

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17014

研究課題名（和文）補体とTh17細胞のクロストークから導く歯周病態の解明と新規治療コンセプトの検討

研究課題名（英文）Periodontal pathology derived from crosstalk between complement and Th17 cells and novel treatment concepts

研究代表者

井手口 英隆（IDEGUCHI, Hidetaka）

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：80779421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、歯周炎組織において活性化した補体経路がどのようなメカニズムでTh17細胞の発生に影響を及ぼすか、その詳細を明らかにすることを目的とした。そして、歯周炎組織における補体経路の活性化からTh17細胞の発生に至る一連の免疫学的連鎖反応を解析した。その結果、歯周炎組織において活性化した補体分解産物であるC3は、歯肉上皮に得意的に結合することで、IL-6の分泌を促進し、歯周炎組織局所におけるTh17細胞の局在を増加させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、歯周病において補体がTh17細胞の分化に及ぼす直接的なメカニズムの一部が明らかになった。これまでに補体とTh17細胞のそれぞれ単独では、様々な学術的背景をもとに歯周病の病態における関与が十分に示されているものの、それぞれの相関について着目した研究はほとんどない。すなわち、本研究の成果は、補体経路を標的とした分子標的薬の歯周治療への臨床応用を円滑に実現する一助となる。さらに、歯周炎のみならず、様々な炎症性免疫疾患の病態を理解するための知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the details of the mechanism by which the activated complement pathway affects Th17 cell development in periodontitis tissues. Then, we analyzed a series of immunological chain reactions from the activation of the complement pathway to the development of Th17 cells in periodontitis tissue. The results showed that C3, an activated complement degradation product in periodontitis tissue, promotes IL-6 secretion and increases the localization of Th17 cells in the periodontitis tissue by binding to the gingival epithelium in a preferential manner.

研究分野：免疫学

キーワード：歯周炎 補体 Th17

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病原細菌の感染に起因する炎症性疾患であり、歯を支持する様々な組織が徐々に破壊されて最終的には歯の喪失へ繋がる。歯周炎の病態は複雑で、過剰な免疫応答による炎症性反応が疾患の重症化を担っている。米国では、多くの基礎的研究に基づいて、歯周炎症における初期の自然免疫系である補体経路を標的とした創薬研究が臨床治験まで進んでいる。

歯周炎組織において、活性化した補体経路は IL-17 の発現を増加させるが、その産生細胞である Th17 細胞の発生に補体経路が影響する詳細なメカニズムは明らかになっていない。歯周炎組織における Th17 細胞の局在は、歯周組織破壊に強い影響を及ぼすことから、補体と Th17 細胞の関連を明らかにすることは、非常に重要な研究課題である。

我々は、補体経路を標的とした分子標的薬の歯周病治療への臨床応用を円滑に実現するために、歯周組織における補体経路の活性化から Th17 細胞の発生に至る一連の免疫学的連鎖反応を詳細に解析することが重要であると考えて本研究計画を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、補体経路の活性から Th17 細胞の分化に至る免疫学的な流れを、歯周炎組織において詳細に解明することである。そのために、これまで蓄積されてきた基礎的研究の知見をもとに、補体分子が歯周組織に分布する様々な細胞種に作用することで、Th17 細胞の発生を促す環境 (IL-6 と IL-23 の局在) をどのように構築しているのかを検討する。

### 3. 研究の方法

絹糸結紮歯周炎マウスを用いて、歯周炎組織を様々な条件下で免疫学的に解析することで、補体と Th17 細胞の相関関係と、それぞれの依存度を検討する。

絹糸結紮歯周炎マウスは既報に準じて作製する (Abe T et al, *J Immunol*, 2015)。歯周炎に罹患させる期間は、我々の予備実験の結果から、IL-6 と IL-23 (Th17 細胞の分化因子) が最も強く発現する 3 日後と、IL-17 が最も強く発現する 7 日後に設定する。

#### 1. 細菌感染に起因した補体経路の活性と Th17 細胞の分化の確認

抗菌薬を含有した飲料水を摂取させた群を作製し、以下の解析を行う。

- ・結紮した絹糸を回収して、定量 RT-PCR 解析 (16s rRNA) によって細菌感染を調べる。
- ・骨標本を作製して、骨吸収の進行度を調べる。
- ・歯周炎組織 (口蓋歯肉) を採取して、ウエスタンブロット解析によって補体経路の活性 (補体分解産物; C3) と、フローサイトメトリー解析によって Th17 細胞 (CD45・CD4・IL-17 陽性細胞) の分化を調べる。

#### 2. 補体経路の活性に起因した IL-6 と IL-23 の産生細胞種の特定

2-1. 補体経路の分解産物である C3 の遺伝子欠損マウスを用いて、絹糸結紮歯周炎マウスを作製し、以下の解析を行う。

- ・骨標本を作製して、骨吸収の進行度を調べる。
- ・歯周炎組織を採取して、定量 RT-PCR 解析によって IL-6 と IL-23 の遺伝子発現を調べる。
- ・歯周炎組織の組織切片を作製して、in situ hybridization 解析とフローサイトメトリー解析 (核内染色) によって、IL-6 と IL-23 を産生する細胞種を特定する。

2-2. 上記で特定した細胞種を、野生型マウスの歯周組織からフローサイトメトリー法でソーティングして回収し、培養する。その後、C3 タンパク質の刺激下において、培養細胞から分泌される IL-6 と IL-23 を ELISA 法によって調べる。

2-3. 歯周炎組織（口蓋歯肉）を採取して、フローサイトメトリー解析によって Th17 細胞（CD45・CD4・IL-17 陽性細胞）の分化を調べる。

3. 歯周炎組織における IL-6 の分泌と Th17 細胞の分化の関連  
IL-6 の細胞特異的（実験 2 で特定した細胞種）遺伝子欠損マウスを用いて、絹糸結紮歯周炎マウスを作製し、以下の解析を行う。

- ・歯周炎組織（口蓋歯肉）を採取して、フローサイトメトリー解析によって Th17 細胞の分化を調べる。

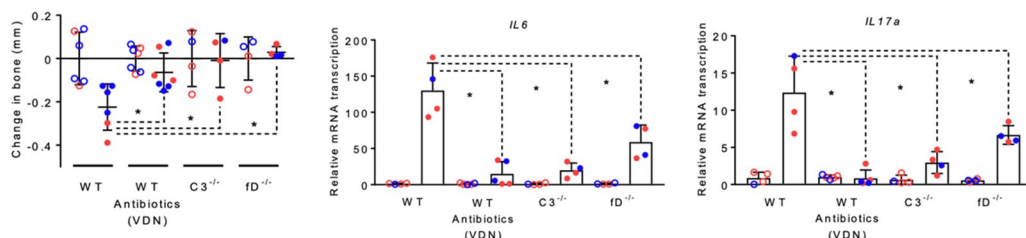
- ・組織切片を作製して、免疫染色法によって Th17 細胞の歯周炎組織での局在を調べる。

#### 4. 研究成果

本研究では、歯周病原細菌の感染に起因した補体経路の活性化と、その後の Th17 細胞の活性化に至る免疫学的なメカニズムを一連の流れとして検討した。

まず、歯周病原細菌の感染による補体経路の活性化を確認するために、歯周炎モデルマウスを作製した。歯周病原細菌の感染を排除するために、一方の群では抗菌薬を継続的に投与した。さらに、補体経路の活性による歯周炎の進行を確認するために、補体経路の分解産物である C3 の遺伝子欠損マウスに歯周炎を罹患させ、歯周組織の解析を行った。その結果、抗菌薬を服用した群と C3 の遺伝子欠損マウスでは、歯周炎組織における IL-6 と IL-17 の遺伝子発現が減少し、歯槽骨の吸収が抑制された（図 1）。

図1

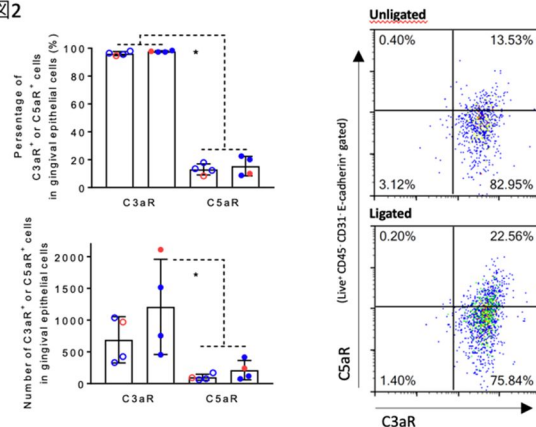


次に、歯周炎組織における IL-6 を主に分泌する細胞種を特定するために、歯周炎組織のフローサイトメトリー解析と in situ hybridization 解析を行った。その結果、歯周炎組織において C3 は歯肉上皮に特異的に作用して IL-6 の分泌を促進していることが明らかとなった（図 2）。

以上の研究結果から、歯周病原細菌の感染によって歯周炎に罹患した炎症組織では、活性化した補体経路の分解産物である C3

が歯肉上皮に直接的に作用することで、歯肉上皮細胞からの IL-6 の分泌を促進することが示された。さらに、歯肉上皮細胞が分泌する IL-6 は歯周炎組織における Th17 細胞の分化を促すことで、歯槽骨吸収の増悪につながっている可能性がある。

図2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Hui, Ideguchi Hidetaka, Kajikawa Tetsuhiro, Mastellos Dimitrios C., Lambris John D., Hajishengallis George	4. 巻 209
2. 論文標題 Complement Is Required for Microbe-Driven Induction of Th17 and Periodontitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1370 ~ 1378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2200338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------