

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861781

研究課題名(和文) マウス歯周病モデルを用いた粘膜型肥満細胞の歯周疾患と骨免疫機構への関与の解明

研究課題名(英文) Characterisation of mucosal-type mast cell in Periodontal disease mouse 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯周病原性細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) による歯周炎発症機序を解析するために、粘膜型肥満細胞の動態を中心とした自然免疫機構の関与について解析を行う。特に、口腔免疫機構と骨免疫機構間のネットワークについて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)：To clarify the mechanisms of Periodontal diseases which induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), we characterised the mucosal-type mast cell (MMC) in the inflamed gingiva of mice with severe alveolar bone loss.

研究分野：口腔免疫

キーワード：口腔免疫 粘膜免疫 歯周病

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、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。これまでに、申請者らが確立した歯周病モデルマウスの解析により歯肉炎症巣におけるエフェクター細胞の経時的变化が認められたが歯肉炎症巣の樹状細胞を解析した結果、歯周病原性細菌感染後Th17細胞を誘導するIL-6とTGF-β特異的mRNAが高頻度に発現し、経時的にIL-6特異的mRNAは減少するが、RALDH-2特異的mRNAが増加していることをリアルタイムPCR法により確認できた。これにより、歯肉炎症巣局所におけるエフェクターT細胞や分化・誘導を担う樹状細胞の詳細な検討を行うことができた。この結果から慢性炎症を想定した病態の解析は可能であるが炎症誘導の初期に関わる細胞動態を検討する必要があると考えた。近年、肥満細胞による炎症誘導機構が考えられ、特に粘膜組織に局在する粘膜型肥満細胞による粘膜組織の慢性炎症誘導機構が炎症性腸疾患モデルにより報告された。このことから、口腔粘膜組織に局在する肥満細胞も細菌感染により誘導される炎症惹起する可能性を考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、歯周炎の発症機序を粘膜型肥満細胞を中心とした自然免疫機構より解明することを目的とする。近年、肥満細胞はアレルギーの誘発に関わるだけでなく、異物の貪食能や抗原提示能が報告され、活性化した肥満細胞による炎症性腸疾患が誘発されるという報告からも粘膜組織に局在する粘膜型肥満細胞はアレルギーの誘発だけでなく、炎症の重篤化にも関わることを考えられる。歯周病原性細菌による歯周炎症の誘発機序を解明し新たな治療法を確立することは、これからの超

高齢化社会における予防歯科治療を行う上で多大な期待ができると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)口腔感染により生じた歯肉炎症巣における歯槽骨吸収のメカニズムを解析するため、細菌感染により誘発された歯肉炎の症巣における粘膜型肥満細胞の動態の解明を目的とする。Aa口腔感染させたマウス(BALB/c, 6-7週齢)の口腔粘膜組織において経時的解析を行う。炎症歯肉粘膜組織における特定の遺伝子およびタンパク質の変化を解析し、炎症誘発および重篤化に深く関与する因子の同定を試みる。得られた因子を炎症誘発および重篤化マーカーと捉えることができた場合、将来的に炎症進行度の判定することも可能である。歯周炎の判定は、主に「炎症性サイトカイン」と「歯槽骨吸収度」で評価する。

【平成25年度】

1) 歯周炎症誘発への関与えお病理学的/免疫学的変化から解析する。

歯周病原性細菌による歯周疾患の誘発機序を肥満細胞の動態を中心とした自然免疫機構の関与を解明するために、下記の研究計画を設定した。これまでに *Porphyromonas gingivalis* (Pg)を用いた口腔感染による歯周炎モデルマウスを確立しているので、この実験系を応用して以下の実験を行う。

A. 歯周炎モデルマウスの構築

BALB/cマウスにAa (10^8 cfu)を口腔感染させる。疑似感染群としてAaを含まないカルボキシルメチルセルロースのみを接種させる。

B. 体重変化の測定

Aaの口腔感染開始後から体重の経時的变化や下痢の有無を観察する。

C. 病理組織学的検査

① Aa感染群、対処群を最終感染から30日後に歯槽骨吸収の程度の解析を行う。

② 口腔粘膜組織を顎骨ごとホルマリン溶液にて固定し、パラフィンに埋入し組織切片を作製する。得られた組織切片はHE染色を基本に観察し、必要に応じて免疫蛍光染色法により肥満細胞について解析する。

2) Aa口腔感染に対する自然免疫機構(粘膜型肥満細胞)の動態を解析する。

A. 免疫応答の解析

① Aa口腔感染による歯肉炎症巣の細胞動態を経時的に解析するために、歯肉単核細胞(Gingival mononuclear cell; GMC)を単離し、フローサイトメトリーにより解析する。

② 同時に、血液、唾液または歯肉粘膜組織のホモジネートをサンプルとしてELISA法にてケモカイン(MCP-1)を中心に解析する。

③ 炎症歯肉粘膜組織から単離したGMCの全RNAを精製し、テンプレートとしてリアルタイムPCR法を行う。

【平成26年度】

3) Aa口腔感染マウスの歯周炎症巣における破骨細胞の活性化機序の解析

① Aa口腔感染後、粘膜型肥満細胞の動向について、活性化マーカー、ケモカインレセプターの発現などをフローサイトメーターや免疫組織染色法にて解析を行う。

② 磁気細胞分離システム(AutoMACS)にて炎症歯肉粘膜組織より抽出した粘膜型肥満細胞を破骨細胞と共培養し、活性化させる経路を検討する。適切な培養条件は予備実験を行い決定する。

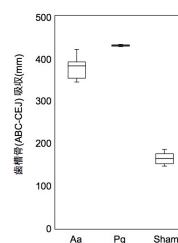
③ 培養後、細胞ならびに培養上清を採取し、細胞内核染色によるフローサイトメトリー法や定量性リアルタイムPCR法、ELISA法をもちいてサイトカイン(IL-1、IL-6、TNF- α)、ケモカイン(MCP-1)について解析を行う。

4. 研究成果

本研究ではAaによる歯周炎発症における粘膜型肥満細胞の役割を解明するため、肥満細胞関連分子について、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、申請者が確立したPgを用いた歯周病モデルマウスを応用した。Aa口腔感染により歯周病モデルマウスを作製するにあたり、最終感染から30日後に炭酸ガスにて安楽死させ、マウス上顎骨から軟組織を除去し歯槽骨吸収を検討したところAa感染群においてPg感染群と同程度の歯槽骨吸収を認めることができた(図1)。次に、歯周病

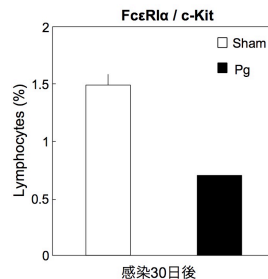
図1. マウス歯槽骨吸収(口腔感染30日後)



原性細菌の口腔感染後に歯肉組織から各細菌の定着を16S rRNAの検出をリアルタイムPCR

にて検討したところ、Aa感染マウスでは認めることができなかった。このことから、歯周病原性細菌感染による感染部位にて菌体の再検出が可能であるPgを用いることで、再現性のある歯周病モデルマウスの解析が可能であるので、Pgの口腔感染により作製した歯周病モデルマウスにより歯肉炎症巣に局在する肥満細胞を検討した。Pg (10⁸cfu/mouse)を2週間連続で口腔感染させ、最終感染から30日後に単離したGMCからFceRI α ⁺/c-Kit⁺肥満細胞をフローサイトメーターを用いて検討したところ、Sham群より有意に減少していることが認められた(図2)。細菌感染による宿主側の免疫応答として肥満細胞

図2. マウス歯肉粘膜組織中の肥満細胞

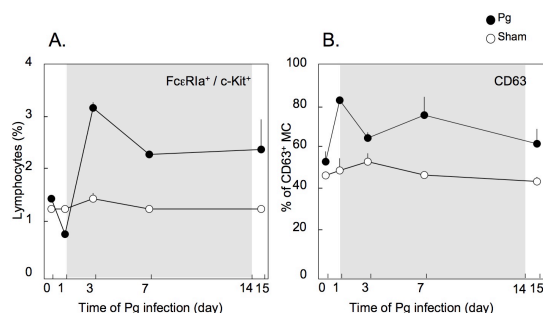


は比較的早期に応答が認められる自然免疫機構の一端を担うと考えられるので、Pg感染開始直後から炎症歯

肉巣から単離したGMCを用いてフローサイトメーターに検討を行った。Pg口腔感染開始1日後ではSham群と比較して減少していた。しかし、感染開始から3日後からMCの発現はSham群と比較して有意に増加していること

が認められた(図3A)。MCはPg感染後より増加し、感染期間はSham群と比較して増加していることが観察された。他方で、感染後より歯肉炎症巣におけるMCの発現は減少していることから、MCの遊走は歯周病原性細菌の持続的感染によるもと考えられる。次に、細菌感染肩の生体防御の一端を担う肥満細胞の活性化を検討するために、脱顆粒マーカー(CD63)の発現を解析した。Pg口腔感染開始直後の歯肉炎症巣から単離したGMCをフローサイトメーターを用いて検討したところ、興味深いことにPgの口腔感染開始直後からMCから有意に増加したCD63の発現を認めた(図3B)。このことから、本研究は歯周病原性細菌により歯肉炎症を誘発した歯周病モデルマウスを解析することで、細菌感染により誘発された歯肉炎症巣への肥満細胞の遊走認めることができた。さらに、活性化した肥満細胞から顕著な脱顆粒を認めた。宿主側における歯肉炎症初期の炎症誘導機序を解明することは、歯槽骨吸収に至る慢性炎症を制御することが考えられるので今後の予防・治療法の確率のために寄与することとなり大きな意義があると考えられる。

図3. マウス歯肉粘膜組織中の肥満細胞の動態



あると考えられる。

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0件)

[学会発表] (計3件)

- ① Kobayashi R., K. Fujihashi and T. Ochiai. Characterization of Mast cell in inflamed gingiva in mouse model. 17th International

Congress of Mucosal Immunology (Berlin, Germany) 2015年7月14-18日

- ② Kobayashi R., K. Fujihashi, M. Yamamoto and T. Ochiai. Characterization of RANKL⁺CD4⁺ T cell in inflamed gingiva of periodontal disease mouse model. 1st Japanese Conference on Osteoimmunology (Okinawa, Japan) 2014年7月1-4日.

- ③ Kobayashi R., T. Ochiai, T. Hashizume, K. Fujihashi and M. Yamamoto. Inflamed gingiva driven CD103 negative dendritic cell are differentiate to Foxp3⁺ Treg cell in Periodontal disease mouse model. *American Association for Immunologists Annual Meeting* (Pittsburgh, Pennsylvania, USA) 2014年5月2-6日.

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.mascats.nihon-u.ac.jp/courses/each_courses/micro/

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 : 1 0 6 0 9 0 8 5