

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792469

研究課題名（和文） 歯周病原細菌による Treg から Th17 への転換は破骨細胞形成を促進するか？

研究課題名（英文） The effect of Treg-Th17 conversion induced by periodontopathic bacteria on osteoclastogenesis.

研究代表者

奥井 隆文（OKUI TAKAFUMI）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：10509540

研究成果の概要（和文）：

歯周炎病態における Treg から Th17 へのサブセット転換の関与を解析した。免疫組織学的解析より、IL-17A⁺FOXP3⁺細胞の浸潤は歯周炎罹患歯肉組織に認められたが、臨床的健康歯肉組織には認められなかった。次に歯周炎患者の歯肉および末梢血から CD4⁺T 細胞ラインを樹立して解析したところ、全 FOXP3⁺細胞における IL-17⁺FOXP3⁺細胞の割合は、歯肉由来 CD4⁺T 細胞ラインでは末梢血由来 CD4⁺T 細胞ラインよりも高かった。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether the Treg-Th17 conversion is associated with the pathogenesis of periodontitis. Immunohistological analysis showed that IL-17A⁺FOXP3⁺ cells were observed only in periodontitis lesions but not in clinically healthy sites. Next, we established CD4⁺ T-cell lines from gingival tissues and peripheral blood of periodontitis patients. The proportion of IL-17⁺FOXP3⁺ cells in total FOXP3⁺ cells was higher in gingival tissue CD4⁺ T-cell lines compared with peripheral blood CD4⁺ T-cell lines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：IL-17⁺FOXP3⁺細胞、Th17、Treg、歯周炎、サブセット転換

1. 研究開始当初の背景

歯周炎ではプラーク中の歯周病原細菌に対する宿主の免疫応答の結果、軟組織や硬組織の破壊が生じる。免疫応答の司令塔である CD4⁺ヘルパーT 細胞は歯周炎病態において重要な役割を果たしていると考えられている。CD4⁺ヘルパーT 細胞は古くは Th1 と Th2 の 2 つのサブセットに分類され、Th1/Th2 バランスと歯周炎病態との関係については多くの研究が行われてきたが、一致した結論が得られることはなかった。

その後、炎症性サイトカイン IL-17 を産生する CD4⁺ヘルパーT 細胞サブセットが発見さ

れ、Th17 と名付けられた。Th17 は Th1/Th2 パラダイムでは説明できなかった様々な疾患、例えばマウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎などの病態を形成していることが明らかになり、我々を含めた複数の研究グループから歯周炎病態における Th17 の関与を示した研究が報告された。しかしながら、Th17 がどのように発生して歯周炎組織に浸潤しているのかは不明なままであった。

近年、*in vitro* において CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞（Treg）がある種の炎症性サイトカインの存在下で Th17 にサブセット転換するという新規の事象が報告された。Treg は転写因子

FOXP3 を特異的に発現する、末梢での免疫寛容に大変重要な CD4⁺T 細胞サブセットである。我々の研究グループは以前、歯周炎病変部では Treg の浸潤が亢進するが、病変部から樹立した FOXP3⁺T 細胞クローンは制御的に機能しないことを報告した。これはすなわち、歯周炎病変部に浸潤している Treg の性質が変化している可能性を示している。そこで、炎症性サイトカインが豊富な歯周炎病変部では Treg から Th17 へのサブセット転換が生じて炎症を進行させているという仮説を考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、歯周炎病態における Treg-Th17 サブセット転換の関与を明らかにすることを目的とした。しかしながら、歯周炎病変部で実際にサブセット転換が生じている瞬間を確認することは難しいため、サブセット転換の過程に一時的に生じるとされる IL-17⁺FOXP3⁺細胞に注目して解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 歯肉組織の免疫組織学的解析

歯周炎罹患歯肉組織 (N=10) と臨床的健全歯肉組織 (N=9) より連続凍結切片を作製した。T 細胞マーカーとして CD3 を、B 細胞マーカーとして CD19 を、免疫組織学的手法を用いて二重染色した。同様に、Th17 マーカーとして IL-17A を、Treg マーカーとして FOXP3 を、蛍光二重染色した。規格化された領域内における各細胞の数をカウントした。

(2) CD4⁺T 細胞ラインの樹立およびフェノタイプ解析

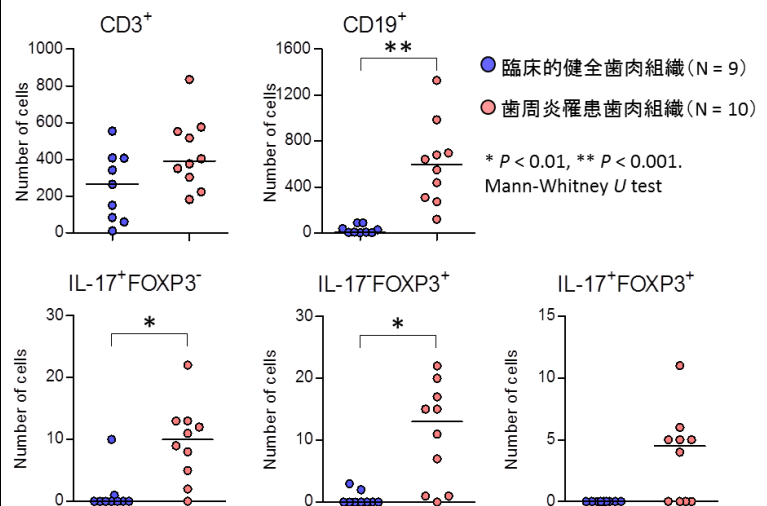
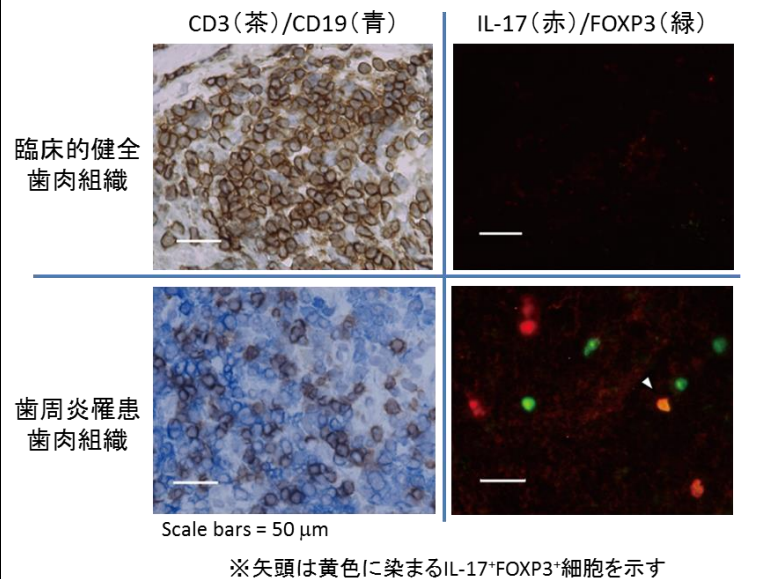
歯周炎患者 (N=9) より歯肉組織および末梢血を採取した。各サンプルより比重遠心法を用いて単核球を分離した後、抗 CD3 抗体とフィーダー細胞を用いて IL-2 存在下で増殖させた。CD4 で磁気分離して CD4⁺T 細胞を得た後、さらに上記の方法で増殖させた。再度 CD4 で磁気分離を行い CD4⁺T 細胞ラインとした。CD4⁺T 細胞ラインのフェノタイプを、各種抗体を用いてフローサイトメトリー法により解析した。

4. 研究成果

(1) 歯肉組織の免疫組織学的解析

歯周炎罹患歯肉組織および臨床的健全歯肉組織を比較した場合、CD3⁺細胞の浸潤数は両歯肉組織で同様であったが、CD19⁺細胞の浸潤数は歯周炎罹患歯肉組織で有意に高かった。すなわち採取したサンプルは B 細胞病変である歯周炎病態を良く反映していた。

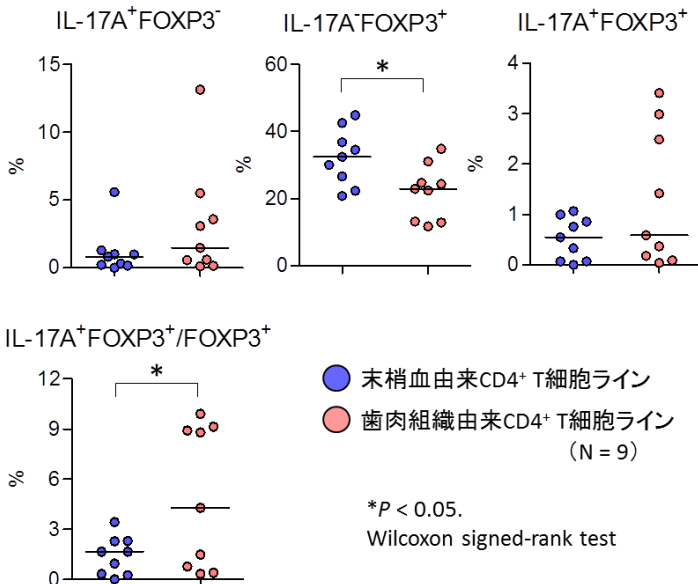
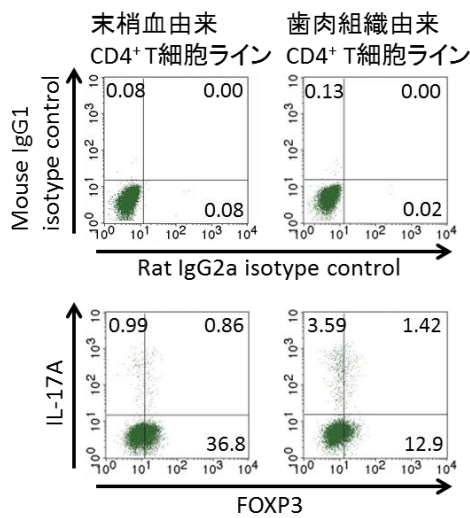
Th17 (IL-17A⁺FOXP3⁻細胞) および Treg (IL-17A⁻FOXP3⁺細胞) の浸潤数は歯周炎罹患歯肉組織では臨床的健全歯肉組織よりも有意に高かった。サブセット転換の過程で生じるとされる IL-17A⁺FOXP3⁺細胞は歯周炎罹患歯肉組織にのみ少数認められた。



【上図は〔雑誌論文〕(1)より改変引用】

(2) CD4⁺T 細胞ラインの樹立およびフェノタイプ解析

樹立した全ての CD4⁺T 細胞ラインは CD4 陽性率が 95%以上であった。歯肉組織由来 CD4⁺T 細胞ラインと末梢血由来 CD4⁺T 細胞ラインを比較した場合、Th17 (IL-17A⁺FOXP3⁻細胞) の割合は同様であったが、Treg (IL-17A⁻FOXP3⁺細胞) の割合は歯肉組織由来 CD4⁺T 細胞ラインで有意に減少していた。また全 FOXP3⁺T 細胞における IL-17⁺FOXP3⁺T 細胞の割合は歯肉組織由来 CD4⁺T 細胞ラインで有意に高かった。



【上図は〔雑誌論文〕(1)より改変引用】

これらの結果より、歯周炎病変部では Treg が Th17 にサブセット転換している可能性が示唆された。サブセット転換の過程で生じる IL-17⁺FOXP3⁺細胞がその後も IL-17 を分泌して Th17 として働き続けるのかは明らかになっていないが、このサブセット転換が継続的に歯周炎病変部で生じた場合、炎症を増大させて最終的に組織破壊を促進する可能性が考えられる。

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 5 件)

(1) The presence of IL-17⁺/FOXP3⁺ double-positive cells in periodontitis. Okui T, Aoki Y, Ito H, Honda T, Yamazaki K. J Dent Res. 91:574-9. 2012. (査読有) DOI: 10.1177/0022034512446341

(2) Effects of systemic sitafloxacin on periodontal infection control in elderly patients. Nakajima T, Okui T, Miyachi S, Honda T, Shimada Y, Ito H, Akazawa K, Yamazaki K. Gerodontology. 29:1024-32. 2012. (査読有) DOI: 10.1111/j.1741-2358.2011.00605.x

(3) Increased serum PCSK9 concentrations are associated with periodontal infection but do not correlate with LDL cholesterol concentration. Miyazawa H, Honda T, Miyachi S, Domon H, Okui T, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K. Clin Chim Acta. 18:413:154-9. 2012. (査読有) DOI: 10.1016/j.cca.2011.09.023

(4) Effect of interleukin-17 on the expression of chemokines in gingival epithelial cells. Takahashi N, Okui T, Tabeta K, Yamazaki K. Eur J Oral Sci. 119:339-44. 2011. (査読有) DOI: 10.1111/j.1600-0722.2011.00842.x

(5) Elevated antibody titers to *Porphyromonas gingivalis* as a possible predictor of ischemic vascular disease - results from the Tokamachi-Nakasato cohort study. Tabeta K, Tanabe N, Yonezawa D, Miyashita H, Maekawa T, Takahashi N, Okui T, Nakajima T, Yamazaki K. J Atheroscler Thromb. 18:808-17. 2011. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670558>

〔学会発表〕（計2件）

(1) Okui T, Identification of IL-17⁺FOXP3⁺ T cells in periodontitis lesions. The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2011年10月8日. 広島国際会議場（広島市）

(2) 奥井隆文、歯周炎病変部におけるIL-17⁺FOXP3⁺T細胞の関与、第54回春季日本歯周病学会学術大会、2011年5月27日、福岡国際会議場（福岡市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥井 隆文 (OKUI TAKAFUMI)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：10509540

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

野中 由香莉 (NONAKA YUKARI)
新潟大学・医歯学総合研究科・研究員
本田 朋之 (HONDA TOMOYUKI)
新潟大学・医歯学総合研究科・医員