

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：31602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792464

研究課題名（和文）歯周病原細菌による DC-SIGN を介したクロスプライミング誘導機構の解明

研究課題名（英文）INDUCTION OF DC-SIGN-MEDIATED CROSS-PRIMING BY PERIODONTAL PATHOGENS

研究代表者

多田 浩之（TADA HIROYUKI）

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号：70431632

研究成果の概要（和文）：*Porphyromonas gingivalis* (*P. g*)による樹状細胞（DC）を介した細胞傷害性 CD8⁺T 細胞の誘導（クロスプライミング）機構について検討した。その結果、DC を *P. g* で刺激すると CD86 発現が亢進されると共に、クロスプレゼンテーション誘導が増強された。対して、fimbriae はクロスプレゼンテーションを抑制させたことから、クロスプライミングを回避する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined the induction of DC-mediated cross-priming upon *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) stimulation *in vitro*. The stimulation of DCs with *P. g* induced the upregulation of Ag cross-presentation and of CD86. The enhancement of DC-mediated cross-priming by *P. g* was suppressed upon co-stimulation with *P. g*-derived fimbriae. These results may suggest that *P. g* could evade the induction of DC-mediated cross-priming.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：慢性歯周炎、樹状細胞、サイトカイン、クロスプライミング

1. 研究開始当初の背景

（1）慢性歯周炎は、歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*)を中心とした感染症であり、慢性炎症により徐々に歯周組織が破壊されることにより歯の喪失に至る。歯周炎が慢性炎症に至る原因として、*P. g*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*や *Treponema denticola* など主要な歯周病原性細菌が歯肉上皮細胞に侵入し、免疫応答による排除を逃れ歯周組織に定着することが示唆されているが、その分子機構には不明な点が多い。上皮細胞内に侵入した病原体の排除は、抗原提示細胞である樹状細胞（dendritic cell, DC）による MHC クラス I を介した細胞

傷害性 CD8⁺ T 細胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)の誘導（クロスプライミング）が必要である。慢性歯周炎患者の歯周組織には多くの CD8⁺T 細胞の浸潤が観察され、成熟化した DC が歯肉粘膜固有層に遊走することから、*P. g* に対するクロスプライミング誘導メカニズムが存在する可能性が示唆される。

（2）DC は自然免疫に関わる C 型レクチンレセプターである DC-specific intracellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)を発現する。DC-SIGN は慢性歯周炎患者の歯肉上皮直下にある歯肉粘膜固有層において発現が亢進しており、周囲に

CD8⁺T 細胞が浸潤することが示されている。一方、*P. g*はその細菌細胞壁を構成する線毛 (fimbriae)を介して上皮細胞の $\alpha 5\beta 1$ インテグリンと結合することにより、細胞質に侵入することが明らかにされている。Fimbriae は DC-SIGN により認識されることにより、Th1 および Th2 応答が増強されることが示唆されているが、*P. g*による DC-SIGN を介したクロスプライミング誘導の分子機構は不明であった。

(3) 我々の研究から、DC によるクロスプライミングの誘導は、*P. g*を含むほぼすべての細菌細胞壁を構成するペプチドグリカンの最小活性構造である iE-DAP およびムラミルジペプチドを認識する自然免疫レセプターである Nod1 および Nod2 を介したシグナル伝達により著明に増強されることが判明していた。同知見より、*P. g*により DC-SIGN を介して DC が活性化され、クロスプライミング誘導が増強される作業仮説を着想した。歯肉上皮細胞に侵入した *P. g*に対する効率的なクロスプライミング誘導機構が確立されることにより、歯周炎の慢性化を終息させる治療法開発の基盤となることが期待される。

2. 研究の目的

歯肉上皮細胞への *P. g*の侵入は、歯周炎における慢性炎症を引き起こす可能性が考えられる。細胞に侵入した病原体を排除するには、DC を介したクロスプライミング誘導が必要である。本研究は、*P. g*による DC を介したクロスプライミング誘導に関わる分子機構を解明することで、歯周炎が慢性炎症に至る病態機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

C57BL/6 野生型マウスは、日本クレアより購入した。すべてのマウスは SPF 環境下で維持し、8~12 週齢で実験に供試した。すべての実験は国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程により定める東北大学動物実験委員会ならびに研究倫理委員会の審査・承認を経た上で、東北大学動物実験指針を遵守し遂行した。

(2) 細胞

DC は、*in vivo* 系は脾臓細胞、*in vitro* 系は 10 ng/ml GM-CSF にて 6 日間培養した骨髓細胞を抗マウス CD11c 磁気標識抗体で処理後、磁気分離法にてそれぞれ精製した。Ovalbumin (OVA)ペプチド特異的 CD8⁺T 細

胞株 B3Z は、N. Shastri 博士 (University of California)より分与された。また、ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株 Ca9-22 (JCRB 細胞バンク)を供試した。

(3) *P. g* および菌体成分

凍結乾燥化した *P. g* W83 株ならびに ATCC 33277 株の全菌体を供試した。*P. g*由来精製 fimbriae ならびに *P. g*合成リポペプチド (PGTP2)は、島内英俊博士および小川知彦博士より分与された。非メチル化 CpG DNA (CpG)は ODN1668 を供試した。

(4) DC の CD86 発現ならびにクロスプレゼンテーション誘導の解析

*P. g*を投与したマウス脾臓から精製した DC (SDC)、ないし *P. g*で刺激したマウス骨髓細胞由来 DC (BMDC)を抗マウス CD11c 抗体ないし CD86 抗体で処理後、CD86 発現をフローサイトメトリー法にて解析した。DC におけるクロスプレゼンテーション誘導は、OVA を添加した DC を MHC クラス I-OVA 由来ペプチド複合体発現を認識する抗体 (クローン 25D1.16)で処理後、同法にて解析した。

(5) DC によるクロスプライミング誘導の解析

DC と共に培養した B3Z を 0.5% NP-40 で溶解後、同細胞に発現する IL-2/lac Z 活性を 0.15 mM chlorophenolred- β -galactopyranoside sodium を基質として解析した。

(6) IL-33 mRNA の検出

Ca9-22 を *P. g*全菌体で刺激後に精製した total RNA を cDNA に逆転写後、IL-33 mRNA 発現量を SYBR green を用いたリアルタイム PCR 法にて解析した。

4. 研究成果

(1) *P. g*による DC における共刺激分子発現誘導

細菌に感染した細胞は、共刺激分子を発現しておらず、直接 T 細胞を活性化することができない。DC は、細胞内寄生細菌、感染細胞、ウイルスや癌細胞を外来性抗原として認識し、貪食することにより活性化する。活性化 DC は貪食した外来性抗原を分解し、MHC クラス I 分子を介してナイーブ CD8⁺T 細胞に提示する、クロスプレゼンテーションを誘導することができる。クロスプレゼンテーションと共刺激分子のシグナルを受け取ったナイーブ CD8⁺T 細胞は活性化され、抗原特

異的 CTL へ分化誘導される (クロスプライミング)。一方、慢性歯周病患者の歯周組織には、CD8⁺T 細胞の浸潤とともに成熟化 DC が歯肉粘膜固有層に遊走することが示されている (*J. Immunol.* 167:4693, 2001)。そこで、野生型マウスに *P. g* 加熱死菌全菌体を投与 12 時間後の SDC の共刺激分子 CD86 発現について測定した。その結果、*P. g* により SDC における CD86 発現が亢進されることが示された (図 1)。さらに、BMDC を *P. g* で 12 時間刺激すると、CD86 発現は著明に亢進された。

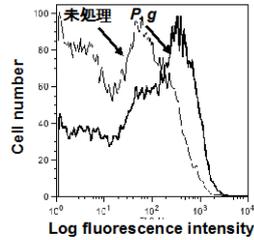


図1 *P. g* 投与後 CD86 発現の増強

(2) *P. g* による DC におけるクロスプレゼンテーション増強作用

次に、*P. g* による DC におけるクロスプレゼンテーション誘導作用について、BMDC に OVA を添加した際に提示される MHC クラス I-OVA ペプチド複合体発現を測定した。その結果、OVA 添加 BMDC を *P. g* 加熱死菌で 12 時間前刺激すると、クロスプレゼンテーション誘導が増強された (図 2)。*P. g* により DC における CD86 発現ならびにクロスプレゼンテーション誘導が増強されたこ

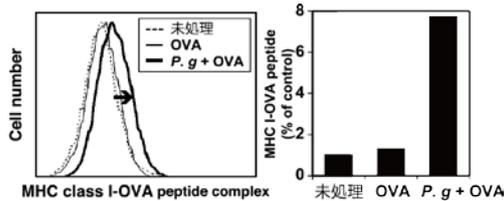


図2 *P. g* によるクロスプレゼンテーション増強作用

とから、クロスプライミング誘導が増強される可能性が示唆された。

(3) *P. g* 由来菌体成分による DC における共刺激分子発現誘導

P. g の細胞壁構成成分である線毛 (fimbriae) ならびにリポタンパクは、本菌の主要な病原作用を担うことが明らかにされている。そこで、*P. g* による CD86 発現の亢進作用について、BMDC を 10 μ g/ml fimbriae および 10 μ g/ml PGTP2 で刺激した結果、CD86 の著明な発現亢進がみられた (図 3)。しかしながら、これらの菌体成分による BMDC にお

けるクロスプレゼンテーション増強はみられなかった。

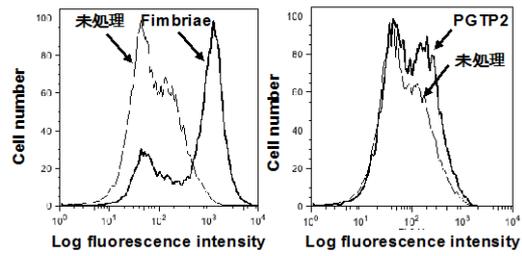


図3 Fimbriae 及び PGTP2 刺激 DC における CD86 発現の増強

(4) Fimbriae によるクロスプライミング抑制作用

P. g と同様に細胞内寄生細菌である *Mycobacterium tuberculosis* に対する DC によるクロスプライミング誘導は、CpG による Toll-like receptor (TLR)9 を介した IFN- α / β 生産により増強される (*J. Immunol.* 185:2405-2415 (2010))。しかしながら、同菌の持つ TLR2 アゴニストであるリポタンパクは、IFN- α / β 生産を低下させることによりクロスプライミングを抑制させることが示されている。(3) の結果より fimbriae によるクロスプレゼンテーション増強作用はみられず、fimbriae は DC に発現する TLR2 により認識される (*J. Periodontal Res.* 44:543-549 (2009)) ことから、*P. g* 全菌体によるクロスプライミング誘導が fimbriae により抑制される可能性について検討した。50 μ g/ml OVA を添加した BMDC を B3Z と共培養し、B3Z のクロスプライミング誘導を IL-2/lac Z 活性を指標として評価した。その結果、1 μ g/ml ODN1668 を 12 時間刺激した OVA 添加 BMDC によるクロスプライミング誘導は、0.1~10 μ g/ml fimbriae を同時に添加することにより有意に抑制されることが明らかとなった。

(5) *P. g* による歯肉上皮細胞における IL-33 発現誘導

IL-1 ファミリーサイトカインである IL-33 は主として上皮細胞に発現し、Th2 サイトカイン生産を促進させることでアレルギー性炎症の誘導を司る。近年、感染した上皮細胞から放出された IL-33 が、CTL の分化誘導を促進させることが明らかにされている (*Science* 335:984-989 (2012))。そこで、*P. g* により歯肉上皮細胞から IL-33 が誘導される可能性について検討した。Ca9-22 を *P. g* 全菌体で刺激した結果、IL-33 mRNA 発現が著明に亢進された。*P. g* から生産されるシステインプロテアーゼであるジンジパインの阻

害剤を *P. g* 全菌体に前処理すると、IL-33 mRNA 誘導の亢進作用は完全に消失することを見出した。これらの研究成果から *P. g* により歯肉上皮細胞から生産された IL-33 が、DC を介したクロスプライミング誘導を増強させる可能性が示唆された。

(1) ~ (5) の結果より、DC によるクロスプライミング誘導は、*P. g* の刺激により増強された。一方、CpG によるクロスプライミング誘導の増強は、fimbriae により抑制されたことから、今後 *P. g* による fimbriae を介したクロスプライミング回避機構について検討する必要がある。さらに、*P. g* により歯肉上皮細胞から誘導される IL-33 は CTL および Th2 応答を誘導する作用を示すことが示されている。これらの免疫応答は合目的に *P. g* による慢性炎症の原因になることが想定され、今後の検討課題といえる。

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 3 件)

- ① 多田浩之、島内英俊、松下健二 *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによるヒト歯肉上皮細胞における IL-33 発現誘導. エンドトキシン・自然免疫研究 15 p45-48 (2012). 査読無
- ② Tada H, Nemoto E, Foster BL, Somerman MJ, Shimauchi H. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. Bone 48, 1409-1416 (2011). DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.03.675> 査読有
- ③ Nemoto E, Tada H, Shimauchi H. Extracellular phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression in human dental pulp cells and human periodontal ligament cells. Interface Oral Health Science 2011 p143-144 (2011). 査読無

[学会発表] (計 7 件)

- ① 多田浩之、松下健二、松山孝司、野口和行、島内英俊、清浦有祐 ジンジパインによるアレルギー性サイトカイン誘導をターゲットとしたアレルギー疾患の制御. 日本歯科医学会 第 29 回「歯科

医学を中心とした総合的な研究を推進する集い (平成 24 年度)」 2013 年 1 月 12 日、東京

- ② 多田浩之、清浦有祐 ジンジパインによるヒト歯肉上皮細胞からの IL-33 発現誘導. 第 54 回奥羽大学歯学会 2012 年 11 月 10 日、福島
- ③ 多田浩之、島内英俊、松下健二 *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによるヒト歯肉上皮細胞の interleukin-33 発現誘導. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2012 年 9 月 16 日、福島
- ④ 多田浩之、島内英俊、松下健二 *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインはヒト歯肉上皮細胞から IL-33 を誘導する. 第 55 回秋季日本歯周病学会学術大会 2012 年 9 月 6 日、茨城
- ⑤ Tada H, Shimauchi H, Matsushita K. Expression of interleukin-33 induced by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival epithelial cells. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and related bacterial species. 2012 年 8 月 27 日、長崎
- ⑥ 多田浩之、島内英俊、松下健二 *Porphyromonas gingivalis* によるヒト歯肉上皮細胞からの interleukin-33 発現誘導. 第 136 回日本歯科保存学会春季学術大会 2012 年 6 月 28 日、沖縄
- ⑦ 多田浩之、島内英俊、松下健二 *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによるヒト歯肉上皮細胞のアレルギー誘導性サイトカインの発現機構. 第 17 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2011 年 12 月 10 日、兵庫

[その他]

平成 24 年度日本歯科保存学会奨励賞 受賞
2012 年 6 月 28 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 浩之 (TADA HIROYUKI)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号：70431632