

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～2010

課題番号：20592195

研究課題名（和文） 新たなヘルパー T 細胞と自然免疫から口腔粘膜のびらん・潰瘍病変の発現機序を解明する

研究課題名（英文） A study of mechanisms underlying oral mucous disease on helper T cells and innate immunity.

研究代表者

菅原 由美子 (SUGAWARA YUMIKO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：30235866

研究成果の概要（和文）：IL-17 は IL-6 と TGF- β の誘導で分化した Th17 から IL-23 の作用で産生され、上皮細胞や線維芽細胞などからの炎症メディエーターの産生を誘導し炎症性疾患や自己免疫疾患に関与している可能性がある。IL-18 は多様な生物活性をもつサイトカインであり、IL-12 存在下で Th1 への分化と IFN- γ の産生を誘導し、非存在下で Th2 への分化を誘導し上皮細胞からも産生され、炎症性疾患や自己免疫疾患に関与している可能性がある。SS 唾液腺組織では IL-18 および IL-17 を著明に発現しており、SS 唾液腺に浸潤するリンパ球は主に CD4⁺T 細胞で、その多くで IL-17 を発現していた。SS 患者の唾液腺組織に発現している IL-18 は、Th17 が産生する IL-17 と共同して炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導することにより、SS における唾液腺の病態発現機序に関与する。

研究成果の概要（英文）：IL-18 is a proinflammatory cytokine and plays an important pathogenic role in inflammatory and autoimmune disorders. IL-17 is also a proinflammatory cytokine and IL-17-secreting Th17 cells are involved in autoimmunity. The majority of the infiltrating cells in the salivary glands of SS patients were CD4⁺ T cells, and CD8⁺ T cells were infiltrated to a lesser extent. The predominant expression of IL-17 was found in infiltrating CD4⁺ T cells, whereas a small number of infiltrating CD8⁺ T cells expressed IL-17. Primary salivary gland cells from normal subjects partially confirmed these findings. These results suggest that IL-18 and Th17 cells detected in the salivary glands in SS patients are associated with the pathogenesis of SS in the salivary glands.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：口腔診断学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：口腔粘膜、免疫応答、口腔粘膜疾患、サイトカイン、自己免疫疾患、T細胞

1. 研究開始当初の背景

従来 CD4⁺T 細胞には細胞性免疫に関与する 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) と、液性免疫に

関与する 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) があることが知られていた。また、免疫応答を負に制御する CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Treg) の重

要性も注目されている。ところが最近、Th17細胞と呼ばれる新たなT細胞サブセットが存在し、これがアレルギー応答や自己免疫、細胞外増殖性の細菌感染防御などで中心的な役割を果たしていることが分かってきた。

(Nature 441:166-168, 2006) 即ち、ヘルパーT細胞には少なくとも4つのサブセット(Th1、Th2、Th17、Treg)が存在し、T細胞依存性の免疫応答において重要な役割を果たしている。Th1細胞とTh2細胞の分化は相互排他的であり、Th1およびTh2細胞がTh17細胞分化を抑制する一方、Th17細胞がTh1、Th2細胞分化に対し抑制的であることも示唆されている。Treg細胞のTh17細胞分化に対する作用は知られていないが、Tregの分化に必要なIL-2はTh17細胞分化を阻害し、逆にIL-6の存在はTreg細胞分化を抑えTh17細胞分化を促進する。この様に、各T細胞サブセットは相互に緊密な相互調節によって恒常性を維持している。口腔粘膜疾患においては、特に、びらん・潰瘍病変(口腔扁平苔癬、GVHD、非特異的口内炎など)は、難治性であり臨床経過も長く疼痛症状による摂食障害など患者の苦痛は大きい。これらの病変は未だ発現機序が不明であるため、十分な治療法は確立されていないのが現状である。一方、口腔粘膜は刺激や口腔細菌に対するバリアとして機能する自然免疫系と、様々な受容体を介してサイトカインや増殖因子を産生することによる獲得免疫系が働き、口腔粘膜の恒常性を維持している。この防御機構の破綻・異常が口腔粘膜にびらん・潰瘍病変を発症すると考えられる。特に、口腔扁平苔癬、GVHD、非特異的口内炎はT細胞の浸潤が特徴的であり、その病態発現にはTh1やTh2の関与が示唆されているが、未だ明確な解明はなされていない。これは、Th17の視点がなかったことが考慮される。したがって、Th17細胞の分化がどの様に制御され、他のT細胞サブセットとのバランスがどの様に保たれているのかを明らかにすることが、口腔扁平苔癬やGVHDなど口腔粘膜におけるびらん・潰瘍病変の発現機序や種々の病原体に対する感染防御機構を解明する上で重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、新たなヘルパーT細胞であるTh17細胞が口腔粘膜におけるびらん・潰瘍病変の発現において重要な役割を担っている事実を立証するために、口腔粘膜におけるTh17の役割および自然免疫系との相互関係を明らかにし、難治性である口腔粘膜疾患の新規治療ターゲットとして治療法への応用を目的とした。

3. 研究の方法

本研究の実施にあたり、組織などの試料採取には、患者に本研究の主旨について十分な説明をレインフォームド・コンセントを得た上で行った。

(1) Th17, TLRs, NODs の発現・同定

① CD4⁺T細胞のIL-17発現を抗IL-17抗体を用いた細胞内IL-17染色によるフローサイトメトリーと免疫細胞化学染色にて解析。抗CD4抗体、抗CD8抗体などを併用し細胞膜表面抗原を染色することでCD4⁺T細胞での発現を調べた。

② 同様にTh17特異的な転写因子STAT3発現とそのリン酸化を細胞内染色とウェスタンブロット法を用いた。

③ 口腔粘膜組織を抗IL-17抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗TLRs抗体、抗NODs抗体などで免疫組織化学染色し、組織中の発現の有無とその局在を検索した。

④ 抗CD4抗と抗INF- γ 抗体を使った免疫組織化学染色による二重染色にてTh17との相関関係について明確にした。

(2) HLA誘導のメカニズムの解明

HLAの誘導には細胞外ATPが鍵を握っている。そこで、口腔粘膜の培養細胞を用いて細胞外ATPを濃度、刺激時間を変えながら刺激し、HLAの発現誘導を解析した。

① 細胞膜および細胞内のタンパク質は抗HLA抗体を用いた細胞内によるフローサイトメトリーと免疫細胞化学染色

② HLAに特異的な転写因子発現はリアルタイムPCRにて解析

4. 研究成果

(1) 自然免疫の口腔粘膜における検索。 侵襲細菌に特異的な分子をパターン認識して自然免疫を発動するToll-like receptor (TLR)系ならびにnucleotide-binding oligomerization domain (NOD)系分子について、口腔上皮における発現を検討した。

① 正常歯肉組織でもこれら分子は発現していたが、炎症歯肉組織ではその発現が亢進していた。

② 扁平苔癬患者の口腔粘膜上皮でも同様に、発現の亢進が認められた。

③ 慢性GVHD患者(免疫抑制剤の服用中)の口腔粘膜上皮、唾液腺上皮では発現はほとんど認められなかった。以上より、口腔上皮ではさまざまなパターン認識分子を介して侵襲細菌を認識し、抗菌物質などを産生して自然免疫応答に積極的に関与しているものと考えられた。

(2) 新たなヘルパーT細胞の口腔粘膜における検索。

① IL-18は抗原刺激がなくても種々の細胞に作用してTh1反応とTh2反応を促進する唯一のサイトカインである。シェーグレン症

候群患者の唾液腺組織においては IL-18 の発現が認められた。口腔扁平苔癬患者の口腔粘膜上皮では、IL-18 の発現は正常粘膜と同様に認められた。

② IL-17は炎症性サイトカインであり、多くの炎症性疾患や自己免疫疾患への関与が示唆されている。シェーグレン症候群患者の唾液腺組織においては導管上皮細胞および浸潤細胞に IL-17の発現が認められた。慢性GVHD患者（免疫抑制剤の服用中）の口腔粘膜上皮、唾液腺上皮では発現はほとんど認められなかった。

(3)異所性の MHC class II 分子の発現は、組織特異的な自己免疫疾患の発症に大きく関与している。本研究では、細胞外 ATP が唾液腺上皮細胞における MHC class II 分子の発現に及ぼす影響について解析し、細胞外 ATP と唾液腺上皮細胞の免疫応答との関わりについて検討を行った。

その結果、ヒト唾液腺上皮細胞株は細胞内に MHC class II 分子を恒常的に発現しており、細胞外 ATP 刺激により P2X7 受容体を介して、MHC class II 分子を細胞膜表面へ表出させると同時に、オートファゴソームに関連した exosome に内包された形で細胞外に放出する可能性が示された。これより、細胞外 ATP がシェーグレン症候群発症に関与するという新たな可能性が示唆された。

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 5 件)

1. Mika Masaki, Takuichi Sato, Yumiko Sugawara, Takashi Sasano, Nobuhiro Takahashi. : Detection and identification of non-*Candida albicans* species in human oral lichen planus. *Microbiol Immunol* 55 (査読有り) 2011. 66-70.
2. 及川麻理子、清水良央、菅原由美子、宮下仁、丹田奈緒子、熊本裕行: 慢性移植片対宿主病 (cGVHD) の 1 割検例—口腔病変を中心に—. *東北大学歯学雑誌* (査読有り) 2010. 65-69.
3. 酒井梓, 菅原由美子, 黒石智誠, 笹野高嗣, 菅原俊二: シェーグレン症候群におけるサイトカイン異常. *リウマチ科*42 (査読有り) 2009. 211-215.
4. Shimeno Y, Sugawara Y, Iikubo M, Shoji N, Sasano T: Sympathetic nerve fibers sprout into rat odontoblast layer, but not into dentinal tubules, in response to cavity preparation. *Neurosci Lett* 435 (査読有り) 2008. 73-77.
5. Azusa Sakai, Yumiko Sugawara,

Toshinobu Kuroishi, Takashi Sasano, Shunji Sugawara: Identification of IL-18 and Th17 Cells in Salivary Glands of Patients with Sjogren's Syndrome, and Amplification of IL-17-Mediated Secretion of Inflammatory Cytokines from Salivary Gland Cells by IL-18. *J Immunol* 181(査読有り) 2008. 2898-2096.

[学会発表] (計 16 件)

1. 伊藤あゆみ、永井康裕、菅原由美子、菅原俊二、笹野高嗣. 細胞外ATPによる唾液腺導管上皮細胞表面へのMHC class II分子の表出誘導. 第52回歯科基礎医学会. 2010年9月22日. 東京 (日本).
2. 伊藤あゆみ、菅原由美子、永井康裕、菅原俊二、笹野高嗣. 唾液腺上皮細胞におけるP2X7受容体を介したMHC class II分子の表出誘導. 第19回日本シェーグレン症候群学会. 2010年9月9日. 千葉 (日本).
3. 藤林孝司、菅原由美子、神部芳則、伊東大典、中村誠司、小宮山一雄、田中昭男、朔敬、前田初彦、長谷川博雅. シンポジウム「口腔扁平苔癬の診療ガイドラインの策定を目指して」. 第20回日本口腔粘膜学会総会・第21回日本臨床口腔病理学会総会. 2010年7月31日. 大阪 (日本).
4. 伊藤あゆみ、菅原由美子、永井康裕、菅原俊二、笹野高嗣. 細胞外ATPはヒト唾液腺導管上皮細胞表面へのMHC class IIの発現を誘導する. 第20回日本口腔粘膜学会総会・第21回日本臨床口腔病理学会総会. 2010年7月31日. 大阪 (日本).
5. K. Sato, Y. Sugawara, T. Kuroishi, T. Hoshino, T. Sasano and S. Sugawara. IL-18 overexpression induces SS-like feature in mice. 10th International Symposium on Sjogren's Syndrome. 2009年10月2日. Brest (France).
6. Azusa Sakai, Yumiko Sugawara, Toshinobu Kuroishi, Takashi Sasano and Shunji Sugawara. Function of IL-18 and Th17 in salivary gland of the patient with Sjogren's syndrome. 10th International Symposium on Sjogren's Syndrome. 2009年10月2日. Brest (France).
7. Azusa Sakai, Yumiko Sugawara, Toshinobu Kuroishi, Takashi Sasano, Shunji Sugawara. Identification of IL-18 and Th17 Cells in Salivary Glands of Patients with Sjogren's Syndrome, and Amplification of IL-17-Mediated Secretion of Inflammatory Cytokines from Salivary

- Gland Cells by IL-18. 第18回日本シェーグレン症候群学会. 2009年 9月4日. 福岡 (日本).
8. K Satou, T Kroishi, Y Tanaka, T Nishioka, T Hoshino, Y Sugawara, S Sugawara. Analysis of salivary gland disorder and autoantibody by IL-18 overexpression in mice. The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2008年12月1日. Kyoto (Japan).
 9. 佐藤恭子、黒石智誠、田中志典、西岡貴志、菅原由美子、菅原俊二. IL-18 遺伝子導入マウスにおける唾液腺障害と自己抗体の解析. 第50回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2008年9月23日. 東京 (日本).
 10. 菅原由美子. シンポジウム: 口腔粘膜疾患患者の医療面接および診断の進め方ー口腔粘膜疾患の口腔診査ー. 第21回日本口腔診断学会総会・学術集会. 2008年9月20日. 東京 (日本).
 11. 酒井 梓、菅原由美子、黒石智誠、笹野高嗣、菅原俊二. シェーグレン症候群の唾液腺におけるIL-18とIL-17の関与. 第18回日本口腔粘膜学会総会・学術集会. 2008年9月20日. 東京 (日本).
 12. 佐藤恭子、黒石智誠、田中志典、伊藤あゆみ、西岡貴志、菅原由美子、笹野高嗣、菅原俊二. IL-18 Tg マウスにおける唾液腺の組織学的変化と自己抗体の解析. 第18回日本口腔粘膜学会総会・学術集会. 2008年9月20日. 東京 (日本).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 由美子 (SUGAWARA YUMIKO)
東北大学・病院・助教
研究者番号: 30235866

(2) 研究分担者

酒井 梓 (SAKAI AZUSA)
東北大学・病院・医員
研究者番号: 90463778

菅原 俊二 (SUGAWARA SHUNJI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 10241639

笹野 高嗣 (SASANO TAKASHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 10125560

(3) 研究連携者

無し

(4) 研究協力者

伊藤 あゆみ (ITOU AYUMI)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院生