

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791616  
 研究課題名（和文）ケモカインからみた歯周炎病変局所浸潤リンパ球の組織破壊への  
 関与に関する研究  
 研究課題名（英文）Roles of chemokines on lymphocytes migration in periodontally diseased  
 tissues  
 研究代表者  
 細川 義隆（HOSOKAWA YOSHITAKA）  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：90346011

研究成果の概要：

歯周炎病変局所にはリンパ球をはじめとした様々な免疫担当細胞が認められ、歯周組織破壊に関与していると考えられている。特にリンパ球集積部では、歯周組織の構成細胞である歯肉線維芽細胞、歯肉上皮細胞、血管内皮細胞などが浸潤リンパ球との相互作用により様々な起炎物質を出し、歯周炎の進行に関与していることが示唆されている。また、近年 Th1 細胞が歯周組織破壊に関与していることも示唆されているが、歯周炎病変局所への Th1 細胞の浸潤機構は明らかとされていない。本研究では Th1 細胞浸潤に関与しているとされる Th1 ケモカインである CXCL16 に着目し、その歯周炎組織での発現ならびに歯周組織構成細胞の一つである歯肉線維芽細胞に CXCL16 産生能があるかどうかを明らかとするため研究を行った。その結果、歯周炎組織には CXCL16 発現が認められ、そのレセプターである CXCR6 発現細胞が多く浸潤していることが明らかとなった。また、歯肉線維芽細胞は IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ならびに IFN- $\gamma$ 刺激により CXCL16 を産生し、その産生には MAPK, PI3K ならびに NF- $\kappa$ B を介したシグナル伝達経路が関与している事が明らかとなった。これらのことより、歯周炎病変局所への Th1 細胞浸潤に CXCL16 が関与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

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、Th1 細胞、歯肉線維芽細胞、CXCL16

1. 研究開始当初の背景

歯周炎病変局所にはリンパ球をはじめとした様々な免疫担当細胞が認められ、歯周組織破壊に関与していると考えられ

ている。特にリンパ球集積部では、歯周組織の構成細胞である歯肉線維芽細胞、歯肉上皮細胞、血管内皮細胞などが浸潤リンパ球との相互作用により様々な起炎

物質を出し、歯周炎の進行に関与していることが示唆されている。また近年、活性化T細胞あるいはB細胞が破骨細胞活性化に関与している破骨細胞分化因子(RANKL)を発現しており、歯周炎病変局所での骨吸収に深く関与していることが明らかとなってきた(Kawaiら, *Am. J. Pathol.*, 169(3), 987-98, 2006)。さらには、歯周病原性細菌に感作されたTh1型ヘルパーT細胞(Th1細胞)はラットにおいて歯槽骨吸収を引き起こしたことも報告されている(Kawaiら, *J. Immunol.*, 164(4), 2102-9, 2000)。しかしながら、これらのリンパ球がどのようなメカニズムで歯周炎病変局所に浸潤してくるのか、そのメカニズムに関しては不明な点が多い。

ケモカインはリンパ球をはじめとする炎症性細胞浸潤を調節する因子として重要な働きをすることが明らかとなっている。歯周炎においてもマクロファージの遊走に関与するMCP-1(Hanazawaら, *Infect. Immun.*, 61(12), 5219-24, 1993)、好中球の遊走に関与するIL-8(Tonettiら, *Infect. Immun.*, 62(9), 4005-14, 1994)などのケモカインが発現していることが報告されている。申請者は主にT細胞の遊走に関与しているケモカインに着目し、活性化T細胞の遊走に関与しているCCL20(Hosokawaら, *Clin. Exp. Immunol.*, 128(3), 548-54, 2002)、Th2型ヘルパーT細胞(Th2細胞)の遊走に関与しているとされるCXCL12(Hosokawaら, *Clin. Exp. Immunol.*, 141(3), 467-74, 2005)の歯周炎病変局所での発現を明らかとし、さらに歯周組織の主な構成細胞の一つである歯肉線維芽細胞がこれらのケモカインを産生しうることも明らかとした(Hosokawaら, *Clin. Exp. Immunol.*, 141(3), 467-74, 2005; Hosokawaら, *Clin. Exp. Immunol.*, 142(2), 285-91, 2005)しかしながら、近年、歯周組織破壊に大きく関与していることが明らかとなっているTh1細胞の歯周炎病変局所への浸潤を制御しているメカニズムに関してはほとんど分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では歯周炎の病態形成におけるTh1細胞浸潤メカニズムを明らかとするためにTh1ケモカインの一つであるCXCL16に着目し、以下のことを検討す

ることを目的とした。

- ① 炎症歯肉組織においてTh1細胞浸潤に関与しているケモカインであるCXCL16ならびにそのレセプターであるCXCR6の発現に着目し、その役割について検討する。
- ② 歯周組織構成細胞である歯肉線維芽細胞を用い、歯肉線維芽細胞を様々なサイトカインで刺激し、CXCL16発現に関して検討を加える。また、CXCL16産生に関与している細胞内シグナル伝達機構についても検討を加える。

## 3. 研究の方法

①ヒト歯肉組織試料の採取および連続切片の作成:ブローピング深さ(PD)が6mm以上でブローピング時の出血(BOP)を認める辺縁性歯周炎を有し、全身疾患に罹患しておらず、喫煙習慣のない患者より歯周治療を行う際に得られた歯肉片を炎症歯肉として採取する。また、矯正治療のための便宜抜歯を行う患者において、抜歯部位のPDが3mm以下でBOPを認めないことを確認した後、抜歯時に得られた歯肉片を正常歯肉として採取する。試料の一部は凍結切片作成のためOCTcompound中に包埋し、液体窒素を用い急速凍結した後、現有の凍結切片作成装置(クリオスタット)にて連続切片を作成した。

②歯肉組織中のCXCL16ならびにCXCR6発現の解析:HE染色にて歯肉組織の炎症程度を確認した後、CXCL16抗体ならびにそのレセプターであるCXCR6抗体を用い、免疫組織化学的解析を用い歯肉組織中でのタンパクを解析した。また、歯肉組織よりRNAを抽出した後、炎症歯肉組織ならびに正常歯肉組織中のCXCL16およびCXCR6 mRNA発現をRT-PCR法にて測定した。

③歯肉線維芽細胞からのCXCL16産生の解析:①の条件で採取した正常歯肉組織からoutgrowth法を用い、ヒト歯肉線維芽細胞(HGFs)を得た。刺激物質として、炎症歯肉組織中に発現されていると報告されている炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )、Th1サイトカイン(IFN- $\gamma$ )、Th2サイトカイン(IL-4, IL-13)を用いた。CXCL16 mRNA発現をRT-PCR法にて、培養上清中のCXCL16蛋白産生をELISA

法にて検討をした。

④CXCL16産生に対するMAPK, PI3KおよびNF- $\kappa$ Bの関与に関する解析: ③の条件にて刺激を行う前にMAPKに対する阻害剤(SB203580, PD98059, SP600125)、PI3K阻害剤(LY294002)あるいはNF- $\kappa$ B阻害剤(MG132)を用い至適濃度にて前処理した後、サイトカインにて刺激し、CXCL16産生をELISA法を用い確認した。

#### 4. 研究成果

免疫組織化学的解析により歯周炎病変局所においてはCXCL16が存在し、同一部位にCXCR6陽性炎症性細胞が浸潤していることが明らかとなった。また、HGFsのCXCL16産生は炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ならびにTh1関連サイトカインであるIFN- $\gamma$ により濃度依存的に増強された。また、IL-1 $\beta$ が誘導したCXCL16はTh2関連サイトカインであるIL-4ならびにIL-13により抑制された。さらに、シグナル伝達物質であるp38 MAPK, ERK, JNK, PI3KならびにNF- $\kappa$ BがHGFのCXCL16産生に関与していることが明らかとなった。

これらの結果より、歯周炎組織中においてHGFのCXCL16産生は様々なサイトカインによりコントロールされていることが明らかとなった。また、CXCL16はTh1細胞浸潤に関連していることより、歯周炎病変局所において多くのサイトカインによってTh1細胞浸潤は調節されていることが示唆された。

#### 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6件)

① Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, Cytokines differentially regulate CXCL10 production by interferon gamma-stimulated or tumor necrosis factor alpha-stimulated human gingival fibroblasts, Journal of Periodontal Research, in press, 査読有

② Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hiromichi Yumoto,

Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, Proinflammatory effects of muramyl dipeptide on human gingival fibroblasts, Journal of Periodontal Research, in press, 査読有

③ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, Human gingival fibroblasts express functional chemokine receptor CXCR6, in press, 査読有

④ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, CC chemokine ligand 17 in periodontal diseases: expression in diseased tissues and production by human gingival fibroblasts, Journal of Periodontal Research, 43巻, 471-477頁 (2008年) 査読有

⑤ Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, Adrenomedullin suppresses tumor necrosis factor alpha-induced CXC chemokine ligand 10 production by human gingival fibroblasts, Clinical and Experimental Immunology, 152巻, 568-575頁 (2008年) 査読有

⑥ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, CXC chemokine ligand 16 in periodontal diseases: expression in diseased tissues and production by cytokine-stimulated human gingival fibroblasts, Clinical and Experimental Immunology, 149巻, 146-154頁 (2007年) 査読有

[学会発表] (計16件)

① Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo: Adrenomedullin inhibits CXCL10 production by human gingival fibroblasts. 第56回国際歯科学研究学会日本部会学術大会 (2008. 11. 29, 愛知学院大学)

② 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中江英明、松尾敬志: ヒト歯肉線維芽細胞は機能的にCXCR6を発現している、第129回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2008. 11. 6, 富山国際会議場)

- ③ 細川育子、細川義隆、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：Toll-like Receptor Ligands 刺激が誘導する単球の CCL20 産生に及ぼす Adrenomedullin の影響、第 129 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2008. 11. 6, 富山国際会議場)
- ④ 細川育子、細川義隆、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：ヒト歯肉線維芽細胞における TLR4 ligand が誘導する CXCL10 産生に及ぼす Adrenomedullin の影響、第 51 回日本歯周病学会秋季学術大会 (2008. 10. 19, 四日市文化会館)
- ⑤ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中西正、中江英明、松尾敬志：カテキンは Oncostatin M が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生および接着分子発現を抑制する。第 51 回日本歯周病学会秋季学術大会 (2008. 10. 19, 四日市文化会館)
- ⑥ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo: Th17 cytokines enhance CCL20 production by human gingival fibroblasts. 86<sup>th</sup> General session & exhibition of the IADR (2008.7.5, Toronto)
- ⑦ Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hiromichi Yumoto, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo: Pro-inflammatory roles of NOD2 in human gingival fibroblasts. 86<sup>th</sup> General session & exhibition of the IADR (2008.7.5, Toronto)
- ⑧ 細川育子、細川義隆、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：Toll-like Receptor Ligands 刺激が誘導する単球の IL-1beta 産生に及ぼす Adrenomedullin の影響、第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2008. 6. 6, 新潟朱鷺メッセ)
- ⑨ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：Flagellin がヒト歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生および接着分子発現に与える影響、第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2008. 6. 6, 新潟朱鷺メッセ)
- ⑩ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：Toll-like receptor

ligands がヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に与える影響、第 51 回日本歯周病学会春季学術大会 (2008. 4. 25, 大宮ソニックシティ)

- ⑪ 細川育子、細川義隆、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：Adrenomedullin がヒト歯肉線維芽細胞の Toll-like Receptor Ligands 誘導サイトカイン産生に与える影響、第 51 回日本歯周病学会春季学術大会 (2008. 4. 25, 大宮ソニックシティ)
- ⑫ Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hiromichi Yumoto, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo: Proinflammatory roles of NOD2 in human gingival fibroblasts. 国際歯科研究学会日本部会学術大会 (2007. 11. 17, 鶴見大学記念館)
- ⑬ 細川育子、細川義隆、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：Adrenomedullin がヒト歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生に与える影響の解析、第 127 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2007. 11. 8 岡山コンベンションセンター)
- ⑭ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：サイトカインがヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に与える影響、日本歯周病学会 50 周年記念大会 (2007. 9. 21, 東京国際フォーラム)
- ⑮ 細川義隆、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：サイトカイン刺激によるヒト歯肉線維芽細胞における CXCL16 産生の解析、第 126 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2007. 6. 7, 大宮ソニックシティ)
- ⑯ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：ヒト歯肉線維芽細胞における CCL17 産生の解析、第 50 回日本歯周病学会春季学術大会 (2007. 5. 17, 横須賀芸術劇場)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細川 義隆 (HOSOKAWA YOSHITAKA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教

研究者番号：90346601