

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2007～2008
課題番号：	19592384
研究課題名(和文)	制御性細胞の歯周炎病態への関与－慢性化メカニズムを探る－
研究課題名(英文)	Involvement of regulatory cells in pathogenesis of periodontitis -mechanism for chronicity-
研究代表者	中島 貴子 (NAKAJIMA TAKAKO) 新潟大学・医歯学総合病院・講師 研究者番号：40303143

研究成果の概要：歯周炎における制御性細胞サブセットの存在実態と機能、相互作用の解明を目指した。ヒト歯周炎歯肉組織のB細胞浸潤優性領域からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション-RT-リアルタイムPCR法にて抗炎症性サイトカインIL-10の遺伝子発現を検出し、制御性B細胞サブセットの存在が示唆された。また、ヒト歯周炎歯肉では歯肉炎に比較して骨吸収関連サイトカインIL-17Aの発現が有意に高かった。しかしCD19とIL-17Aの発現には相関が認められないがIL-10とは相関が認められたことより、B細胞浸潤が著しく優勢な組織は急激な骨吸収よりも炎症の安定恒常化に傾いてる可能性が示唆された。歯周炎における制御性細胞サブセットの*in vivo*機能解析をすすめるため、口腔からの*Porphyromonas gingivalis*感染によるマウス歯周炎モデルを確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：歯周免疫機能学・制御性細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周病は慢性感染症であり、40歳以上の日本国民の80%以上が罹患している生活習慣病であり、動脈硬化性疾患との相関も指摘されている。高齢者の生活の質向上と医療費抑制のため、歯周病の病態形成メカニズムが解明が

必要とされている。我々は歯周病の自己免疫的側面と慢性化や緩慢な進行を考えたときに、制御性細胞が病態の決定に関係しているのではないかと考え、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞(Nakajima *et al.* J Dent Res. 2005)とVα24インバリアントNKT細胞(Amanuma *et al.* J

Periodont Res. 2006)の2種類の制御性サブセットに着目して歯周炎への関与を検討、報告した。歯周炎歯肉組織で最も優勢に浸潤が認められるのはB細胞であるが、最近、第3の制御性細胞として制御性B細胞の存在が示された(Serra *et al.* Trend Immunol. 2006)。歯周炎歯肉組織にはNKT細胞と隣接してCD1d陽性のB細胞が存在する。制御性B細胞はCD1dの発現がその特徴である(Mizoguchi *et al.* J Immunol. 2002)。以上より、歯周炎組織のCD1d陽性B細胞はIL-10産生制御性B細胞であり、かつ同じく制御性に働くNKT細胞を活性化するのであろうか?という疑問が生じた。さらに「細菌感染を排除しきれず炎症が継続し、かつ急速ではなく緩慢に歯周組織破壊が進行する歯周炎では、3種類の制御性細胞サブセット(制御性T細胞, NKT細胞, 制御性B細胞)が相互に影響しあい、また制御性サブセットと効果細胞サブセットのバランスにより、病態を決定している。」という仮説に至った。

2. 研究の目的

制御性B細胞、制御性T細胞、NKT細胞サブセットそれぞれの、および、相互作用を通しての、歯周炎病態形成への関与を明らかにするために下記3点を解析する。

- (1) 制御性B細胞サブセットのヒト歯周炎組織での存在
- (2) B細胞浸潤の度合いと効果性・制御性細胞サブセット関連のサイトカイン、ケモカイン発現の相関
- (3) 歯周炎における制御性細胞サブセットの*in vivo*機能解析するためのマウス歯周炎モデルの確立

3. 研究の方法

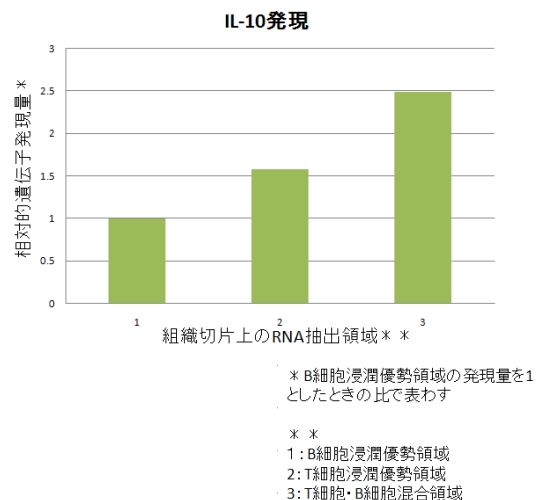
- (1) ヒト歯周炎組織における制御性B細胞サブセットの検索
ヒト歯周炎歯肉組織のB細胞浸潤優勢領域からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション-RT-リアルタイムPCR法にて抗炎症性サイトカインIL-10の遺伝子発現を検出した。
- (2) ヒト歯周炎組織におけるB細胞浸潤と炎症性/恒常性維持ケモカインの発現解析
ヒト慢性歯周炎患者23名、歯肉炎患者20名より歯肉組織を採取し、RT-リアルタイムPCR法によりCD19, IL-17, IL-10, CXCL13, CCL21, CCR4などの効果性・制御性サイトカイン、ケモカインとそのレセプター発現を解析した。
- (3) 歯周炎モデルマウスの作成
C57/BL6マウスに *Porphyromonas gingivalis* W83株を3日ごとに10回、口腔から感染させて、歯槽骨吸収をマイクロCTにより、と歯肉の炎症を脱灰切片のHE染色に

より解析した。この感染マウスを制御性細胞欠損マウスでの歯周炎解析のコントロールモデルとした。

4. 研究成果

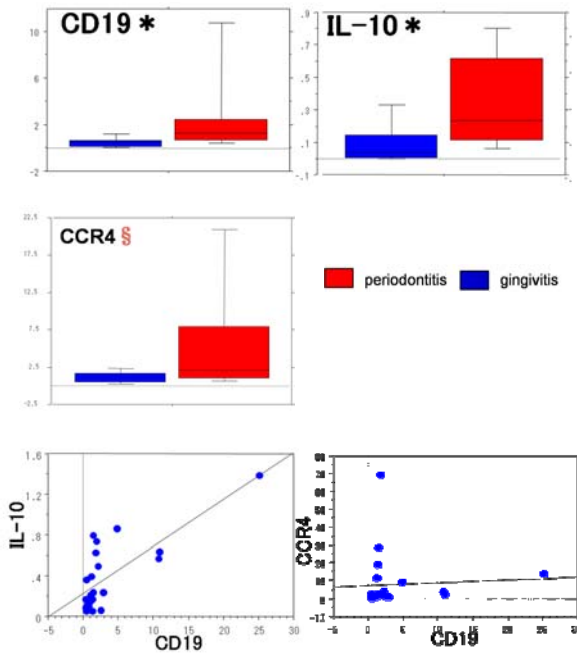
(1) ヒト歯周炎組織における制御性B細胞サブセットの検索

ヒト歯周炎歯肉組織の連続凍結切片を作成し、免疫組織染色にてT細胞・B細胞の分布を明らかにしたのち、歯周ポケット側のB細胞浸潤が優勢な部位からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により細胞を採取した。採取した細胞よりRNAを抽出し、RT-リアルタイムPCR法にて抗炎症サイトカインIL-10の発現を調べた。B細胞浸潤優勢領域からIL-10の遺伝子発現を検出した。



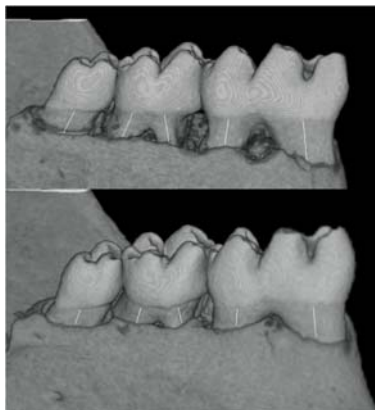
(2) ヒト歯周炎組織におけるB細胞浸潤と炎症性/恒常性維持ケモカインの発現解析

CD19, CXCL13, CXCR5, CCL21, CCL5, CCR4, IL-10, IL-17AのmRNA発現は歯周炎群において歯肉炎群よりも有意に高かった。CXCL13, CXCR5, CCL5, CCR7, CCR6のmRNA発現はCD19発現と有意な正の相関を認めた。一方、IL-17AとCCR4についてはCD19発現との有意な相関は認められなかった。歯周炎組織ではCXCL13, CCL21の増加を認め、炎症の慢性化とともにリンパ節類似の機能を備える可能性が示唆された。CD19とIL-17Aの発現には相関が認められないがIL-10とは相関が認められたことより、B細胞浸潤が著しく優勢な組織は急激な骨吸収よりも炎症の安定恒常化に傾いてる可能性が示唆された。



(3) 歯周炎モデルマウスの作成

作成したマウス歯周炎モデルでは感染群において有意な歯槽骨吸収と炎症性細胞浸潤を認めた。免疫組織染色のための未脱灰切片も作成した。NKT細胞の役割を解析するためのCD1dノックアウトマウスを入手し、増殖のための交配中である



感染群

コントロール群

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 Nakajima T, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Ito H, Takahashi N, Maekawa T, Tabeta K, Yamazaki K. Periodontitis associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase

the risk of coronary heart disease. J Periodont Res 2009 in press

② Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, Tabeta K, Okui T, Kajita K, Domon H, Yamazaki K. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. Clin Chim Acta. Sep; 395(1-2): 137-41; 2008.

③ Nakajima T, Amanuma R, Ueki-Maruyama K, Oda T, Honda T, Ito H, Yamazaki K. CXCL13 expression and follicular dendritic cells in relation to B-cell infiltration in periodontal disease tissues. J Periodont Res. 43(6) Dec : 635-641, 2008

[学会発表] (計 6 件)

① 中島貴子 他 歯周炎が血清中の動脈硬化関連炎症マーカーに及ぼす影響 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会 2008 年 10 月 19 日 四日市

② 奥井隆文, 中島貴子 他 歯周炎組織から樹立した CD4⁺T 細胞ラインにおける Th17 関連分子の解析 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会 2008 年 10 月 19 日 四日市

③ 本田朋之, 中島貴子 他 歯周炎組織における Th17 サイトカイン/マーカーの遺伝子発現解析 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会 2008 年 10 月 19 日 四日市

④ Nakajima T. 他 Lymphoid and inflammatory chemokine expression in chronic periodontitis lesions. 86rd General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research 2008 年 7 月 5 日 Toronto, Canada

⑤ 中島貴子 他 歯周炎組織における炎症性および恒常性維持ケモカインの発現バランス 日本歯科保存学会 2008 年度春季学術大会 2008 年 6 月 5 日 新潟

⑥ Nakajima T. 他 CXCL13 expression in B-cell dominant periodontitis lesions 第 55 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会 2007 年 11 月 17 日 横浜市鶴見区

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 貴子 (NAKAJIMA TAKAKO)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：40303143

(2) 研究分担者

井上 (野澤) 佳世子 (INOUE(NOZAWA)
KAYOKO)

新潟大学・医歯学系・特任准教授

研究者番号：90303130

(3) 連携研究者