

## 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25年 5月17日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890217

研究課題名（和文）マウス歯周病モデルを用いた Th17 細胞の歯周疾患と骨免疫機構への関与

研究課題名（英文）Characterization of immunoregulation by Th17 cell on Periodontal disease model

## 研究代表者

小林 良喜 (KOBAYASHI RYOKI)

日本大学・松戸歯学部・助手（専任扱）

研究者番号：10609085

研究成果の概要（和文）：本研究では *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* による歯周炎発症における Th17 細胞の役割を解明する為に、Th17 細胞及び関連分子について、特に口腔免疫機構と骨免疫機構間のネットワークを中心に細胞および分子レベルでの解析を行う。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the mechanism of Periodontal diseases, we characterized the immunoregulatory effect by Th17 cells in the inflamed gingiva of mice with alveolar bone resorption. In this study, we employ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, one of the higher risk factors for induce of inflammation to gingiva and alveolar bone loss.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	330,000	1,330,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	690,000	2,890,000

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：感染症・免疫学・歯周疾患・TH17・口腔粘膜

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病原性細菌によって惹起される炎症性疾患であることが知られているが、その発症には炎症歯周組織における宿主細胞の免疫反応も大きく関与すると考えられている。しかしながら、宿主側の炎症・免疫反応が持続するメカニズムについては不明な点が多く残されている。

歯周病原性細菌は様々な病原因子を産生して生体の防護機構を回避する。歯周ポケットに定着・増殖し、バイオフィルムを形成することで歯周組織に持続的な炎症・免疫反応を惹起させる。通性嫌気性グラム陰性菌であ

る *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) は侵襲性歯周炎に多く検出され、Leukotoxin・白血球走化性阻害因子・免疫抑制因子などの産生が報告されている。なかでも、*A. a.* が産生する細胞膨化致死毒素 (Cytolethal distending toxin; CDT) は T 細胞の細胞周期を停止させ、免疫機能に異常を誘導することが知られている。

歯周病の炎症誘導機序に関して、近年、炎症誘発性サイトカインである IL-17 を分泌するヘルパー T (Th) 17 細胞の関与が報告されている。Th17 細胞は一般に Th1、Th2 細胞の分化を抑制することが知られ、直接・間接的に破骨細胞形

成を促進し、骨破壊にも密接に関与することが示唆されている。Th17 細胞の出現により、これまで考えられてきた T 細胞介在性炎症の全面的な見直しが必要となっており、マウス関節炎モデルや早期関節炎患者においては役割の解明が進んでいる。しかしながら、歯周疾患における Th17 細胞の動態はまだ解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では *A. a.* の口腔感染による歯肉炎症巣における Th17 細胞の動態を 1) ナイーブ T 細胞から Th17 細胞への分化、2) 破骨細胞分化への関与、さらに、3) *A. actinomycetemcomitans* 口腔感染マウスの歯肉粘膜抗原提示細胞による Th17 細胞への誘導機序を細胞および分子レベルで解析を加える。

## 3. 研究の方法

【平成 23 年度】

### *A. a.* による口腔感染マウスの歯周組織炎症の検討

申請者らは *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) 用いた口腔感染により歯周炎モデルマウスの系を既に確立している。そこでこの歯周病モデルの系を応用して、以下の実験を行う。

- ①野生型 BALB/c マウスに  $10^8$  cfu の *A. a.* を口腔感染させる。適切な条件(感染回数)はこれまでの実験結果を参考にし、予備実験を行って決定する。対照群は擬似感染マウスとし、抗生物質の前投与および、*A. a.* を含まないカルボキシメチルセルロースを接種させる。
- ②口腔感染後の体重変化、下痢の有無等を観察する。
- ③最終感染から 30 日後に血清、および粘膜分泌物(唾液、糞便)中の *A. a.* 特異的抗体価を ELISA 法で検討する。
- ④ *A. actinomycetemcomitans* 口腔感染による歯槽骨吸収の度合いを測定するために、マウスを安楽死することなしに CT 撮影が可能な小動物用のマイクロ CT(現有)を用いて、歯槽骨の骨密度ならびに歯槽骨吸収について、*A. a.* 口腔感染後、経時的に解析を加える。
- ⑤ *A. a.* 口腔感染による歯肉単核細胞(Gingival mononuclear cell; GMC)の動態を経時的に解析する為に歯肉、唾液腺、脾臓よりリンパ球を単離し、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、およびマクロファージについて、免疫組織染色(共焦点顕微鏡、現有)、フローサイトメトリー(現有)により明らかにする。
- ⑥ Th サブセットと炎症性サイトカインを測定するため、*A. a.* 口腔感染マウスの歯肉、唾液腺、脾臓より GMC を単離し、CD4<sup>+</sup>T 細胞増殖活性および細胞内染色によるフローサイトメトリー解析により Th1 (IFN- $\gamma$ )、Th2 (IL-4)、Th17 (IL-17) タイプ、および Treg 細胞の発現頻度、炎症性サイトカイン(IL-1  $\square$  IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ ) を解析する。また、マイクロダイセクション(現有)を用いて炎症歯周組織の特定部位を組織切片上から切断・分離し、RNA を採取することにより、定量性リアルタイム PCR 法により解析する。
- ⑦経時変化を解析するため、最終感染から 1、7、15、30 日目に⑤、⑥で記載した解析を行う。

【平成 24 年度】

### *A. a.* 口腔感染マウスの歯肉粘膜の抗原提示

### 細胞がもつ Th17 細胞への誘導能の検討

限局性侵襲性歯周炎の原因となる、*A. a.* は leukotoxin などを産生し、宿主側の免疫応答を抑制することが知られている。そこで、炎症歯肉粘膜組織中の抗原提示細胞による Th17 細胞への抗原提示能を確認する為に *A. a.* 口腔感染マウスを用い、以下の実験を行う。

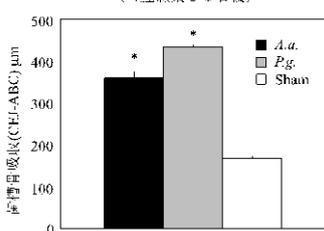
- ① *A. a.* 口腔感染後、樹状細胞の動向(細胞サブセット、ケモカイン、ケモカインレセプターの発現等)、活性化(CD40、CD80、CD86、MHC クラス II などの分子、サイトカイン産生)について、免疫組織染色(共焦点顕微鏡、現有)、フローサイトメトリー法(現有)を行う。
- ② *A. a.* 口腔感染マウス歯肉粘膜組織と脾臓から CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞を磁気細胞分離システム(AutoMACS、現有)にて抽出し、ナイーブ野生型 BALB/c マウスの脾臓から抽出したナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養する事でその機能を測定する。適切な培養条件(細胞数、期間)は予備実験を行い決定する。
- ③実験群には、熱処理した *A. a.* の whole cell を添加し、無添加を対称群とする。
- ④培養後、T 細胞応答を測定するために、 $^3$ H]チミジンの取り込みによる CD4<sup>+</sup>T 細胞増殖活性能を行う。
- ⑤同時に、浮遊細胞ならびに上清を採取し、細胞内染色によるフローサイトメトリー解析、RNA を抽出することによる定量性リアルタイム PCR 法、そして ELISA 法にて Th1 (IFN- $\gamma$ )、Th2 (IL-4)、Th17 (IL-17) および Treg 細胞について解析を行う。
- ⑥経時変化を解析するため、最終感染から 1、7、15、30 日目に①、④と⑤で記載した解析を行う。

## 4. 研究成果

本研究では *A. a.* による歯周炎発症における Th17 細胞の役割を解明する為に、Th17 細胞及び関連分子について、特に口腔免疫機構と骨免疫機構間のネットワークを中心に細胞および分子レベルでの解析を行うにあたり、申請者らが確立した、*P. g.* を用いた歯周病モデルマウスの系を応用した。

*A. a.* の最終口腔感染から 30 日後に炭酸ガス

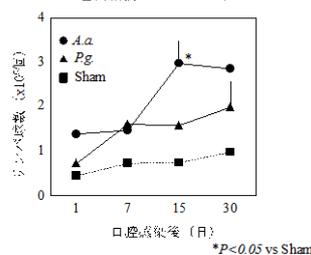
図 1  
マウス歯槽骨吸収量  
(口腔感染 30 日後)



\* $P < 0.01$  vs Sham

にて安楽死させ、マウス上顎骨から軟組織を除去し、マウス歯槽骨吸収を検討したところ、*A. a.* 口腔感染群において顕著な歯槽骨吸収が生じていた(図 1)が、リアルタイム PCR を用いて *A. a.* 口腔感染群マウスの歯肉粘膜組織より産生される炎症性サイトカイン(IL-6、TNF- $\alpha$ )を計測したところ疑似感染群とほぼ同程度であった。*A. a.* 口腔感染群マウスの歯肉単核細胞(Gingival mononuclear cell; GMC)の動態を経時的に解析する為に歯肉粘膜組織より GMC を単離し、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、およびマクロファージについて、フローサイトメトリーを用いて解析したところ、*P. g.* 口腔感染群と比べてマクロファージの顕著な増加(図 2)や、活性化型 CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の顕著な増加を認め、さらに、活性化型 CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は破骨細胞を活性化さ

図2 マウス歯肉粘膜中のマクロファージ

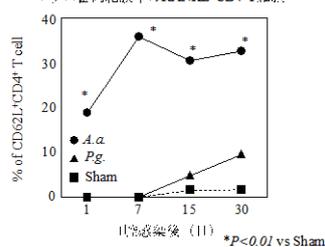


せる RANKL の発現が経時的に増加していることが認められた(図3)。これからの結果から、*A. a.* 口腔感染により歯肉粘膜に炎症を惹起させずとも口腔

粘膜組織中に RANKL<sup>+</sup>活性化型 CD4<sup>+</sup>T 細胞の誘導したことで顕著な歯槽骨吸収が生じたと考えられる。

歯周病原菌の感染による炎症歯肉から惹起された歯槽骨吸収のメカニズムを検討するために、より病原性の強い *P. g.* 口腔感染マウスの歯肉粘膜組織を用いて解析を行ったところ、歯肉炎症

図3 マウス歯肉粘膜中のRANKL<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞



巣に遊走された樹状細胞から Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T (Treg) 細胞を誘導させるサイトカイン (TGF-β) とレチノイン酸 (RA) が顕著に産生されていることを確認した(論文1)。このことから、本研究は歯周病原性細菌により誘発された歯肉炎症を介した歯槽骨吸収の機序の解明に寄与したと考えられる。

## 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1件)

① Kobayashi, R., T. Ochiai, T. Hashizume-Takizawa, K. Fujihashi and M. Yamamoto. Characterization of Inflammation-derived CD11c<sup>+</sup> Dendritic cells in Periodontal disease mouse model. 2012 *Int. J. Oral-Med. Sci.* 2013. 11(4) 300-306.

[学会発表] (計3件)

① Kobayashi, R. and M. Yamamoto. Increased Numbers of ICAM-1<sup>+</sup> Dendritic Cells and CD4<sup>+</sup> Treg Cells in Inflamed Gingiva with Bone Loss. 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology. (Gifu, Japan)

② Kobayashi, R., S. Yuzawa, T. Hashizume, T. Ochiai and M. Yamamoto. Induction of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg cell by inflammatory-induced gingival dendritic cells. *International Associations for Dental Research* (Fos do Iguacus, Brazil)

③ Kobayashi, R., T. Ochiai, T. Hashizume<sup>1</sup>, K. Fujihashi, and M. Yamamoto. Severe Periodontal tissue damaged by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in

mouse model. 41<sup>st</sup> Japanese Society for Immunologist (Kobe, Japan)

[その他]

ホームページ等

[http://www.mascac.nihon-u.ac.jp/courses/cr01\\_4\\_immune.html](http://www.mascac.nihon-u.ac.jp/courses/cr01_4_immune.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 良喜 (KOBAYASHI RYOKI)

日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)

研究者番号: 10609085