

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390555

研究課題名（和文） レギュラトリ細胞が歯周組織破壊に及ぼす影響－敵か味方か－

研究課題名（英文） The effects of regulatory cells on periodontal destruction

研究代表者

中島 貴子 (NAKAJIMA TAKAKO)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：40303143

研究成果の概要（和文）：

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* を慢性口腔感染させた歯周炎モデルマウスを用い、抑制性細胞 NKT 細胞の欠失あるいは活性化が歯周組織破壊に及ぼす影響とメカニズムを解析した。NKT 細胞欠損マウスでは歯槽骨吸収は抑制され、NKT 活性化マウスでは亢進した。NKT 細胞活性化マウスでは NKT 細胞によるサイトカイン産生は INF- γ よりも IL-4 産生優位であった。さらに血清中の *P. gingivalis* 特異抗体レベルならびに RANKL レベルの上昇を認めた。これらより、NKT 細胞は Th2 応答を誘導することにより歯槽骨吸収を促進させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

NKT cell function on periodontal destruction was analyzed using mouse periodontitis model which was chronically and orally infected with periodontopathic bacteria, *Porphyromonas gingivalis*. In CD1d^{-/-} mice alveolar bone resorption was inhibited. On the other hand, NKT cell-activated mice (stimulated with α -galactosylceramide) demonstrated higher level of alveolar bone resorption. In NKT cell-activated mice, NKT cells produced more IL-4 than IFN- γ . Furthermore, serum levels of *P. gingivalis* specific antibody and RANKL was upregulated. Those results suggest that NKT cells promote periodontal destruction through induction of Th2 response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学、レギュラトリ細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに歯周組織で自己免疫疾患や他の感染症と同様に負の免疫応答も

作動していることを明らかにしてきた。即ち、Tr 細胞 (Nakajima et al. J Dent Res 2005, Ito et al. Oral Microbiol Immunol 2005,

Okui et al. Oral Microbiol Immunol 2005) や NKT 細胞(Yamazaki et al. Am J Pathol 2001, Amanuma et al. J Periodont Res 2006)が歯肉炎よりも歯周炎の組織に高頻度に浸潤していること、両者は抑制性サイトカインの IL-10 や TGF- β を産生する、あるいは標的細胞に直接接触することにより抑制効果を発揮することから、制御性 T 細胞が病態形成に重要な働きをしていることが判明した。

NKT 細胞はタンパク抗原ではなく、CD1d を介して提示される脂質抗原を認識する。我々はヒト末梢血から NKT 細胞を分離し、既知の NKT 細胞特異的抗原 α ガラクトシルセラミド(α -GalCer)刺激により NKT 細胞ラインを確立し歯周病原細菌抗原により刺激をしたところ、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 刺激により IL-4 産生が認められるラインがあり、歯周病原細菌に NKT 細胞を刺激する脂質抗原の性質があることが示唆された。

一方、NKT 細胞と B 細胞の相互作用の可能性が報告されている(Galli et al. PNAS 2007)。我々も歯周組織での CD1d の主要な発現細胞が樹状細胞ではなく B 細胞である可能性を示した(Amanuma et al. 2006)。

Tr 細胞、NKT 細胞に加えて第 3 の抑制系細胞としてレギュラトリ B 細胞というサブセットの存在が最近示され、このサブセットが CD1d を強発現し T 細胞の関与によって発症する炎症性腸炎や実験的脳脊髄炎の発症進行を抑制していることが報告されている(Mizoguchi et al. Immunity 2002, Yanaba et al. Immunity 2008, Shimomura et al. J Clin Invest 2008)。慢性歯周炎の局所では B 細胞浸潤が優位であるがバースト時期を除けば組織破壊は極めて緩慢であることから、歯周局所でもレギュラトリ B 細胞が機能し

ている可能性が高いと考えられる。予備実験において歯周炎組織の B 細胞浸潤の優勢な部位から抑制性サイトカインの IL-10 と TGF- β の産生を検出した。さらにヒト末梢血 B 細胞を分離して歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* LPS で刺激をすると、IL-10、TGF- β の他に、炎症性サイトカインの IL-1 α 、IL-1 β を産生もみられた。以上のように制御性 T 細胞(Tr 細胞、NKT 細胞)のヒト歯周炎組織での存在は明らかだが機能と病態の関連解明は不十分であり、さらにレギュラトリ B 細胞についても注目すべきデータが集まりつつある。これらの解明のために遺伝的背景の同じ動物モデルでの解析が有用である。

我々が確立した歯周病原細菌 *P. gingivalis* 口腔感染マウスの系では歯槽骨吸収が認められ、歯周炎を想定した極めて有用かつ幅広い応用性を持つモデルである。このマウスモデルを使って歯周炎免疫応答を解析することで、今までヒトの研究で蓄積された抑制性細胞の歯周炎病態への関与についての研究が発展すると考えられる。

2. 研究の目的

P. gingivalis 慢性口腔感染歯周炎モデルマウスと腹腔感染モデルにおいて

(1)抑制性細胞サブセットの歯周炎組織への浸潤

(2)抑制性細胞サブセットと考えられる NKT 細胞の欠損または活性化が歯周組織破壊へ与える影響とそのメカニズム

(3)レギュラトリ B 細胞が NKT 細胞へ抗原提示する可能性を明らかにする。

また、ヒト歯周炎組織において

(4) B 細胞病変部の B 細胞、NKT 細胞機能にかかわる遺伝子発現を解析し、動物モデルで

の所見と合わせてヒト歯周炎の病態形成における B 細胞と NKT 細胞の関わりを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)口腔感染モデルの解析:6 週齢の C57BL/6 CD1d⁺マウス (NKT 細胞を欠損) と wild type マウスに *P. gingivalis* W83 株 1x10⁹ CFU を口腔より 3 日ごとに 10 回感染させる。NKT 細胞活性化群として wild type マウスに腹腔から α -GalCer 2 μ g を 1 週間に 1 回投与しつつ、*P. gingivalis* W83 口腔感染を 10 回行う。感染終了後に以下の解析を行う。

- 歯槽骨吸収を X 線マイクロ CT にて測定
- 川本法により未固定非脱灰凍結切片を作成し組織染色
- 歯周組織中の炎症性サイトカイン発現をリアルタイム PCR により解析
- 血清中の血清アミロイド A(SAA), RANKL を ELISA 測定
- 血清中 *P. gingivalis* 特異抗体を ELISA 測定
- 肝臓における IFN- γ , IL-4,IL-10 レベルをリアルタイム PCR により測定
- 脾細胞を *P. gingivalis* 抗原にて再刺激し IFN- γ , IL-4,IL-10 産生をリアルタイム PCR 測定

(2)腹腔感染モデルでの NKT 細胞のサイトカイン産生解析:6 週齢の C57BL/6 マウスに *P. gingivalis* W83 株 1x10⁸ CFU を 1 回または 3 日ごとに 3 回腹腔感染させ、感染終了後に、肝臓の NKT 細胞の IFN- γ , IL-4 産生をフローサイトメトリーにて解析する。

(3)ヒト歯周炎組織の解析

レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法にて B 細胞浸潤優勢領域の抑制性サ

イトカイン IL-10、TGF- β 発現を解析する。

4. 研究成果:

(1) マウス *P. gingivalis* 口腔感染モデル

以下の 6 群について解析を行った。

1. 正常マウス非感染群
2. 正常マウス *P.gingivalis* 感染群
3. CD1 d 欠損マウス非感染群
4. CD1 d 欠損マウス *P.gingivalis* 感染群
5. 正常マウス α -GalCer 投与 + 非感染群
6. 正常マウス α -GalCer 投与 + *P.gingivalis* 感染群

① 歯周組織の解析

正常マウス *P.gingivalis* 感染群では著大な歯槽骨吸収が認められるのに対して、CD1d 欠損マウス *P.gingivalis* 感染群では有意に軽度な骨吸収にとどまった。一方、正常マウス α -GalCer 投与 + *P.gingivalis* 感染群では正常マウス *P.gingivalis* 感染群に比較して有意に高度な歯槽骨吸収を認めた。

歯周組織の未固定非脱灰凍結切片の観察から、正常マウス、CD1d 欠損マウスともに非感染群に比較して *P.*

gingivalis 感染群では歯槽骨吸収を認めるものの炎症性細胞浸潤の程度は比較的軽度だった。

歯周組織の炎症性サイトカイン産生に関しては、正常マウス α -GalCer 投与 + *P.gingivalis* 感染群の歯肉組織では正常マウス *P.gingivalis* 感染群や非感染群に比較して炎症性サイトカインの産生増強は認められないものの、IL-17 については増加傾向を認めた。NKT 細

胞が活性化された状況下では骨吸収促進のサイトカインバランスが誘導されることが明らかとなった。

② 血清、肝臓の解析

正常マウス α -GalCer投与+

*P.gingivalis*感染群では血清中の炎症マーカーSAAが有意に上昇した。また破骨細胞分化誘導因子であるRANKLレベルが有意に上昇していた。

血清中の抗*P.gingivalis*抗体価は正常マウス*P.gingivalis*感染群に比較して、CD1d欠損マウス*P.gingivalis*感染群では総IgG、IgG2a、IgG2b、総IgMともに同程度の上昇を示した。一方、正常マウス α -GalCer投与+*P.gingivalis*感染群では総IgG量、IgG1、IgG2ともに有意な増加を認めた。

肝臓では正常マウス α -GalCer投与+*P.gingivalis*感染群のIFN- γ レベルが有意に上昇していた。IL-4レベルは α -GalCer投与に関係なく*P.gingivalis*感染により上昇しており、またCD1d欠損マウスでは著しく低下していた。

③ *P.gingivalis*再刺激時の脾細胞の応答

脾細胞を*P.gingivalis*抗原で再刺激したさいの抗*P.gingivalis*抗体産生はCD1d欠損マウス*P.gingivalis*感染群において正常マウス*P.gingivalis*感染群と同程度の上昇であった。サイトカイン産生については、IL-4、IL-6の産生は正常マウス*P.gingivalis*感染群と同程度であったが、IFN- γ の産生がCD1d欠損マウスでは著しく低下していた。

(2) マウス *P.gingivalis* 腹腔感染モデル

以下の4群について解析を行った。

1. 非感染群

2. α -GalCer 腹腔投与群

3. *P.gingivalis* 腹腔感染群

4. α -GalCer+ *P.gingivalis*腹腔感染群

1回感染後には α -GalCer腹腔投与群、*P.gingivalis*腹腔感染群、 α -GalCer+*P.gingivalis*腹腔感染群ともにIFN- γ 産生NKT細胞がIL-4産生NKT細胞の比率を上回った。一方複数回感染後には、*P.gingivalis*感染群、 α -GalCer+*P.gingivalis*腹腔感染群でIL-4産生NKT細胞の比率がIFN- γ 産生NKT細胞の比率と同等または上回った。

(3) ヒト歯周炎組織の解析

ヒト歯周炎組織のB細胞優勢エリアではIL-10ならびにTGF- β 発現が認められたが、NKT細胞との関係、他のサイトカインとのバランスについては今後さらに解析が必要である。

NKT細胞は感染に対して大量のIFN- γ とIL-4を早期に産生することが知られているが、抗原の種類や感染経路によってそのサイトカイン産生のパターンが異なる。今回のマウス*P.gingivalis*慢性口腔感染モデルでは、歯槽骨吸収について α -GalCer投与マウスとCD1d欠損マウスで正反対の結果となり、NKT細胞は歯槽骨吸収を抑制するのではなく促進する役割を果たしていることが明らかになった。歯槽骨吸収が促進した α -GalCer投与マウスでは*P.gingivalis*感染によるIFN- γ 産生への影響は少なかったが、IL-4産生、抗体産生に増加を認めたことからTh2応答優位を介しての骨吸収促進が示唆された。腹腔感染モデルから、*P.gingivalis*1回感染時にはNKT細胞はIFN- γ 産生優位であるが、慢性感染に

なるとIL-4産生優位になることが示された。これらより、レギュラトリー系細胞と考えられていたNKT細胞の歯周炎歯槽骨吸収への関わりはTh2応答誘導による促進であ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 11 件)

- 1) Nakajima T, Ito H, Yamazaki K (他 5 名). The effects of systemic sitafloxacin on periodontal infection control in elderly patients. Gerodontology. in press 2012. doi:10.1111/j.1741-2358.2011.00605.x
- 2) Miyashita H, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K (他 4 名). Relationship between serum antibody titres to *Porphyromonas gingivalis* and hs-CRP levels as inflammatory markers of periodontitis. Arch Oral Biol. 2012 in press
<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.11.008>
- 3) Miyauchi S, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K (他 3 名). Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR-ApoE(sh1) mice. J Periodontal Res. 47(3): 402-408; 2012. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01441.x.
- 4) Miyazawa H, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K (他 4 名). Increased serum PCSK9 concentrations are associated with periodontal infection but do not correlate with LDL cholesterol concentration.. Clin Chim Acta. 413(1-2): 154-159; 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.09.023>
- 5) Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K (他 6 名). Elevated antibody titers to *Porphyromonas gingivalis* as a possible predictor of ischemic vascular disease - results from the Tokamachi-Nakasato cohort study. J Atheroscler Thromb.18(9): 808-817; 2011. doi:10.5551/jat.6957
- 6) Maekawa T, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K (他 5 名). Chronic oral infection with *Porphyromonas gingivalis* accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. PLoS One. 6(5): e20240; 2011. doi:10.1371/journal.pone.0020240
- 7) Maekawa T, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K (他 1 名). Increased expression of C-reactive protein gene in inflamed gingival tissues could be derived from endothelial cells stimulated with interleukin-6. Arch Oral Biol. 56(11): 1312-1318; 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.04.010>
- 8) Takahashi N, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K (他 2 名). Interleukin-1 receptor-associated kinase-M in gingival epithelial cells attenuates the inflammatory response elicited by *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res. 45(4):512-519; 2010.
- 9) Nakajima T, Ito H, Tabeta K, Yamazaki K (他 6 名). Periodontitis associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. J Periodont Res. 45(1) : 116-122; 2010.
- 10) Nakajima T, Yamazaki K. Periodontal disease and risk of atherosclerotic coronary heart disease. Odontology 97(2) : 84-91; 2009.
- 11) Domon H, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K (他 3 名). Up-regulation of the endoplasmic reticulum stress-response in periodontal disease. Clin Chim Acta. 401: 134-140; 2009.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K (他 4 名). The effects of NKT cells on atherogenesis in *Porphyromonas gingivalis* infection model. 10th world congress on inflammation, 2011 年 6 月 28 日, パリ.
- 2) Aoki Y, Nakajima T, Yamazaki K. (他 4 名). The role of NKT cells in oral infection mouse model with *Porphyromonas gingivalis*. 14th International Congress of Immunology 2010 年 8 月 23 日, 神戸市.
- 3) 中島貴子 歯周炎の発症・進展における T 細胞免疫の関わり シンポジウム「歯周組織への感染とそれに対する免疫応答の特異性とは」. 第 53 回春季日本歯周病学会学術大会、2010 年 5 月 14 日、盛岡市.
- 4) 宮下博考, 伊藤晴江, 中島貴子, 多部田康一, 山崎和久(他 6 名). 歯周炎患者における *Porphyromonas gingivalis* に対する抗体価と高感度 CRP の関連性. 第 52 回日本歯周病学会秋季学術大会、2009 年 10 月 11 日、宮崎.
- 5) 中島貴子 心血管疾患患者の歯周病治療—踏まえておきたいエビデンス—シンポジウム「有病者・高齢者の口腔(歯周病)治療」. 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会、2009 年 5 月 15 日、岡山市.

[その他]

ホームページ等

http://www.dent.niigata-u.ac.jp/yamazaki_lab/

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 貴子 (NAKAJIMA TAKAKO)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：40303143

(2)研究分担者

山崎 和久 (YAMAZAKI KAZUHISA)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：00182478

多部田 康一(TABETA KOICHI)

新潟大学・超域学術院・准教授

研究者番号：20401763

伊藤 晴江(ITO HARUE)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30397145

(3)連携研究者

下野 正基 (SHIMONO MASAKI)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00085771