

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792108

研究課題名 (和文) *P. gingivalis*による DC-SIGN を介した Th1 応答のエスケープ機構研究課題名 (英文) *P. gingivalis* target DC-SIGN to escape Th1-type immune response.

研究代表者

多田 浩之 (TADA HIROYUKI)

東北大学・病院・医員

研究者番号：70431632

研究成果の概要 (和文)：

樹状細胞は自然免疫の誘導に関わるC型レクチンレセプターを発現し、細菌の排除に必要なTh1細胞の誘導が抑制され感染が慢性化することが示唆されている。歯周病原性細菌を含む、細菌を構成する成分であるiE-DAPは、細胞質に発現するレセプターであるNod1に認識され、自然免疫応答を発揮する。本研究では、Nod1を介した獲得免疫応答の誘導について、CD8⁺T細胞が細胞傷害性T細胞(CTL)に分化するために必要なクロスプライミング誘導について検討した。その結果、DCによるクロスプライミング誘導はNod1依存的に増強されることが明らかにされた。

研究成果の概要 (英文)：

Dendritic cells (DCs) express C-type lectin receptors (CLRs). Pathogenic bacteria subvert DC functions to escape immune surveillance by targeting the CLRs including DC-SIGN. In this study, we investigated the role played by Nod proteins in inducing the cross-priming of CD8⁺T cells, and we demonstrate that Nod ligands significantly enhance the induction of DC-mediated cross-priming.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：免疫学、樹状細胞、細胞・組織、サイトカイン、DC-SIGN

1. 研究開始当初の背景

病原性微生物に対する歯周組織を含む粘膜組織における生体防御機構は、自然免疫反応と獲得免疫反応によって担われる。抗原提示細胞である樹状細胞(DC)は、自然免疫レセプターToll-like receptor (TLR)を発現し、TLRを介して活性化したDCの抗原提示によりTh1細胞が誘導されることが病原性微生物の排除に重要である。それ故、

TLRリガンドを介したDCの効率的な活性化は、さまざまな感染症の予防や治療に有効なワクチンへの応用が模索されている。活性化DCにより誘導されるTh1細胞は、微生物に対する感染防御に必要な不可欠であるにもかかわらず、*Pg*の主要なビルレンス因子のひとつである*Pg* LPSに対するDCからのIFN-gammaおよびIL-12の生産はみられず、Th2細胞を誘導するサイトカインである

IL-10 が生産されることが明らかにされている。

TLR は病原性微生物を認識し自然免疫応答を發揮するのに対して、未熟 DC に発現している C 型レクチンレセプター (CLR) の第一の免疫学的意義は、自己抗原や常在性微生物抗原を MHC クラス II により CD4⁺T 細胞に提示し、免疫寛容を維持することである。しかしながら DC 上の CLR は、病原性因子の慢性感染のターゲットとなることが示唆されている。*Helicobacter pylori* や *Mycobacterium tuberculosis* 等の病原性微生物は、DC に特異的に発現する CLR の DC-SIGN に結合し、DC から IL-10 等の Th2 サイトカインの生産を引き起こすことで Th1 細胞の誘導を抑制する。その結果、これらの細菌が Th1 細胞による排除をエスケープするということが明らかにされている。中でも *M. tuberculosis* の細胞壁成分 ManLAM が DC-SIGN に結合すると、LPS により TLR4 を介した DC からの IL-10 生産が誘導されることが明らかにされている。歯周組織に局在する DC は DC-SIGN を含むさまざまな CLR を発現し、慢性成人性歯周炎患者の歯肉粘膜固有層では DC-SIGN の発現が上昇することが示され、歯肉粘膜固有層において活性化した DC の周囲に CD4⁺T 細胞の集積が観察されることから、DC と T 細胞との相互作用が推測される。しかしながら、歯周病の進展における DC-SIGN を含む CLR の役割については明らかにされていない。

2. 研究の目的

歯周病は主要な病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* による感染症であり、持続的な慢性炎症を特徴とする。30 歳以上の日本人成人の実に約 80% が罹患し、重症化すると歯の喪失に伴い quality of life (生活の質) の著しい低下を招く。歯周炎が慢性化する原因として、同菌が歯周組織の免疫反応による排除を逃れ歯周組織に生存し続けることがその一因と考えられているが、そのエスケープ機構は不明な部分が多い。

同菌は、菌体外線毛 (fimbriae) を介して上皮細胞に発現するインテグリンと結合し細胞内に侵入することが明らかにされており (*Periodontol.* 2000, 52: 84, 2010)、歯周炎における慢性感染の原因として注目されている。

樹状細胞 (DC) は、細胞内に侵入した細菌由来抗原をナイーブ CD8⁺T 細胞に提示し (クロスプレゼンテーション)、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導する (クロスプライミング) ことによって、細胞内寄生細菌を排除することが知られている。

最近、fimbriae は DC に発現する C 型レクチンレセプターである DC-specific intracellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) を介して認識され、Th1 および Th2 細胞の分化誘導が促進されることが見出された (*J. Immunol.*, 183: 5694, 2009)。しかしながら、*P. gingivalis* に対する DC を介したクロスプライミングが誘導されるか否かについては不明である。

本研究は、*P. gingivalis* による DC-SIGN を介したクロスプライミング誘導機構を解明することにより、同菌の細胞内感染の制御および抑制をターゲットとした新規歯周治療法開発の分子基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、マウス由来の DC および T 細胞を用いる。外来性抗原 (卵白アルブミン) の投与により、DC を介して誘導されるクロスプレゼンテーションおよびクロスプライミングに関する細菌由来成分の影響について、*in vitro* および *in vivo* 実験系により解析する。

(1) 使用細胞

DC は、C57BL/6 野生型マウスの脾臓、または GM-CSF にて 6 日間分化させた骨髄細胞を抗マウス CD11c 磁気ビーズ標識抗体を用いた磁気分離法 (MACS) により分離する。実験毎に、CD11c⁺細胞が 95% 以上の純度であることを確認した上で供試する。

(2) DC によるクロスプレゼンテーション誘導の測定

DC に卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) をモデル抗原として添加すると、クロスプレゼンテーション経路を経て OVA 由来ペプチドが MHC クラス I 上に提示される。本実験では、MHC クラス I-OVA 由来ペプチド複合体を認識する抗体 (クローン名、25D1.16) を用いて検出する。また、OVA 特異的 MHC クラス I 拘束性 T-cell receptor トランスジェニックマウス (OT-I マウス、Taconic) 由来 CD8⁺T 細胞および OVA 特異的 CD8⁺T 細胞株 (B3Z 細胞) (米国カリフォルニア大学、N. Shastri 博士より

分与)の増殖活性を、蛍光色素 CFSE を標識した T 細胞の分裂により測定する。

(3) DC のクロスプレゼンテーション関連遺伝子発現の測定

菌体成分を DC に刺激したときに誘導される細胞内のクロスプレゼンテーションに関わる遺伝子 (*Tap1*, *Sec61a*, *calnexin*, *calreticulin* および *cystatin C*) のメッセンジャーRNA 発現が増強される可能性について、リアルタイム RT-PCR 法にて検討する。

4. 研究成果

iE-DAP, FK565 (共に NOD1 リガンド) をプライミングし、ovalbumin (OVA) を投与後の野生型マウスの DC における MHC class I/OVA ペプチド複合体、CD40 および CD86 の発現は、プライミングしない DC と比較して亢進することを見出した。同 DC と OVA 特異的 T 細胞レセプターを発現する OT-I 細胞を共に培養した結果、FK565 をプライミングした DC はクロスプライミングが著明に増強することが明らかにされた。さらに、同クロスプライミング増強効果は、NOD1^{-/-}マウス由来の DC では完全に消失した (図 1)。

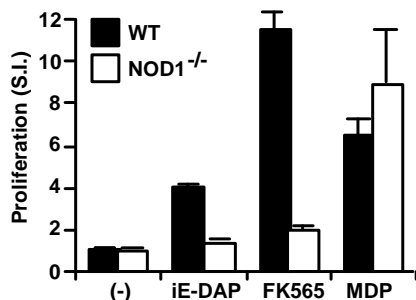


図1 iE-DAPおよび FK565による NOD1依存的なクロスプライミングの増強作用

同様に FK565 をプライミングした DC と OT-I 細胞を共培養したに OT-I 細胞から生産される IL-2 を測定した結果、FK565 を刺激した野生型マウス由来 DC では、OT-I 細胞からの IL-2 生産が増強されたのに対して、NOD1^{-/-}マウス由来 DC では同増強作用は完全に消失した。FK565 によるプライミング作用は、蛍光色素を標識した OT-I 細胞を移入する *in vivo* におけるクロスプライミング系でも同様にみられた。さらに iE-DAP 含有 FK 誘導体のプライミングにより、NOD1 依存的にクロスプライミング増強作用がみられた。

次に、NOD1 を介したクロスプライミングの増強作用を担うクロスプレゼンテーション関連遺伝子について、*Tap1*, *Sec61a*, *calnexin*, *calreticulin* および *cystatin C* mRNA 発現レベルについてリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。その結果、OVA を

単独にて刺激した DC に比べて、OVA と FK565 を共に刺激した DC では同クロスプレゼンテーション関連遺伝子の発現が著明に亢進された。

TLR4 のリガンドである LPS は DC を介した OVA のエンドサイトーシスを亢進させることにより、クロスプレゼンテーションが増強されることが明らかにされている (Science 305: 1153, 2004)。そこで、DC による FITC 標識 OVA のエンドサイトーシスを測定した結果、FK565 を刺激した DC における FITC-OVA のエンドサイトーシスは、無刺激の DC と同程度であった。

また、可溶性 OVA のエンドサイトーシスに必須のレセプターであるマンノースレセプターの発現を測定した結果、FK565 刺激による同レセプターの発現亢進はみられなかった。

生体内における細胞傷害性キラー T 細胞の細胞傷害活性について、標的細胞として OVA ペプチドを添加した脾細胞を用いて検討した結果、FK565 のプライミングにより NOD1 依存的に CTL 活性の著明な増強作用がみられた。また同細胞からの細胞内 IFN- γ 生産も亢進された。

FK565 のクロスプライミング増強作用による CTL 活性の亢進を生体内において確認するため、OVA を発現する腫瘍細胞を皮内注射後、FK565 と共に OVA を刺激した DC と OT-I 細胞をマウスに移入し、腫瘍の増殖による体積変化を経時的に観察した。その結果、FK565 と OVA を刺激した DC を移入したマウスは、OVA のみ刺激した DC に比べて、腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上の結果から、広範な細菌の細胞内感染に対して、NOD タンパク質は DC によるクロスプライミングの誘導を調節することにより抗原提示の増強を担うセンサーであることが明らかとなった。

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. Tada, H., Nemoto, E., Foster, B.L., Somerman, M.J., Shimauchi, H., "Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells."

Bone. 48: 印刷中, 2011. (査読有)

2. **Tada, H.**, Nemoto, E., Kanaya, S., Hamaji, N., Sato, H., Shimauchi, H., “Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells.”
Biochem. Biophys. Res. Commun. 394: 1093-1097, 2010. (査読有)

3. Asano, J., **Tada, H.**, Onai, N., Sato, T., Horie, Y., Fujimoto, Y., Fukase, K., Suzuki, A., Mak, T.W., Ohteki, T. “Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor signaling enhances dendritic cell-mediated cross-priming *in vivo*.”
J. Immunol. 184: 736-745, 2010. (査読有)

4. Hasegawa, M., Osaka, T., Tawaratsumida, K., Yamazaki, T., **Tada, H.**, Chen, G.Y., Tsuneda, S., Nunez, G., Inohara, N., “Transitions in oral and intestinal microflora composition and innate immune receptor-dependent stimulation during mouse development.”
Infect. Immun. 78: 639-650, 2010. (査読有)

[学会発表] (計2件)

1. **多田浩之**、根本英二、島内英俊
細胞外リン酸は Pit および ERK1/2 を介して
ヒト歯髄細胞から BMP-2 を誘導する
第 132 回日本歯科保存学会春季学術大会、平
成 22 年 6 月 4 日、熊本市 (ポスター発表)

2. **多田浩之**、根本英二、金谷聡介、島内英俊
細胞外リン酸によるヒト歯髄細胞からの
bone morphogenetic protein-2 発現誘導
第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会、平
成 21 年 10 月 30 日、仙台市 (口頭発表)

[その他]

日本歯科保存学会デンツプライ賞受賞
平成 22 年 10 月 28 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者
多田 浩之 (TADA HIROYUKI)
東北大学・病院・医員
研究者番号：21792108

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：