

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00555

研究課題名(和文) 歯周病の病態メカニズムに基づく先進的免疫療法の基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for new immunological therapies based on a pathological mechanism of periodontal disease

研究代表者

田中 芳彦 (Tanaka, Yoshihiko)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：00398083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は歯周病原細菌による感染症で、ヘルパーT細胞Th17が原因であることが注目されていますが、詳しい免疫応答の機序は不明でした。歯周病患者が1日に飲み込んでいる量の歯周病原細菌をマウスの腸に入れると、腸の пейエル板から歯周病原細菌が取り込まれて、歯周病原細菌に反応するTh17細胞(責任Th17細胞)が腸で活性化することがわかりました。その後、責任Th17細胞は腸から歯周病原細菌が感染している歯肉へ移動して、歯周病の重症化を引き起こすことを解明しました。一方、腸内細菌がないマウスでは、責任Th17細胞は活性化されず歯周病が起こらなかったため、腸内細菌が歯周病の発症に関わっていました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は我が国で約400万人が罹患している国民病といえる疾患です。高齢化が進む中、歯周病の重症化は歯を失う最大の原因であることから、歯周病の発症と重症化のメカニズムの解明が待たれています。歯周病の原因として歯周病原細菌に反応するヘルパーT細胞が注目されていましたが、その免疫応答の詳細なメカニズムは不明でした。口から流れ込んだ歯周病原細菌が腸で取り込まれ、腸内細菌の影響を受けて活性化したヘルパーT細胞が口へ移動して歯周病の発症と重症化を引き起こすことを発見しました。腸内細菌をターゲットとした薬剤や整腸剤による新しい予防法と治療法の開発が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is an infection caused by periodontal pathogenic bacteria and has attracted attention as being caused by the helper T cell Th17, but the detailed mechanism of immune response was unknown. When periodontal pathogenic bacteria were introduced into the intestines of mice at the amount that periodontal disease patients swallow daily, it was found that periodontal pathogenic bacteria were taken up from the Peyer's patches of the intestines and that Th17 cells that respond to periodontal pathogenic bacteria (responsible Th17 cells) were activated in the intestines. Subsequently, we elucidated that the responsible Th17 cells migrate from the gut to the mouth, which is infected with periodontal pathogenic bacteria, causing severe periodontal disease. Meanwhile, in mice without intestinal bacteria, the responsible Th17 cells were not activated and periodontal disease did not occur, indicating that intestinal bacteria were involved in the development of periodontal disease.

研究分野：口腔科学およびその関連分野

キーワード：口腔感染症 免疫応答 歯周病 ヘルパーT細胞 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

歯周病は口腔の特定の病原微生物が原因で発症し、インターロイキン-17A(IL-17A)産生を特徴とするヘルパーT細胞 Th17 による免疫応答が病態に悪影響を及ぼすことが明らかになってきた。しかし、歯周病の病態は十分に解明されておらず、基礎的研究の社会的要請が高まっている。

これまで多くの歯周病研究が口腔内局所の解析によるものであったが、歯周病がさまざまな全身疾患に影響を及ぼすことが解明されており、口腔内細菌が腸内細菌叢に影響を及ぼす「口腔(歯周病)→全身」の概念が定着してきた。一方、腸管をはじめとする全身が歯周病などの口腔感染症へ影響を及ぼすという「全身(腸管)→口腔(歯周病)」の逆ベクトルの研究は知られていなかった。

Th17 細胞は多くの自己免疫疾患と関係があり、矛先を自己に向けると悪者で攻撃性の高い細胞と考えられている。Th17 細胞の生体内での主たる分化の「場」が小腸であることが解明され、腸内細菌によって活性化された Th17 細胞がブドウ膜炎や脳脊髄炎といった自己免疫疾患の発症に関与することが次々と明らかにされ注目が集まっている。歯周病の病態メカニズム解析は、口腔を対象とした解析から腸管を対象とした解析へ移行する「パラダイムの転換」の時が来たと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病の病態メカニズムを解明するために、無菌マウスシステムと次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢を解析するとともに、遺伝子改変マウスを用いて歯周病の免疫制御機構を解析し、歯周病疾患モデル動物を活用して歯周病の先進的免疫療法の基盤を確立することである。

3. 研究の方法

腸内細菌叢と免疫制御機構の視点から歯周病の病態メカニズムを解明し、それに基づく先進的免疫療法の基盤確立を目指した。

1) 歯周病における腸内細菌叢の役割の解明

歯周病疾患モデルマウスとして、*Porphyromonas gingivalis* (Pg) 経口感染による口腔内病原体誘発性の歯周炎モデルを作成した。まず、マウスに Pg を腸管に連続して7日間投与し、口腔内歯周炎の免疫反応と区別するために口腔内での感染前に行った。次に、麻酔したマウスに Pg を上顎にスポット感染させた。4週間後、マウス上顎骨を染色し、骨損失を評価した。上顎臼歯の頬側7箇所(図1a)の骨量減少レベルを ImageJ で測定した(図1a)。

生体での腸内細菌叢の役割を解明するために、無菌マウスの各種リンパ組織を採取し、歯周病原細菌に反応する責任 Th17 細胞の分化誘導について SPF マウスと比較解析した。また、細胞試料破碎装置を用いて作成した腸内細菌を次世代シーケンサーで解析した。さらに、歯周病発症モデルマウスを用いて、歯周病発症ならびに IL-17A 産生を指標とした免疫応答について無菌マウスと SPF マウスを比較解析した。加えて、無菌マウスに SPF マウスの糞を移植することで無菌マウスに腸内細菌叢を形成して同様に評価した。

SPF マウスに各種抗菌剤を投与することで腸内細菌叢の一部を破壊して、腸内細菌を次世代シーケンサーにより解析した。また、これらマウス群に対して、腸内で誘導される歯周病原細菌反応性 Th17 細胞の分化状況を解析するとともに、歯周病感染モデルマウスで病態を評価した。

2) 歯周病の病態を司る免疫制御機構の解明

歯周病原細菌を IL-17A-GFP レポーターマウスの腸内投与し、腸管を介して責任 Th17 細胞を

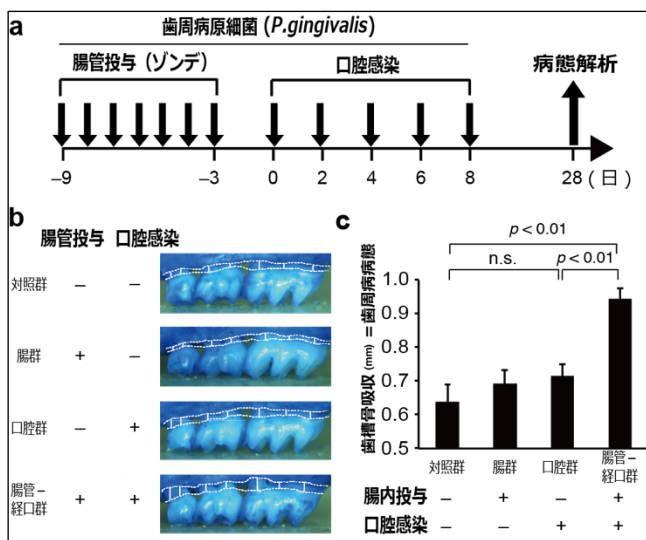


図1 歯周病疾患モデルマウスの実験系

腸管-経口群で歯周病が発症する。対照群、腸群、口腔群では発症しない。

分化誘導した後、口腔内に歯周病原細菌を感染させて歯周病発症を誘導して、GFP を指標に歯肉、腸管、リンパ組織の責任 Th17 細胞を腸内非感作群と比較解析した。

光照射で蛍光色素が変化する遺伝子改変マウス (KikGR マウス) に歯周病原細菌を腸内投与し、腸管にて光照射した蛍光を指標に生体内での責任 Th17 細胞の分布をフローサイトメトリーにて解析した。歯周病原細菌を無菌マウスの腸内投与し、IL-17A の産生を指標に生体内での責任 Th17 細胞を腸内非感作群と比較解析した。歯周病の歯肉組織に浸潤する Th17 細胞におけるケモカインレセプター CCR6、ならびに歯周組織における CCR6 のリガンドであるケモカイン CCL20 の発現レベルを解析した。

3) 歯周病への先進的免疫療法の基盤の確立

歯周病への先進的免疫療法の可能性を探るために、歯周病感染モデルマウスの評価系を用いて、Th17 細胞のマスター転写因子 ROR γ t の阻害剤 GSK805 ならびに IL-17A 中和抗体の投与による歯周病の病態に対する効果を検証した。

4. 研究成果

1) 歯周病における腸内細菌叢の役割の解明

腸管に移行した口腔病原体が口腔内感染に及ぼす影響を検討するため、マウスに Pg を直接腸管投与した後、歯の周囲に糸を装着しない状態で感染させ、軽度口腔病原体誘発歯周炎モデルを構築した (図 1a)。このモデルでは、口腔感染のみ (口腔群) および Pg のみの直接腸管投与 (腸群) は無腸管投与・無感染 (対照群) と比較して有意な歯槽骨の欠損は認められなかった。一方、直接腸管投与と経口感染の両方を行ったマウス (腸管-経口群) では、他の群や同量のグラム陰性菌である大腸菌を腸管投与した場合に比べ、有意な大幅な歯槽骨の欠損が認められた (図 1b, c)。

無菌状態のマウスでは、Pg を腸管に投与しても歯周病の症状が現れず (図 2)、特定の Th17 細胞の増加も見られなかった。しかし、無菌マウスに SPF マウス由来の腸内細菌叢移植 (便秘植) を行うと、Pg に反応する Th17 細胞が増加し、歯周病が発症することが確認された (図 2)。このことから、腸内細菌叢が歯周病の発症と重症化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

腸内細菌の役割を理解するために、SPF マウスに抗菌剤を 4 週間投与して腸内細菌を一部破壊した。その後、Pg を腸内に投与し、腸内細菌を次世代シーケンサーで解析した。抗菌剤の投与は Pg の投与よりも腸内細菌叢に劇的な変化を引き起こすことが分かった。これらのマウスに歯周病感染モデルを適用すると、抗菌剤の種類によって歯周病を悪化させたり、抵抗性をもたらした (図 3)。また、腸内細菌叢の影響によって、腸内で誘導される歯周病原細菌反応性 Th17 細胞の分化に変化が生じていることが分かった。これにより、腸の免疫応答が歯周病の発症と進行に関与しており、「腸-口腔連関」における免疫応答の存在が明らかになった。

2) 歯周病の病態を司る免疫制御機構の解明

IL-17A 産生細胞を可視化するために IL-17A-GFP レポーターマウスを使用した。この実験で、腸管-経口群で歯周組織に多くの GFP 陽性 Th17 細胞が存在することが明らかになった。さらに、歯周組織での IL-17A の mRNA 発現量の増加も確認された。これにより、この歯周病感染モデルマウスにおいて、IL-17A を産生する Th17 細胞の重要性が明らかになった。これらの結果から、Pg が口腔から腸管に移動すると、Th17 細胞の誘導が増加し、歯周病の悪化が促進されることが分かった。

Pg を腸管に投与すると、末梢リンパ節で Pg に反応する Th17 細胞が増加した。この反応を確認するため、樹状細胞に Pg のベシクル成分を提示した。結果として、腸管投与後に末梢リンパ節で Pg に反応する Th17 細胞の増加が確認された。また、蛍光標識した Pg を腸管に投与すると、M 細胞を介してパイエル板の樹状細胞に取り込まれることが示された。熱変性した Pg でも同様の結果が得られた。これは、Pg が腸に定着しなくても、胃酸によって死滅しても、パイエル板で T 細胞抗原として機能することを示唆している。実際に、Pg の腸管投与後の 3 日以内に、パイエル板で Th17 細胞の増加が観察され、その後全身の末梢リンパ組織に広がると考えられた。

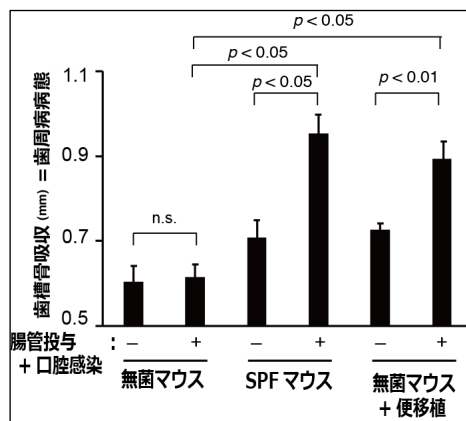


図 2 無菌マウスでは歯周病を発症しない。腸内細菌叢の移植で発症する。

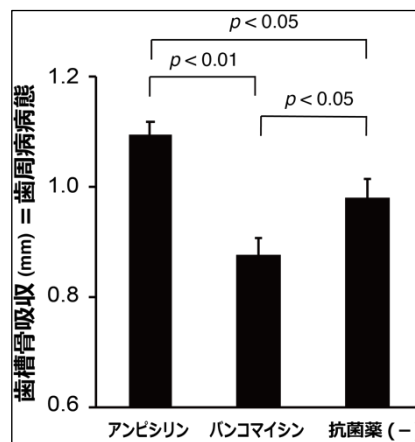


図 3 腸内細菌叢の攪乱が歯周病の病態に影響する。

腸内細菌叢の影響を受けて腸で誘導された Th17 細胞は口腔へ移動する可能性があることが分かった。KikGR マウスの腸内に Pg を投与し、光照射によって細胞を赤蛍光に変化させ、Pg に反応する Th17 細胞の移動を追跡した。結果として、口腔感染が起こると、腸から口腔へ Th17 細胞が移動していることが確認された。Th17 細胞では CCR6 というケモカインレセプターが特徴的に発現することが知られている。歯周組織の Th17 細胞では CCR6 の発現が確認され、口腔感染によって歯周組織で CCR6 のリガンドである CCL20 が産生されていることも分かった。これらの結果から、CCL20 (歯周組織) -CCR6 (Th17 細胞) の軸を介して、Th17 細胞が歯周組織に集積すると考えられた。

3) 歯周病への先進的免疫療法の基盤の確立

IL-17A 中和抗体の投与による歯周病の改善効果を調査した。実験では、全身に抗体を投与することで歯周病の病態が改善することを確認した (図 4)。歯周病の進行が進んだグループでは、歯周組織に多くの Th17 細胞が存在し、IL-17A の発現量も増加していることが分かった。さらに、Th17 細胞のマスター転写因子である ROR γ t を阻害する GSK805 の投与により、歯周病の進行が抑制されることが明らかになった (図 4)。これらの結果は、新しい免疫療法の可能性を示唆しており、歯周病治療として IL-17A の標的化が有望である可能性を示している。

これらの研究内容は、Cell Reports 40:111314, 2022 に公表した。

このようにして歯周病の病態メカニズムに基づく先進的免疫療法の基盤を確立した。これらの研究成果に立脚して、将来的に臨床口腔感染症の研究チームとの連携を強化することでヒト歯周病の研究へと発展させる道を切り開くことができた。

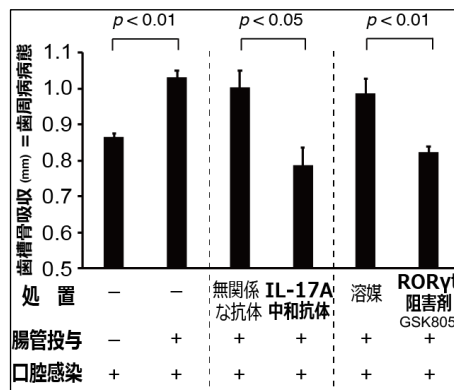


図 4 歯周病に対する免疫療法の基盤。IL-17A 中和抗体、ROR γ t 阻害剤で歯周病の進行が抑制される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Nagao, J., Kishikawa, S., Tanaka, H., Toyonaga, K., Narita, Y., Negoro-Yasumatsu, K., Tasaki, S., Arita-Morioka, K., Nakayama, J., and Tanaka, Y. | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Pathobiont-responsive Th17 cells in gut-mouth axis provoke inflammatory oral disease and are modulated by intestinal microbiome | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 111314 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111314 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Miyazawa, R., Nagao, J., Arita-Morioka, K., Matsumoto, M., Morimoto, J., Yoshida, M., Oya, T., Tsuneyama, K., Yoshida, H., Tanaka, Y. and Matsumoto M. | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Dispensable role of Aire in the CD11c+ conventional dendritic cells for antigen presentation and shaping the transcriptome | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Immunohorizons | 6. 最初と最後の頁 140-158 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.2200103 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Jun-ichi Nagao, Sari Kishikawa, Kenji Toyonaga, Emi Kaji, Kanae Negoro-Yasumatsu, Sonoko Tasaki, Yoshihiko Tanaka. |
| 2. 発表標題 Development of periodontitis mediated by T-cell immune response against periodontal bacteria |
| 3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 永尾潤一, 根来（安松）香奈江, 田中芳彦 |
| 2. 発表標題 歯周病の病態を形成する免疫制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 永尾潤一、岸川咲吏、豊永憲司、加地英美、根来（安松）香奈江、田崎園子、田中芳彦 |
| 2. 発表標題 歯周病の病態形成を制御する宿主免疫システムの解明 |
| 3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会・総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 永尾潤一、岸川咲吏、豊永憲司、根来（安松）香奈江、田崎園子、田中芳彦 |
| 2. 発表標題 歯周病発症を制御する免疫制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会・総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 永尾潤一、根来（安松）香奈江、田中芳彦 |
| 2. 発表標題 宿主免疫応答による歯周病の病態形成機構の解明 |
| 3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池本梨央南、中村麻衣、永尾潤一、有田（森岡）健一、田中芳彦 |
| 2. 発表標題 歯周病原細菌に対する増殖阻害活性を示すヒト口腔内常在細菌のスクリーニングと解析 |
| 3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会・総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 中村麻衣、梁 尚陽、永尾潤一、田中芳彦 |
| 2. 発表標題 プロバイオティクス投与による歯周病の抑制機構の解明 |
| 3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会・総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 根来(安松)香奈江、永尾潤一、城戸寛史、田中芳彦 |
| 2. 発表標題 自閉症発症メカニズムにおける母体IL-17Aの重要性について |
| 3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 石原和幸、今井健一、大島智子、落合智子、葛城啓彰、清浦有祐、高橋幸裕、田中芳彦、浜田信城 編集 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 学建書院 | 5. 総ページ数 423 |
| 3. 書名 口腔微生物学 - 感染と免疫 - 第7版 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>研究者HP http://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/teacher_info_tanaka 所属研究機関研究分野HP https://www.fdcnet.ac.jp/col/department_graduate_school/div_info/div_info_kinou#sec02</p> |
|--|

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 | 小笠原 康悦 (Ogasawara Kouetsu) (30323603) | 東北大学・加齢医学研究所・教授 (11301) | |
| 研究分担者 | 中山 二郎 (Nakayama Jiro) (40217930) | 九州大学・農学研究院・教授 (17102) | |
| 研究分担者 | 神沼 修 (Kaminuma Osamu) (80342921) | 広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401) | |
| 研究分担者 | 永尾 潤一 (Nagao Jun-ichi) (30509047) | 福岡歯科大学・口腔歯学部・講師 (37114) | |
| 研究分担者 | 岸川 咲吏 (Kishikawa Sari) (50781358) | 福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114) | |
| 研究分担者 | 有田 健一 (Arita-Morioka Ken-ichi) (90780205) | 福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114) | |
| 研究分担者 | 成田 由香 (Narita Yuka) (50758050) | 福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|