

平成 21年 5月 21日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791609  
 研究課題名（和文）骨破壊で特徴づけられる歯周炎の病態に及ぼす炎症巣の活性化  
 T細胞の関与  
 研究課題名（英文）The role of effector T cells on bone resorption in periodontal  
 diseased lesions.  
 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：歯周炎は感染や炎症により、骨を含めた歯周組織破壊の起こる疾患である。歯周炎組織中には数多くの免疫系細胞が存在しており、これら免疫系細胞が歯槽骨吸収に関与していると考えられる。本研究では歯周炎組織中のT細胞の骨吸収に関わる分子の産生を検索した。結果歯周炎組織中には歯骨細胞分化を促進させる RANKL<sup>+</sup>T細胞と Th17細胞が存在し、これらの細胞が歯周炎組織における骨破壊に関与している可能性を示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

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：歯周炎、RANKL、Th17

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は感染や炎症により骨を含めた歯周組織の破壊が起こる疾患である。歯周炎に罹患した組織中には多くの免疫系細胞が存在しており、サイトカイン産生や細胞膜上の分子を介して骨格系細胞の分化や機能制御に深く関与していると考えられる。近年、免疫系と骨代謝をつなぐと考えられる破骨細胞分化因子 RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) が T 細胞上に発現することが明らかにされた。RANKL に対し、

TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) という呼称を今でも使用している Choi らも免疫系の研究からこの分子を発見したグループの一つであり、彼らが 2000 年に初めて Nature 誌上で osteoimmunology (骨免疫学) という言葉を用いてこの研究を位置づけた。

RANKL は当初樹上細胞活性化因子としてクローニングされたが、この分子は 1998 年に同定された骨芽細胞等の破骨細胞形成支持細胞に発現する破骨細胞分化因子 ODF (osteoclast differentiation factor) と

同一の分子であった。RANKL は TNF スーパーファミリーに属する膜結合型蛋白であり、受容体である RANK と結合して細胞内にシグナルを伝える。RANKL は、活性型ビタミンD<sub>3</sub>、PGE<sub>2</sub>、副甲状腺ホルモン PTH、IL-6 などのこれまで知られてきた多くの骨吸収因子によって骨芽細胞などの破骨細胞形成支持細胞の表面上に誘導されることが明らかにされた。さらに、RANKL 欠損マウスにおいては、これらの因子の骨吸収促進作用が消失することから、RANKL シグナルが生体における骨吸収レベルを最終的に決定する重要な役割を果たすことが示された。この RANKL と結合し破骨細胞の形成を抑制するサイトカインとして OPG (osteoprotegerin) がクローニングされている。OPG は RANKL の decoy receptor として RANKL の真の受容体である RANK と拮抗し、RANK よりも高い親和性で RANKL に結合することにより、RANKL の活性を抑制する。Penninger らは、OPG 欠損マウスを用いて解析を行い、OPG 欠損マウスでは骨組織中に多数の破骨細胞が出現し、活発に骨吸収が行われることにより、骨粗鬆症の症状を呈する。また、破骨細胞分化抑制因子 OPG をアジュバント関節炎に投与して骨破壊抑制が見られたと報告した。これらのことから破骨細胞の分化には RANK-RANKL のシグナル伝達が必須であり、炎症による骨破壊には破骨細胞が必要であることが明らかにされた。

ではこの RANKL による炎症性骨吸収の機構は何によって制御されているのだろうか？。Penninger らは、活性化 T 細胞上に誘導された RANKL が直接、破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞分化を誘導するという説を提唱した。彼らは、ホルマリン固定した T 細胞を用いて *in vitro* での破骨細胞分化誘導能を示した。一方 Takayanagi らは固定化していない活性化 T 細胞を破骨細胞形成系に共存培養した結果 Penninger らの結果とは異なり、破骨細胞分化を強く抑制し、これは T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  による作用であることを明らかにした。さらに解析を続けた結果、IFN- $\gamma$  受容体欠損マウスを用いた検討によって、T 細胞の破骨細胞分化への作用は、RANKL と IFN- $\gamma$  のバランスによって決定されることを解明した。これらのことから Takayanagi らは活性化 T 細胞は RANKL を発現するが、通常は IFN- $\gamma$  による RANKL 抑制作用によって、破骨細胞を誘導しないように負に制御しているのだらうと述べている。

歯周炎における機能的 T 細胞サブセットのバランスに関しては、Th2 優勢であるという報告が多く、我々のグループもこの説を支持す

るデータを示してきた。Th1 優勢という説に従えば、産性された IFN- $\gamma$  によるマクロファージの活性化、炎症メディエーターの産生、組織破壊というカスケードを描くことができる。しかしながら、Th2 優勢については組織破壊との関連が明らかになっていない。この点において我々がすでに明らかにした T 細胞クローンの RANKL mRNA 発現が重要な意味を持つことになる。すなわち以下の仮説が提示される。Th2 優勢な歯周炎組織においては Th1 の抑制、およびその結果としての IFN- $\gamma$  産生抑制が生じ、活性化 T 細胞 (Th2) による膜型 RANKL 発現、あるいは可溶性 RANKL の産生が亢進していると考えられる。その結果、破骨細胞の分化・活性化を誘導し、歯槽骨吸収に至ることが推測される。本研究ではこの点に焦点を絞り以下に記す方針で解析を進めることとした。

## 2. 研究の目的

慢性炎症性疾患における骨組織破壊の機構に RANKL が必須であるということが現在までの研究により明らかにされつつある。RANKL は慢性関節性リウマチの分野で研究が進んでいるが、その病態形成の相似性から近年、歯周炎においてもその注目が集まってきている。しかしながら、まだ RANKL による炎症性骨組織破壊の制御機構は明らかになっていない。本申請者はこれまでに歯周炎組織から分離してきた T 細胞のクローニングに成功し、そのクローンにおいて RANKL の発現があることを明らかにしてきた。そこで今回 RANKL<sup>+</sup>T 細胞クローンと RANKL<sup>-</sup>T 細胞クローンを細胞、分子、遺伝子レベルで比較検討することにより、T 細胞の RANKL 発現制御機構及び T 細胞による骨組織破壊制御機構を解明することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 被験者の選択と細胞の分離、クローンの樹立

- ① インフォームドコンセントの得られた歯周炎患者より歯周手術時に歯周炎罹患組織を採取する。得られた組織から酵素処理と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を抗 CD3 抗体により

刺激培養し、増殖させる。増殖した細胞から免疫磁気ビーズにより CD4<sup>+</sup>T 細胞の分離を行う。

- ③ ii で分離された CD4<sup>+</sup>T 細胞からすでに我々が確立した方法により T 細胞クローンの樹立を行う。

#### (2) T 細胞クローンの表現型及び機能解析

- ① それぞれの T 細胞クローンの機能的分類を細胞表面マーカーと細胞内サイトカインのプロフィールにより行う。機能解析の中でも特に破骨細胞の分化に重要な働きをしている RANKL の発現については RT-PCR 法による mRNA の発現と特異抗体を用いたフローサイトメトリーにて測定する。
- ② それぞれの T 細胞クローンの機能を明らかにするため、マイトゲンによる非特異的刺戟と歯周病原細菌由来の抗原物質 (*Porphyromonas gingivalis* GroEL) による刺戟を行い、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-10、TGF- $\beta$ 、IL-17、RANKL の産生を ELISA 法にて測定する。また、歯周炎の病態形成に免疫調節機能を持つ T 細胞の関与が疑われることから、制御性マーカーとして近年大きな注目を集めている FOXP3、CTLA-4 の発現を RT-PCR 法にて測定する。

#### (3) RANKL による破骨細胞活性化能の測定

- ① RANKL の発現の認められたクローンについては末梢血単核細胞と M-CSF 存在下で共培養を行い、破骨細胞のマーカーの一つである酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼの産生を組織科学的に測定する。さらに carbonated calcium phosphate でコートされた破骨細胞活性化アッセイ用基質プレート OAAS™ 上で共培養し、吸収窩のエリアをコンピューターによる画像解析を行って破骨細胞の活性化能を測定する。また、同様の実験を抗 RANKL 抗体存在下においても検索し、比較検討する。
- ② RANKL の発現の認められなかったクローンについては、マイトゲンおよび、歯周病原細菌由来抗原により刺戟を行い、RANKL の発現の変化を検索する。この刺戟によって RANKL の発現の認められた細胞については i 同様に破骨細胞の活性可能を測定する。

#### 4. 研究成果

インフォームドコンセントの得られた慢性歯周炎患者より歯肉組織を採取、単核細胞を分離し培養後、磁気分離法にて CD4<sup>+</sup>T 細胞ライン (GT ライン) を樹立した。比較対象として同一患者の末梢血より同様の方法で末梢血由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞ライン (PB ライン) を樹立した。これらのラインにおいて Th17 を含む T 細胞サブセット関連分子および骨吸収関連分子の発現をフローサイトメトリーにて解析した。結果、IFN- $\gamma$  陽性細胞率は平均すると GT ラインが PB ラインより高い傾向であったのに対し、IL-4 では GT ラインが PB ラインよりも低い傾向にあった。IL-17 陽性細胞率は平均すると GT ラインのほうが PB ラインよりも高かったがこれは GT ラインの 1 つで IL-17 陽性細胞率が特に高いことが影響した。RANKL の発現は PB ライン、GT ラインの両方で認められた。これらのことから歯周炎組織中には破骨細胞分化を促進させる RANKL<sup>+</sup>細胞と Th17 細胞が存在し、これらの細胞が歯周炎組織における骨破壊に関与している可能性が示された。

#### 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 4 件)

- 1) 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 Periodontal Res. 2008 Dec;43(6):635-41. Epub 2008 Jun 25. 査読有り
- 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. 2008 Sep;395(1-2):137-41. Epub 2008 Jun 8. 査読有り
- 3) Okui T, Ito H, Honda T, Amanuma R, Yoshie H, Yamazaki K. Characterization of CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T-cell clones established from chronic inflammatory lesions. J Microbiol Immunol. 2008 Feb;23(1):49-54. 査読有り
- 4) Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, Yoshie H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Quantitative

messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha in gingivitis and periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 2007 Dec;22(6):398-402. 査読有り

[学会発表] (計7件)

- 1) 中島貴子、本田朋之、奥井隆文、梶田桂子、土門久哲、高橋直紀、前川知樹、天沼亮子、伊藤晴江、多部田康一、山崎和久：歯周疾患が脂質代謝に及ぼす影響第. 第21回日本歯科医学会総会、日本歯科医学会雑誌 第61巻第5号、プログラム抄録集、ポスターセッション、P151、横浜、2008.11.15.
- 2) 奥井隆文、伊藤晴江、本田朋之、中島貴子、多部田康一、吉江弘正、山崎和久：歯周炎組織から樹立した CD4<sup>+</sup>T 細胞ラインにおける Th17 関連分子の解析. 第51回日本歯周病学会秋季学術大会、日本歯周病学会会誌 第50巻秋季特別号、P89、四日市、2008.10.19
- 3) 本田朋之、青木由香莉、高橋直紀、前川知樹、中島貴子、伊藤晴江、多部田康一、奥井隆文、梶田桂子、土門久哲、吉江弘正、山崎和久：歯周炎組織における Th17 関連サイトカイン/マーカー遺伝子発現解析. 第51回日本歯周病学会秋季学術大会、日本歯周病学会会誌 第50巻秋季特別号、P88、四日市、2008.10.19.
- 4) Nakajima T, Amanuma R, Aoki Y, Honda T, Okui T, Domon H, Kajimta K, Takahashi N, Maekawa T, Ito H, Tabeta K, Yamazaki K: Lymphoid and inflammatory chemokine expression in chronic periodontitis lesions. 86<sup>th</sup> General Session and Exhibition of International Association for Dental Research. Toronto, Canada, July 5, 2008.
- 5) 中島貴子、天沼亮子、青木由香莉、本田朋之、奥井隆文、土門久哲、梶田桂子、高橋直紀、前川知樹、伊藤晴江、多部田康一、山崎和久：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. 第128回日本歯科保存学会春季学術大会、日本歯科保存学雑誌 第51巻秋春季特別号、P102、新潟、2008.6.5-6.
- 6) Nakajima T, Amanuma R, Ueki-Maruyama K, Oda T, Honda T, Ito H, Yamazaki K: CXCL13 Expression in B-cell Dominant Periodontitis Lesions. 第55回国際歯科研究学会(JADR)総会・学術大会, Yokohama

December 17, 2007.

- 7) 梶田桂子、本田朋之、天沼亮子、土門久哲、奥井隆文、伊藤晴江、多部田康一、中島貴子、吉江弘正、山崎和久：歯周炎における Toll-like receptors および interferon- $\alpha$  の発現. 第50回日本歯周病学会春季学術大会、横須賀、2007.5.19、日本歯周病学会会誌第49巻春季特別号、133, 2007

## 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

### (3) 連携研究者

無し

### (4) 研究協力者

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