Bangkok, Thailand.

Azuma M, Zhang C, Ohno T. Unique  
features of sublingual mucosal dendritic cells  
after antigen application. 2<sup>nd</sup> Meeting of the  
International Association of Dental  
Research-Asia Pacific Region (IADR-APR),  
2013.8.21-23, Bangkok, Thailand

前川祥吾、大野建州、小林宏明。中川  
一路、和泉雄一、東みゆき。急性および慢  
性歯肉炎症における免疫抑制分子 B7-H1 の  
関与。第 56 回日本歯周病学会(春季) 東京  
2013.5.31-6.1

Ohno T, Zhang C, Yagita H, Azuma M.  
Dual function of PD-1 in CD4<sup>+</sup> T cell responses  
by sublingual mucosa-mediated antigen  
application. Immunology2013, 2013.5.3-7,  
Honolulu, USA.

Azuma M, Zhang C, Yanagisawa S,  
Tomoda T, Kang S, Ohno T. Effects of  
sublingual immunotherapy on a murine model  
of Japanese cedar pollinosis. Immunology 2013,  
2013.5.3-7, Honolulu, USA.

Maekawa S, Ohno T, Kobayashi H,  
Nakagawa I, Izumi Y, Azuma M.  
Involvement of PD-1 and B7-H1 in acute and  
chronic inflammation in periodontal disease.  
第 41 回日本免疫学会 2012.12.5-7 神戸

Bhingare A, Aramaki O, Ohno T, Zhang C,  
Azuma M. Characterization of migrating  
dental pulp dendritic cells in regional lymph  
nodes after cusp treatment. 第 41 回日本免疫  
学会 2012.12.5-7 神戸

Yanagisawa S, Zhang C, Tomoda T,  
Azuma M. Establishment of a murine model  
for Japanese cedar pollinosis that manifests  
various symptoms like rhinitis, dermatitis, and  
asthma. 第 41 回日本免疫学会 2012.12.5-7  
神戸

Zhang C, Ohno T, Azuma M. Dynamics of  
oral mucosal dendritic cells after antigen  
application. 第 41 回日本免疫学会  
2012.12.5-7 神戸

Ohno T, Zhang C, Yagita H, Azuma M.  
Dual functions of PD-1 in CD4<sup>+</sup> T cell  
responses by sublingual mucosa-mediated  
antigen application. 第 41 回日本免疫学会  
2012.12.5-7 神戸

張晨陽、大野建州、東みゆき。舌下粘  
膜樹状細胞は抗原刺激により急激に枯渇す  
る。第 77 回口腔病学会 2012.11.30-12.1 東  
京

Bhingare A, Aramaki O, Ohno T, Zhang C,  
Azuma M. Characterization of migrating dental  
pulp dendritic cells in regional lymph nodes  
after cusp treatment. DC2012 2012.10.7-11

Daegu, Korea

⑲ Zhang C, Ohno T, Azuma M. Dynamics of  
oral mucosal dendritic cells after antigen  
application. DC2012 2012.10.7-11 Daegu,  
Korea

⑳ Azuma M, Aramaki O, Bhingare A, Zhang  
C, Ohno T, Chalermarp N. Differential  
expression of co-signal molecules and  
migratory properties in four distinct subsets of  
migratory dendritic cells from the oral mucosa.  
DC2012 2012.10.7-11 Daegu, Korea

㉑ 荒牧音、Bhingare A、大野建州、張晨陽、  
田上順次、東みゆき。咬頭切削後の所属リ  
ンパ節における歯髄から遊走する樹状細胞  
の解析。第 54 回歯科基礎医学会  
2012.9.14-16 郡山

㉒ 張晨陽、大野建州、東みゆき。抗原塗  
布後の舌下粘膜樹状細胞の動態。第 54 回  
歯科基礎医学会 2012.9.14-16 郡山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/mim/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東みゆき(AZUMA, Miyuki)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授  
研究者番号：90255654

(2) 研究分担者

大野建州(OHNO, Tatsukuni)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・助教

研究者番号：80435635

(3)連携研究者  
なし