

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792113

研究課題名(和文) 歯周炎の病態形成における制御性 T 細胞の関与  
— 遺伝子と機能の発現制御機構に迫る —

研究課題名(英文)

The role of regulatory T cell in Periodontitis regions

研究代表者

伊藤 晴江 (ITO HARUE)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30397145

研究成果の概要(和文)：歯周炎の病原因子として特定の細菌が同定されているが、その発症の時期や進行は宿主側の要因が関与していることが考えられる。近年、宿主側の要因の一つとして CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞(Tr)の関与している可能性が報告されてきた。本研究ではこの CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr に注目して解析を行った。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 細胞を抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で刺激したところその増殖抑制能の減弱が認められた。

研究成果の概要(英文)：Periodontal bacteria are the causative agents in periodontitis, but subsequent progression and disease severity are thought to be determined by the host immune responses. It was reported that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulate T cell existed and might have roles in progress of periodontitis. The aim of this study was to make CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr cell's roles in periodontitis. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr suppressed proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. After CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr was stimulate by Dynabeads HumanT-Activator CD3/CD28, The ability of suppression was reduced. This was suggested that the ability of suppression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr might be reduced by the stimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：制御性 T 細胞、T 細胞クローン、歯周炎

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病の病原菌として *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を始めとする数種類の病原菌が同定されているが、歯周病の発症時期や進行のスピードは様々であり、そこには宿主側の要因が関与していることが考えられる。とりわけ歯周組織破壊は歯周病原体のもつ病原性というよりはむしろ病原因子にたいする免疫応答の結果生じたメ

ディエーターによって引き起こされるということが明らかになってきている。これまでの研究から細菌とは乳動物できわめて相性の高い自己の HSP60 に対する抗体が歯周炎罹患患者末梢血で上昇していることが報告されている。この自己 HSP60 で活性化された T 細胞は IFN- $\gamma$  を産生し、単球、マクロファージ系の細胞による炎症性サイトカイン産生を上昇させることから、歯周組織破壊に関与していることが考えられる。このような

疫応答の病的活性化を抑制するとして報告されているのが CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞である。制御性 T 細胞はマウスにおいて自己反応性の T 細胞を抑制的に制御することが報告されており、そのマスター遺伝子として FOXP3 が同定されている。

この制御性 T 細胞が歯周炎の病態形成に関与している報告を示唆するものとして、申請者の所属するグループでは以下の報告をしてきた。

- 高度歯周炎罹患組織由来 T 細胞は末梢血 T 細胞と比較して *P. gingivalis* 外膜タンパクに対する増殖反応が低下し、一方で CTLA4 陽性細胞の比率が高くなる。
- 高度歯周炎罹患患者末梢血を *P. gingivalis* 外膜タンパクで刺激すると制御性 T 細胞の比率は増加するものの、病変局所ではあまり変化がない。
- 歯周炎病変部では CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞と考えられる細胞集団の比率の上昇が認められる。
- 歯周炎組織から樹立した T 細胞クローンでは高頻度で FOXP3 遺伝子の発現が認められる。

これらの報告から歯周病の発症・進行には制御性 T が関与しており、歯周病の感受性の高い患者では制御性 T 細胞による制御が不十分なのではないかと考えられる。

しかしながら、この制御性 T 細胞についてはまだまだ明らかにはなっていない。というのもヒトにおける制御性 T 細胞のマーカーはまだ同定されておらず、研究を進めることを困難にしている。マウスにおいては FOXP3 がそのマスター遺伝子であると報告されている。しかしながらヒトにおいて FOXP3 は単に活性化で発現してくる遺伝子だという報告があり、また我々も FOXP3 を発現している CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の増殖を抑制せず、逆に促進したことを報告している。近年、遺伝子の発現を制御する調節因子として miRNA と呼ばれるわずか 21 から 22 塩基対程度の長さの RNA が注目されてきている。この低分子 RNA は標的 RNA の非翻訳領域に結合し、その翻訳過程を抑制することでタンパク質産生の調節を行っている。miRNA は Dicer という酵素により長い前駆体 RNA が切断されて生じる。マウスにおいてこの Dicer を制御性 T 細胞内で欠損させたところ制御性 T 細胞はその抑制能を消失し、自己免疫反応を引き起こすことを報告している。このことから CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞の機能発現に miRNA が関与していることが考えられ、miRNA が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞の新たなマーカーとなる可能性がある。

## 2. 研究の目的

我々は炎症性組織破壊に重要な役割をなす新規 T 細胞サブセット Th17 と免疫応答の病的活性化を抑制する CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞の両者が歯周炎組織中に浸潤していることを報告してきた。歯周炎においてそれぞれ組織破壊的及び防御的に作用すると考えられる Th17 と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr は相互に分化しうることを示され、この可塑性の発現に miRNA をはじめとするエピジェネティックな機構が関与する可能性が示唆されている。そこで今回 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の miRNA を網羅的に解析し、制御性 T 細胞の制御能に関与する可能性のある miRNA の選出を行う。また、歯周炎組織中においてこの選出された miRNA の発現を検索することで歯周炎の病態形成における制御性 T 細胞の関与について検索を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) T 細胞クローンの樹立とその表現型及び機能解析

- ① 健常者 3 名よりそれぞれ末梢血を採取し、比重遠心法にて単核細胞を分離する。
- ② 分離された単核細胞より CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を分離し、限界希釈法にてクローンの樹立を行う。
- ③ 樹立された T 細胞クローンにおいて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞に関与する分子 (IL-10、CTLA4、CD25、GITR、FOXP3、TGF- $\beta$ ) をフローサイトメトリーと RT-PCR 法をもちいて検索する。また、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞との共培養にて、増殖抑制能の検索を行う。これらにより制御性 T 細胞と思われるクローンの選出を行い、totalRNA を抽出する。また、コントロールとして増殖抑制能を持たないクローンについても選出を行い、その totalRNA の抽出を行う。

### (2) 抑制能発現に影響を及ぼす可能性のある miRNA の選出と検証

- ① それぞれのクローンから抽出した RNA を蛍光標識後、ヒトマイクロ RNA アレイチップにハイブリダイズさせ、蛍光強度を検出する。
- ② (1)-③により選出された制御能を示すクローンと示さないクローンとの両者間で発現強度に違いが認められた miRNA を選出する。選出された miRNA の中からデータベースをもとに抑制能の発現に影響を及ぼす可能性のある miRNA を更に選出する。
- ③ ②で最終的に選出された miRNA に対す

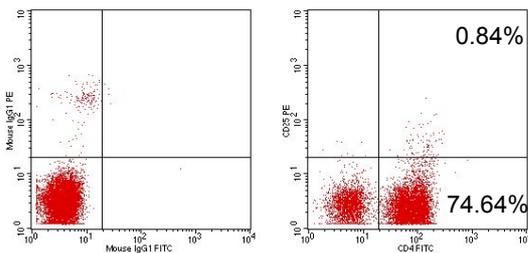
る siRNA を作成し、細胞に導入する。miRNA をノックダウンされた CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞と共培養し、増殖抑制能をコントロールと比較する。

#### 4. 研究成果

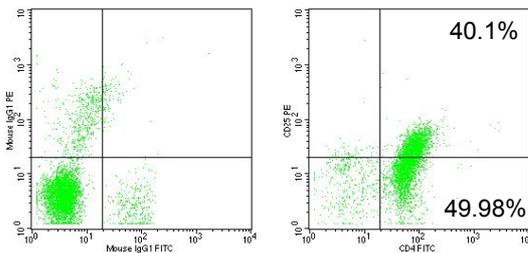
健常者の末梢血から比重遠心法にて単核球を分離後、免疫磁気ビーズ法にて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の分離を行った。分離直後の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞と共培養を行った際に増殖抑制能を示した。

以下に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞分離直後のフローサイトメトリーの結果を示す。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞

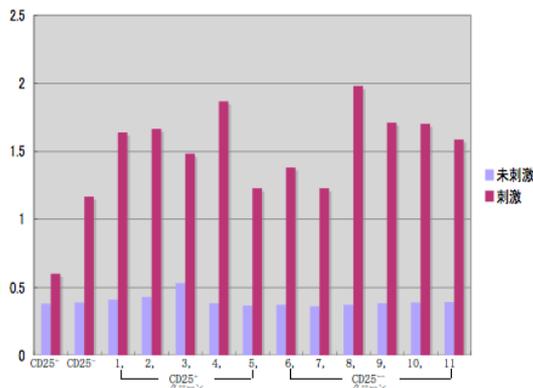


CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞



分離されたそれぞれの T 細胞から限界希釈法にて T 細胞クローンを樹立した。

樹立された T 細胞クローンのうち、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T 細胞を選出し、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞と共培養したところ、増殖抑制能は認められなかった。増殖試験の結果を以下に示す。



そこで、次に CD25 だけではなく、抗 CD127 抗体ももちいて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>T 細胞を分離し、培養を行った。分離直後の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>T 細胞は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞の増殖を抑制した。

分離された CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>T 細胞を Dynabeads HumanT-Activator CD3/CD28 にて刺激培養を行った後に再度 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞と共培養を行ったところ、増殖抑制能の減弱傾向が認められた。このことから抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>T 細胞の増殖抑制能を減弱させる可能性があることが示された。近年制御性 T 細胞は Th17 細胞に変化する可能性について報告がなされており、今回示された結果が制御性 T 細胞の Th17 細胞への変化によるものなのかどうかについては更なる解析が必要である。

#### 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 2 件)

- 1) Yamazaki K, Ito H. Single-strand conformation polymorphism analysis for the diagnosis of T-cell clonality in periodontal disease. Methods Mol Biol. 査読無し. 2010. 666: 359-72.
- 2) 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 periodontal Res. 査読有り. 2010. Fed; 45(1): 116-22.

[学会発表] (計 4 件)

- 1) T. NAKAJIMA, K. KAJITA, T. OKUI, H. MIYASHITA, S. MIYAUCHI, T. HONDA, Y. SHIMADA, H. ITO, K. TABETA, and K. YAMAZAKI: Sitafloxacin is effective for reduction of pocket bacteria in SPT. IADR, BARCELONA, 2010. 07. 15.
- 2) 奥井隆文、米澤大輔、奥井桂子、宮内小百合、青木由香莉、宮下博考、本田朋之、伊藤晴江、多部田康一、中島貴子、山崎和久：SPT 期活動性歯周ポケットに対するシタフロキサシン経口投与有用性の検討。第 53 回春期日本歯周病学会学術大会、P50、盛岡市、2010. 5. 14
- 3) 宮下博考、米澤大輔、本田朋之、奥井隆文、梶田-奥井桂子、前川知樹、高橋直

- 紀、伊藤晴江、中島貴子、多部田康一、山崎和久：歯周炎患者における Porhyromonas gingibvalis に対する抗体価とCRPの関連性. 第52回秋季日本歯周病学会学術大会、日本歯周病学会会誌第秋季特別号、P48、宮崎、2009. 10. 11
- 4) 本田朋之、宮下博考、米澤大輔、奥井隆文、梶田-奥井桂子、前川朋樹、高橋直樹、伊藤晴江、中島貴子、多部田康一、山崎和久：歯周炎患者における Porhyromonas gingivalis に対する抗体価と高感度CRPの関連性. 第2回日本口腔検査学会総会・学術大会報告、広島市 P80、2009. 10. 04

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 晴江 (ITO HARUE)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：30397145

### (2) 研究分担者

無し ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

無し ( )