

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593065

研究課題名(和文) 新たなT細胞サブセットTh17の歯周組織破壊に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study on periodontal destruction by new T cell subset Th17

研究代表者

尾崎 幸生 (Ozaki, Yukio)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60204187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの下顎前歯部歯肉に、TLR2リガンドS.aureusのペプチドグリカン(PGN)およびTLR4リガンドE.coliのリボポリサッカライド(LPS)、また、PGN+LPSをインジェクトし、TNF- α 、IL-10、IL-17の抗体で免疫染色を行った。インジェクト部のTNF- α 、IL-10陽性細胞をカウントしたところPGN+LPS>LPS>PGNの順に多く、IL-17陽性細胞はPGN刺激の時最も出現し、PGN+LPS、LPS単独刺激では少なかった。このことから、Th17は主にTLR2刺激で出現し、その他の刺激(PGN+LPSまたはLPS単独)では出現が阻害されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We injected peptidoglycan (PGN) as TLR(Toll-like receptor)2 ligand and/or lipopoly saccharide (LPS) as TLR4 ligand into the gingiva in mice lower jaw. Then, the samples of gingival tissue were made with paraffin. We immunostained them with anti-tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-interleukin 10 (IL-10) and anti-interleukin(IL)-17. Next, We counted the TNF-alpha, IL-10 and IL-17 positive cells in them. The number of TNF-alpha and IL-10 positive cells was the most numerous in samples stimulated by the both TLR2 and 4. The samples stimulated by single TLR had less positive cells. In case of IL-17, the samples stimulated by TLR2 expressed most positive cells and the samples stimulated by TLR4 had few positive cells. Interestingly, we found the sample stimulated by both ligands also had few positive cells. These results may show that accumulation of Th17 inhibited by the other T cell subsets, for example Th1, when the mouse gingival tissues were stimulated by PGN+LPS or LPS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：Th17 IL-17 TLR2 TLR4 TNF- α Th1 IL-10 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

近年までTh1, Th2の二元論で語られてきたThのサイトカインプロフィールによる病原論だが、新たにTh17という強力な炎症性サブセットが認識されパラダイムの変換が求められている。しかし、Th17, IL-17共に未知な部分が多い。

また、Th17とTreg(制御性T細胞)とは分化の際に密接にリンクしており、TGF- β にさらされた活性化T細胞にIL-2が加わるとTregに、IL-6, IL-1が加わるとTh17に分化する(Weaver 2006)。これは本来炎症作用を抑えようと考えられていたTGF- β がTh17という炎症性サブセットの分化に深く関わっていること、さらに同じくTGF- β によって分化する免疫抑制的なTregにIL-6, IL-1という因子が加わることで、真反対の炎症を担うサブセットに再分化すると言う点で興味深い。これを歯周疾患に当てはめてみると、骨吸収が抑制されている歯肉炎から骨吸収が認められる歯周炎に進行する時に、Treg優勢(Treg病変)からTh17優勢(Th17病変)にスイッチすることがきっかけになる可能性もあり、興味もたれるところである。

2. 研究の目的

Th17への理解がさらに深まれば、将来抗IL-17やTh17を抑制すると言われるレチノイン酸(Xiao 2008)、AhRアンタゴニスト(Veldhoen 2009)などの治療への応用も考えられる。しかし、IL-17を含めてTh17は自己免疫疾患惹起や破骨細胞活性化などの「副作用」的な一面が強調され、好中球を活性化し歯槽骨吸収を回避する(Yu 2007)するなど「保護」的な重要な機能についての報告はまだ少ない。この点を無視して臨床応用を急ぐと、かえって免疫反応を攪乱し、疾患を進行させる可能性もある。その意味でも「基礎的」な研究をさらに積み重ねて行くことが大事だと思われる。そこで今回、マウスの歯肉に歯周炎の発症・進展に重要なTLR2ライガンドであるペプチドグリカン(PGN)そしてTLR4ライガンドであるリポポリサッカライド(LPS)とその両者を注入することによりTh17がどのような動態を示すのかを比較検討していくこととした。

3. 研究の方法

雄の7週令のCB-17マウス左側下顎第一臼歯近心部の歯肉に*E. coli*のLPSおよび*S. aureus*のPGNさらにその両者5 μ g/3 μ lを48時間ごとに13回注入する。

次に、最終LPS注入後24時間にマウスを屠殺し、LPS, PGN, LPS+PGNを注入した歯肉組織と下顎骨を摘出する。採取した試料を、固定・脱灰・パラフィン包埋し、4 μ m厚の連続切片を得る。

これらの標本に対して、基本的な病態像をみるためにHE染色、破骨細胞の出現を観察し骨吸収の程度を観察するためにTRAP染色を行う。さらに、IL-17の発現頻度と、炎症性マーカーとして、TNF- α , IL-10の保有細胞・程度を見るために抗IL-17, TNF- α , IL-10,抗体による免疫染色を行う。これらにより、TLR2,4誘導性歯槽骨吸収とTh17の動態の関連を検討する。

4. 研究成果

インジェクト部のTNF- α (Fig.1a-c)とIL-10(Fig.2a-c)陽性細胞をカウントしたところ、単位面積あたりの数が、LPS+PGN刺激>LPS刺激>PGN刺激の順に大きかった(Fig.1d, 2d)。PBMCをTLR2とTLR4同時刺激した場合、TNF- α やIL-10が相乗的に産生されることは、当教室のYamaguchiらが2009年に*in vitro*実験として報告しているが、それと今回の*in vivo*での結果が一致した。

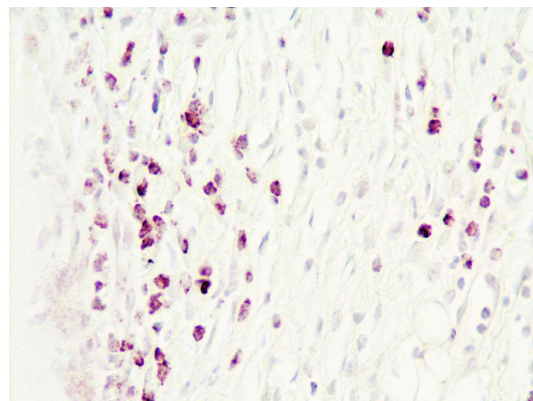


Fig.1-a LPS 刺激時の TNF- α 陽性細胞

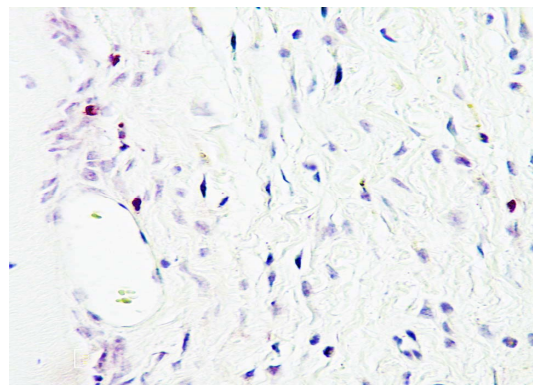


Fig.1-b PGN 刺激時の TNF- α の陽性細胞

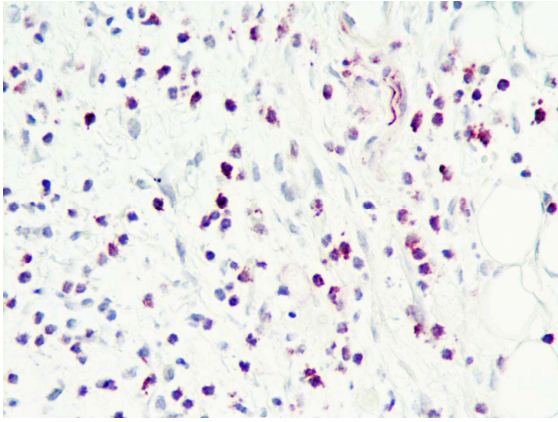


Fig.1-c LPS+PGN 刺激時の TNF- 陽性細胞

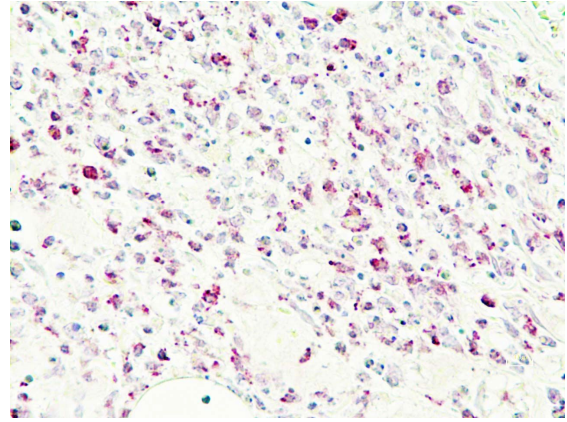


Fig.2-c LPS+PGN 刺激時の IL-10 陽性細胞

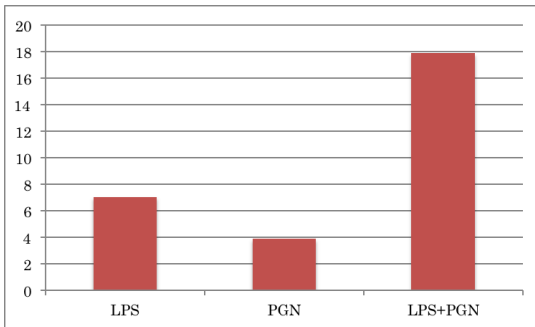


Fig.1-d 各刺激時の TNF- 陽性率

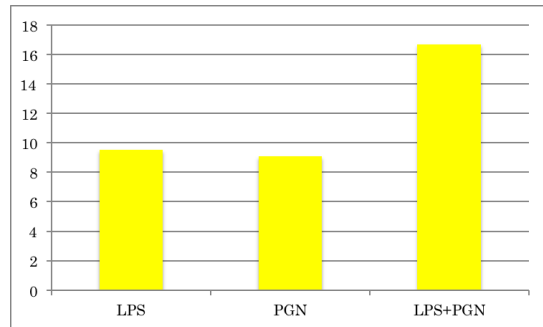


Fig.2-d 各刺激時の IL-10 陽性細胞率

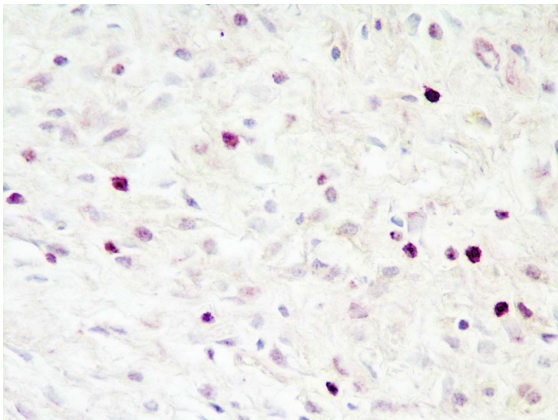


Fig.2-a LPS 刺激時の IL-10 陽性細胞

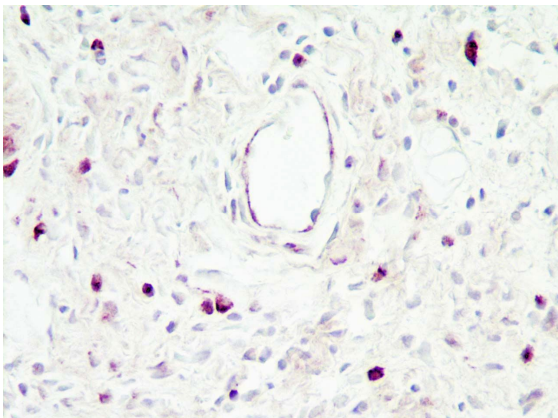


Fig.2-b PGN 刺激時の IL-10 陽性細胞

IL-17(Fig.3a-c)の場合、その陽性細胞は PGN 刺激 > PGN+LPS 刺激 = LPS 刺激の順に多かった(Fig.3d)。このことから IL-17 は主に TLR2 刺激で発現されるが、TLR4 刺激を同時に行った場合、TLR4 単独刺激の場合、Th17 は Th1 などの競合的サブセットで出現を阻害される可能性があることが示唆された。

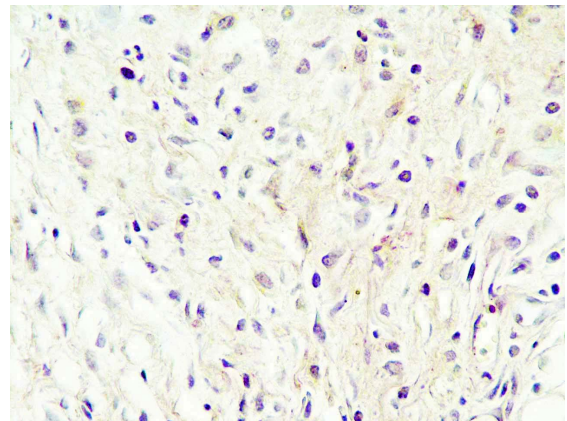


Fig.3-a LPS 刺激時の IL-17 陽性細胞

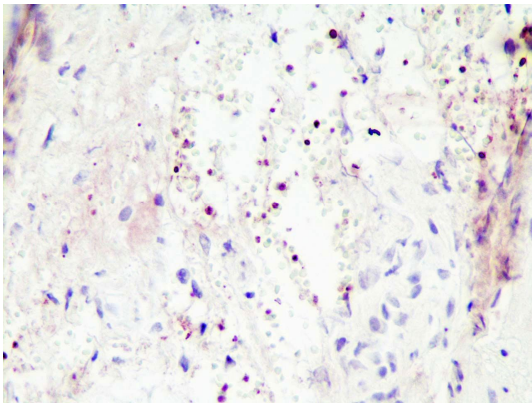


Fig.3-b PGN 刺激時の IL-17 陽性細胞

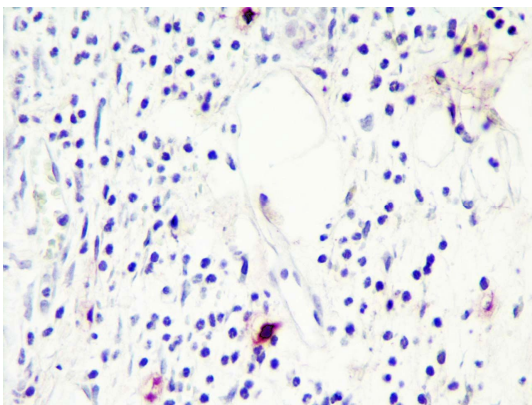


Fig.3-c LPS+PGN 刺激時の IL-17 陽性細胞

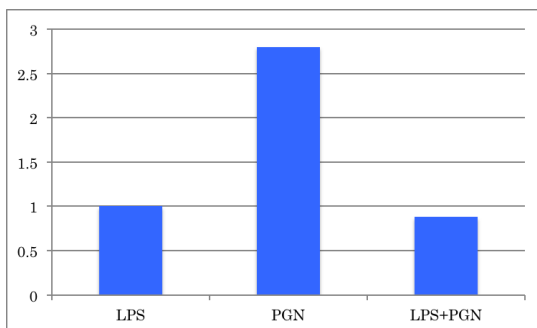


Fig.3-d 各刺激時の IL-17 陽性細胞率

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 幸生 (OZAKI, Yukio)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号：60204187

(2) 研究分担者

原 宣興 (HARA, Yoshitaka)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：60159100