

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792116

研究課題名 (和文) 新規 T 細胞サブセット Th17 を基盤とした歯周炎病態メカニズムの再構築

研究課題名 (英文) Analysis of periodontitis lesions focusing on a new T-cell subset, Th17.

研究代表者

奥井 隆文 (OKUI TAKAFUMI)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：10509540

研究成果の概要 (和文)：歯肉組織または末梢血に由来する CD4⁺ T 細胞ラインの比較解析において、歯肉由来 T 細胞ラインでは IL-17⁺ 細胞 (Th17) の割合が高いが FOXP3⁺ 細胞 (制御性 T 細胞) の割合は低かった。FOXP3⁺ 細胞中の IL-17⁺ FOXP3⁺ 細胞の割合は、歯肉由来 T 細胞ラインで高かった。歯周炎病変部の免疫組織学的解析において、IL-17⁺ 細胞と IL-17⁺ FOXP3⁺ 細胞の浸潤数は、ポケット上皮側では口腔上皮側よりも高かった。以上より、Th17 が歯周炎進行を促進していること、一部の FOXP3⁺ 制御性 T 細胞は歯周炎病変部で Th17 にサブセット転換して慢性炎症を持続させていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The proportion of IL-17⁺ cells (Th17) was higher whereas that of FOXP3⁺ regulatory T cells was lower in gingival CD4⁺ T-cell lines compared to peripheral blood T-cell lines. The ratio of IL-17⁺ FOXP3⁺ cells to total FOXP3⁺ cells was higher in gingival T-cell lines. Immunohistochemical analysis revealed that the number of IL-17⁺ cells and IL-17⁺ FOXP3⁺ cells was higher in connective tissue area on pocket epithelial side compared to oral epithelial side. These data suggest that Th17 cells accelerate disease progression; furthermore, a part of FOXP3⁺ regulatory T cells may convert to the Th17 phenotype sustaining chronic inflammation in periodontitis lesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：歯周免疫機能学

1. 研究開始当初の背景

歯周炎に罹患した組織中には B 細胞・形質細胞とともに免疫応答の中心的役割を担う T 細胞が多く浸潤している。我々は以前から、T 細胞機能と歯周炎病態との関連について解析を続けてきた。その中で、我々を含む沢山の研究グループがヘルパー T 細胞 (Th1 や Th2)

や制御性 T 細胞間のバランスと歯周炎進行の関連を探ってきたが、一貫した理論が確立されておらず、これら以外の新たな要因の関与が予想されていた。

これまでに、IL-17 が慢性関節リウマチなどの組織破壊を伴う慢性炎症性疾患に関与していることが報告され、我々は歯肉組織中

の IL-17 遺伝子発現を解析し、歯周炎では歯肉炎に比べて発現が高いことを報告した。近年、IL-17 高産生の細胞は Th17 として同定され、Th17 は自己免疫疾患やある種の感染防御において非常に重要であることが明らかにされてきた。

2. 研究の目的

歯周炎罹患歯肉組織から CD4⁺T 細胞ラインを樹立して機能解析を行うとともに、歯肉組織の免疫組織学的解析により歯周炎病態における Th17 の役割を検討する。

3. 研究の方法

① 歯肉由来 CD4⁺T 細胞ラインの解析

インフォームドコンセントの得られた慢性歯周炎患者から歯肉組織を採取し、Dispase 処理、比重遠心法を用いて単核細胞を分離後、抗 CD3 抗体とフィーダー細胞を用いて T 細胞ラインを作製した。その後 T 細胞ラインから磁気分離法にて CD4⁺T 細胞集団を分離して CD4⁺T 細胞ラインとした。比較対象として、同一患者の末梢血からも CD4⁺T 細胞ラインを作製した。これらの T 細胞ラインにおける T 細胞サブセット関連分子をフローサイトメトリー法にて解析した。具体的には、IL-17A (Th17 マーカー)、IFN- γ (Th1 マーカー)、IL-4 (Th2 マーカー)、FOXP3 (制御性 T 細胞マーカー) を二重染色した。

② 歯周炎病変部の免疫組織学的解析

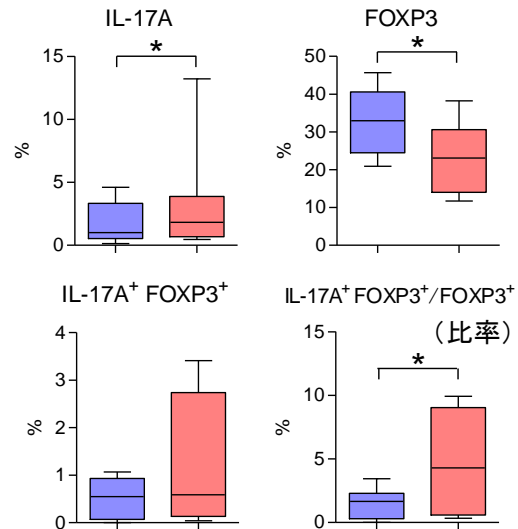
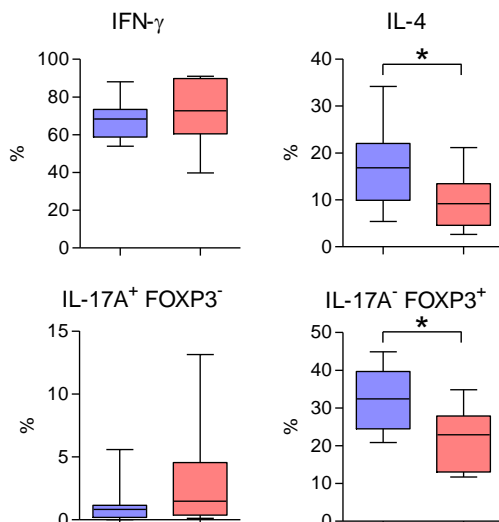
歯肉組織から連続凍結切片を作成し、IL-17、FOXP3 を二重蛍光免疫染色した。さらに CD3 (T 細胞マーカー)、CD19 (B 細胞マーカー) を二重免疫染色した。歯肉結合組織をポケット上皮側と口腔上皮側に分割して各分子の陽性細胞数を比較解析した。

4. 研究成果

① 歯肉由来 CD4⁺T 細胞ラインの解析

■ 末梢血由来 T 細胞ライン

■ 歯肉由来 T 細胞ライン



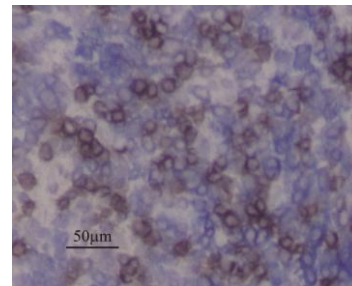
歯肉由来ラインで有意に割合が高かった分子：IL-17A

歯肉由来ラインで有意に割合が低かった分子：IL-4、FOXP3、IL-17A⁻ FOXP3⁺

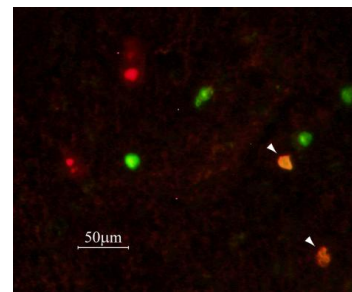
さらに、IL-17A⁺ FOXP3⁺/FOXP3⁺ (比率) は歯肉由来ラインで有意に高かった。

② 歯周炎病変部の免疫組織学的解析

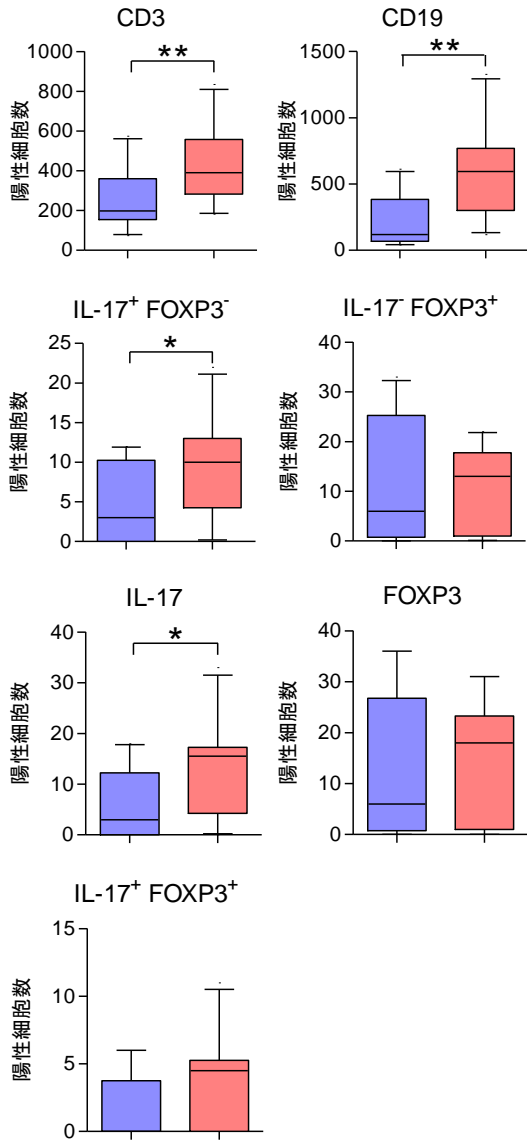
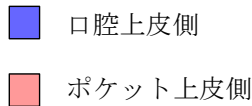
CD3 (茶)、CD19 (青)



IL-17 (赤)、FOXP3 (緑)



矢頭は二重染色された細胞 (黄) を示す



ポケット上皮側で有意に多かった細胞：CD3、CD19、IL-17、IL-17⁺ FOXP3⁻
 ポケット上皮側で多い傾向があった細胞：IL-17⁺ FOXP3⁺

③ 結果のまとめ・考察

歯肉と末梢血に由来する CD4⁺T 細胞ラインの比較解析より、歯周炎組織に浸潤している CD4⁺T 細胞中の Th17 の割合は上昇し、FOXP3⁺ 制御性 T 細胞の割合が低下していることが示された。興味深いことに、T 細胞ライン中に IL-17A⁺ FOXP3⁺ という特殊なフェノタイプの

細胞を認め、IL-17A⁺ FOXP3⁺/ FOXP3⁺ (比率) は歯肉由来ラインで高かった。

歯周炎組織の免疫組織学的解析により、炎症性細胞 (T 細胞、B 細胞) 浸潤の多いポケット側においては、口腔上皮側と比較して Th17 の浸潤数が多かった。IL-17⁺ FOXP3⁺ 細胞はポケット上皮側において高い傾向にあった。

以上の結果より、Th17 浸潤が歯周炎進行を促進していることが示唆された。さらに、IL-17⁺ FOXP3⁺ という特殊な細胞が歯周炎組織に浸潤していることが明らかになった。近年、FOXP3⁺ 制御性 T 細胞は特定のサイトカイン (IL-1β、IL-2) の存在下で IL-17 を分泌することが報告されるようになった。この現象は制御性 T 細胞が Th17 にサブセット転換していることを示唆しており、このメカニズムと様々な炎症性疾患との関連が注目されている。これらのサイトカインが豊富な歯周炎病変部においても、このサブセット転換が生じ、慢性的な炎症が持続している可能性が考えられる。今後は *in vitro* において、このメカニズムが破骨細胞機能に与える影響を解析していく予定である。

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 Maekawa T, Takahashi N, Honda T, Yonezawa D, Miyashita H, Okui T, Tabeta K, Yamazaki K.
Porphyromonas gingivalis antigens and interleukin-6 stimulate the production of monocyte chemoattractant protein-1 via the upregulation of early growth response-1 transcription in human coronary artery endothelial cells.
 J Vasc Res. 47:346-54, 2010. (査読有り)
- 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. 45:116-22, 2010. (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

① 奥井 隆文

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 回春季日本歯周病学会学術大会、2010
年 5 月 14 日、盛岡市民文化ホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥井 隆文 (OKUI TAKAFUMI)
新潟大学・医歯学系・特任助教
研究者番号：10509540

(2) 研究協力者

本田 朋之 (HONDA TOMOYUKI)
新潟大学・医歯学系・特任助教
伊藤 晴江 (ITO HARUE)
新潟大学・医歯学系・助教