

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19612

研究課題名（和文）Dysbiotic細菌叢特異的MAIT細胞の開発と歯周炎治療への応用

研究課題名（英文）Development of Dysbiotic Microbiota-specific MAIT Cells and Their Application to the Treatment for Periodontitis

研究代表者

梶川 哲宏（KAJIKAWA, TETSUHIRO）

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：90611252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト歯周病患者から採取した歯周組織にMucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞が存在することを明らかにした。同時にマウス歯周炎モデルを用いた歯周組織においても、MAIT細胞が増殖していることを確認し、さらにはそのメカニズムの一つとして、炎症歯周組織に存在する細菌叢が関与している可能性を示した。現在、ヒトあるいはマウス歯周組織MAIT細胞をソーティングによって単離後にiPS化を行うことで、MAIT細胞の大量培養を試みており、その後、MAIT細胞がそのTCRレパトアのパターンに応じて、どのように歯周組織炎症を制御するのかを検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身の様々な組織、さらにはそこで発症する疾患におけるMAIT細胞の役割が明らかにされつつある。しかしながら、歯周病におけるMAIT細胞の役割はこれまでに明らかとなっていない。本研究は、歯周組織MAIT細胞の増殖機構の一つとして、炎症歯周組織において認められるdysbiotic細菌叢が関与することを間接的に示し、さらには炎症歯周組織におけるMAIT細胞のフェノタイプを明らかとした。この結果から歯周組織においてMAIT細胞が炎症制御に関与することが示唆され、今後はTCRレパトアのタイプに着目した固有の歯周組織MAIT細胞の機能を明らかにすることで、歯周病新規治療法開発につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated the presence of Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in periodontal tissues harvested from human patients with periodontitis. Simultaneously, we confirmed the proliferation of MAIT cells in periodontal tissues using a mouse periodontitis model. The microbiota present in the inflamed periodontal tissues may be involved in one of the mechanisms for this proliferation.

Currently, we are working on culturing large quantities of MAIT cells by isolating them from human or mouse periodontal tissues through sorting and subsequent iPS cell induction. Following this, we plan to investigate how MAIT cells, depending on their TCR repertoire patterns, influence the regulation of periodontal tissue inflammation.

研究分野：歯周病学・免疫学

キーワード：MAIT細胞 歯周病 Dysbiotic細菌叢 TCRレパトア 絹糸結紮歯周炎モデル

1. 研究開始当初の背景

Mucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞は T 細胞受容体 (TCR) を介して、抗原提示細胞が発現する MHC class I-like protein (MR1) 受容体と結合し、細菌由来のビタミン B2 合成中間産物を認識する細胞である。その特徴として、MAIT 細胞は限られたパターンの TCR しか発現しないことがあげられる。

MAIT 細胞の持つ役割が近年明らかになりつつある。例えば肺炎に罹患した患者の肺洗浄液中では有意に MAIT 細胞の数が上昇しており、マウス肺感染症モデルを用いた解析により、MAIT 細胞が肺に存在する細菌の量を減少させ、細菌感染による致死に対して抑制効果を示すことがわかった (Wang et al, Nat Commun. 2018)。このことは MAIT 細胞が細菌感染症に対して保護的に働く可能性を示唆する。

歯周病は細菌感染症による炎症性疾患であるが、疾患の発症、進行においては病的な細菌叢への変化 (dysbiosis) が重要な役割を持つ。Deng らの報告によれば、歯周病患者で検出された口腔細菌の中で最も多く transcripts を産生していたもの (=活動性が高かったもの) は、*Porphyromonas gingivalis* (P.g)、*Tannerella forsythia* (T.f)、*Prevotella intermedia* (P.i) であった (Deng et al, Sci Rep. 2017)。これらの細菌は健常歯周組織においてはほとんど検出されず、歯周炎組織において最も活動性の高い dysbiotic 細菌と言えるが、興味深いことに、P.g、T.f、P.i の全てがビタミン B2 合成中間産物を生成するため、マクロファージによる食食後に MR1 受容体を介して、MAIT 細胞は活性化を受けると考えられる。このことは歯周病に罹患した患者の歯周組織において、活性化 MAIT 細胞が存在し、何らかの役割を担っていることを示唆する。MAIT 細胞は granzyme B や perforin を分泌することで、感染細胞を排除する能力を持つことから、歯周組織 MAIT 細胞の活性を制御することで、感染症である歯周病に対して、病態を改善する効果が得られる可能性は高い。

これまで MAIT 細胞を *in vitro* で増殖させることは困難であったが、近年、MAIT 細胞の iPS 化 (MAIT-iPS 細胞)、さらにその後の再分化 (reMAIT 細胞) により MAIT 細胞の大量培養が可能となった。この手法により得られた MAIT 細胞が持つ特徴の一つとして、reMAIT 細胞 TCR が、オリジナルのものと全く同一であることがあげられる。以上の背景から、本研究では、歯周組織から MAIT 細胞を単離し、iPS 化、固有の TCR を持つ reMAIT 細胞クローン株群を作製した後に、*in vitro* の実験系で dysbiotic 細菌によって誘導される炎症を効率的に制御する reMAIT 細胞クローン株を選別し、大量培養することで、MAIT 細胞を用いた歯周炎に対する新規免疫細胞移植治療法の開発に挑戦できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

歯周組織における MAIT 細胞の存在を確認し、そのフェノタイプを解析することで、歯周組織 MAIT 細胞の機能を検討する。次に MAIT 細胞が活性化を受けるメカニズムを明らかにする。特に dysbiotic 細菌叢が MAIT 細胞活性化に関与しているかを調べる。さらには、歯周組織 MAIT 細胞が発現する TCR レパトアの種類を明らかにし、それぞれに対するクローンの大量培養を試み、特性を調べることで MAIT 細胞を用いた歯周組織の炎症制御を図る。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリーを用いた歯周組織 MAIT 細胞の検出

本研究においては、野生型マウスの上顎大臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、プラーク蓄積を誘導することで、歯周組織に炎症を誘導する絹糸結紮歯周炎モデルを用いた。10 日後に非結紮測・結紮測それぞれからマウス歯周組織を回収し、コラゲナーゼ処理による細胞単離後に、フローサイトメトリーによって歯周組織に存在する MAIT 細胞の解析を行った。MAIT 細胞の検出には MAIT 細胞 TCR に高親和性を持つ分子である 5-OP-RU を結合させた蛍光標識テトラマーを用いた。

(2) フローサイトメトリーを用いた Ki67, Ror γ t, Nur77, IL-17A の発現解析

Ki67, Ror γ t, Nur77 の発現解析では、歯周組織より単離した細胞をまず固定し、透過処理をおこなった後に、各抗体で染色した。IL-17A の検出においては、細胞を PMA, Ionomycin, Brefeldin A で刺激した後、抗 IL-17A 抗体で染色を行った。

(3) リアルタイム PCR 解析

歯周組織を回収後、tRNA を精製し、RT-PCR を用いて cDNA を獲得した。その後、primer-probe セットを用いたリアルタイム PCR 法により、各炎症性サイトカインの発現解析を行った。ハウスキーピング遺伝子としては *Rp1p0* を使用した。

(4) ex vivo MAIT 細胞の刺激実験

歯周組織の所属リンパ節である頸部リンパ節を回収し、コラゲナーゼ処理による細胞単離後に、rmIL-23 (10 ng/mL), IL-1 β (10 ng/mL), IL-7 (10 ng/mL)で細胞を刺激し、72時間後に細胞を回収した。フローサイトメトリーを用いてMAIT細胞数を測定し、歯周組織MAIT細胞の活性化に重要なサイトカインの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 炎症歯周組織におけるMAIT細胞の解析

マウス歯周炎モデルにおける歯周組織MAIT細胞を絹糸非結紮測と結紮測で比較した結果、結紮測において有意に高いMAIT細胞比率と細胞数の上昇を認めた。マウス炎症歯周組織におけるMAIT細胞の存在は、これまでに報告のない新たな知見であった。

(2) 炎症歯周組織におけるMAIT細胞のフェノタイプの解析

4-(1)で検出された歯周組織MAIT細胞を、さらに細胞増殖マーカーであるKi67とIL-17の発現に重要な転写因子であるRor γ tに対する抗体で染色した結果、炎症歯周組織MAIT細胞において、高いKi67とRor γ tの発現を認めることがわかった。さらにIL-17Aに対する抗体を用いて歯周組織MAIT細胞を染色したところ、絹糸結紮測のMAIT細胞は非結紮測と比べ有意に高いIL-17Aを発現することがわかった。一方でIFN- γ の発現には有意差を認めなかった。IL-17Aは歯周組織の破壊において重要な役割を担うサイトカインであることが報告されている。すなわち、炎症歯周組織において認められるMAIT細胞は、歯槽骨吸収に対して促進的に作用する可能性が示された。

(3) 炎症歯周組織におけるMAIT細胞TCRの活性化

MAIT細胞の活性化経路として、抗原提示細胞が発現するMR1受容体を經由したMR1依存性のものとMR1非依存性のものがこれまでに報告されている。MR1依存性の活性化経路においては、ビタミンB2の代謝産物を産生する細菌が食細胞に貪食されたのち、MR1受容体上に提示された抗原をMAIT細胞が発現するTCRが認識することでMAIT細胞が活性化される。

マウス歯周炎モデルにおいて、誘導されたdysbiotic細菌叢を介したMAIT細胞活性化が生じているかどうかを調べるため、TCRの下流に存在する分子であるNur77の発現を解析した。その結果、絹糸結紮側MAIT細胞は非結紮測のものとは比べ、有意に高いNur77の発現を行うことがわかった。一方、頸部リンパ節に存在するMAIT細胞におけるNur77の発現に関しては、絹糸結紮測と非結紮測の間で有意な差を認めなかった。これらの結果から、炎症歯周組織におけるMAIT細胞の活性化において、dysbiotic細菌叢が重要な役割を担うことがわかった。

(4) 炎症歯周組織における炎症性サイトカインを介したMAIT細胞の活性化

続いて、MR1非依存性のMAIT細胞活性化経路の関与、すなわちサイトカインを介した歯周組織MAIT細胞活性化の可能性を検証するため、MAIT細胞を活性化すると報告されている種々のサイトカインの炎症歯周組織における発現をリアルタイムPCR法によって解析した。その結果、*I123*, *I11b*, *I17* mRNAの有意な発現上昇を認めた。すなわち、これらのサイトカインの歯周組織MAIT細胞の活性化への関与が示唆された。

さらに、野生型マウスの頸部リンパ節より白血球を単離し、IL-23, IL-1 β , IL-7で刺激を行った。その結果、特にIL-7の刺激により有意なMAIT細胞数の上昇を認めた。このことは、歯周組織MAIT細胞の活性化にIL-7が重要な役割を担うことを示唆するものである。

(5) MAIT-iPS細胞の樹立へ向けた実験

以上の結果から、絹糸結紮歯周炎モデルを適用すること、さらにはそこにIL-7刺激を加えることで野生型マウス1個体から数百個の歯周組織MAIT細胞を獲得することができるようになった。しかしながら、免疫細胞移植治療法に使用するMAIT細胞数としては、はるかに多くの細胞数が必要であり、現行のモデルでは必要細胞数を得ることが非常に困難である。そこで、ソーティングにより歯周組織より単離したMAIT細胞を、近年報告されたMAIT細胞のiPS化とその後の再分化により、歯周組織reMAIT細胞を大量に培養する試みを行っている。

この系が成功した際にはクローン化を行うことで、歯周組織MAIT細胞が発現する特異的なTCRをレパトア解析により明らかとし、各クローンのうち、歯周組織の炎症反応制御を効率的に行うものを選別し、in vivo実験によりMAIT細胞移植療法の可能性を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梶川 哲宏
2. 発表標題 MAIT Cells Exacerbate Alveolar Bone Loss in Periodontitis Associated with LAD1
3. 学会等名 The 71st Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野田武聖, 梶川哲宏, 佐藤理恵, Li Qingling, 山田聡
2. 発表標題 Analysis of periodontal MAIT cells using the ligature-induced periodontitis model
3. 学会等名 The 71st Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	向阪 幸彦 (Sakisaka Yukihiro) (10760457)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	山田 聡 (Yamada Satoru) (40359849)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------