

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20983

研究課題名（和文）自然リンパ球 ILC に着目した歯周炎重症化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of innate lymphoid cells in periodontitis

研究代表者

近藤 威（Kondo, Takeru）

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40964226

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：歯周炎を惹起させた野生型マウスの歯肉において、3型自然リンパ球（ILC3s）の数が著しく上昇し、ILC3集団は骨吸収を促進するIl17aを強く発現した。また、ILCノックアウトマウスにおいて歯槽骨の破骨細胞の数が減少し、歯槽骨吸収が抑制されたことから、ILC3sは破骨細胞を活性化し、歯槽骨吸収を促進する可能性が示唆された。シングルセルRNAシーケンス解析の結果、歯周炎惹起歯肉において特定の歯肉線維芽細胞集団が多くの潜在的な分子によってILC3sを制御する可能性が示された。以上の結果から、歯肉線維芽細胞によって活性化されたILC3sは、破骨細胞を介して歯槽骨吸収を引き起す可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ILCが発見されて以来、ヒト歯周炎患者の歯周組織におけるILCの存在を示した論文が最近発表されているものの、その病理学的役割を示した研究はまだまだ見当たらない。本研究では、口腔粘膜においてILC3sが破骨細胞を介して歯槽骨吸収を引き起し、歯周炎進行を促進する可能性を示した。このことから、ILC3sを歯周炎治療の新たな標的とすることで、新規歯周炎治療法開発に大きく貢献できると思われる。また、歯周組織における免疫細胞としてILCが注目されることで、抜歯窩治癒など様々な歯周組織の免疫機構解明の起爆剤となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In the gingiva of wild-type mice with periodontitis, the number of type 3 innate lymphocytes (ILC3s) increased, and the ILC3s strongly expressed Il17a, which promotes bone resorption. In addition, the number of osteoclasts in the alveolar bone decreased, and alveolar bone resorption was suppressed in ILC knockout mice. These results suggest that ILC3s would promote alveolar bone resorption through activation of osteoclasts. Single-cell RNA-sequencing analysis indicated that the specific gingival fibroblast population might regulate ILC3s through various potential molecules in periodontitis-induced gingiva. Taken together, this study demonstrated that ILC3s may activate by gingival fibroblasts induced alveolar bone resorption via osteoclasts.

研究分野：免疫学

キーワード：自然リンパ球 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

近年、クローン病や喘息などの免疫疾患において、T 細胞や B 細胞とは別の新たな細胞集団である、自然リンパ球 Innate lymphoid cell (ILC) が重要な役割を果たすことが報告され、粘膜組織の炎症反応において注目を集めている。歯周炎の進行における ILC の重要性はいまだ報告されていないが、我々はシングルセル RNA sequence 解析から、マウスにおける歯周炎確立期に ILC が出現し、他の免疫細胞を活性化する遺伝子を多く発現する知見を得ている。そこで我々は、ILC が口腔粘膜の慢性炎症疾患である歯周炎において重要な役割を果たし、歯周炎メカニズム解明の新たな鍵となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では野生型マウスに加え、ILC は存在するが T 細胞および B 細胞を欠損する *Rag2*^{-/-}マウスと ILC を含めた全てのリンパ球を欠損する *Il2rg*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスにおいて歯周炎を惹起させ、その進行の違いを評価することで ILC が歯周炎進行に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス歯周炎モデルにおける歯槽骨吸収の評価

C57BL/6J 野生型マウスの上顎第二臼歯に絹糸を結紮して歯周炎を惹起させ、結紮後 1, 4, 7 日目にマイクロ CT による三次元骨形態計測解析を行い、セメントエナメル境-歯槽骨頂の距離を測定し、歯槽骨の吸収量を評価した。

(2) マウス歯周炎モデルにおける ILC 集団の変化および遺伝子発現の評価

絹糸結紮前および絹糸結紮後 1, 4, 7 日目の野生型マウスそれぞれ 4 匹の上顎歯肉を採取し、0.1% Collagenase II および 0.25% Trypsin を用いてシングルセルを回収し、scRNA-seq 解析およびフローサイトメトリーによる解析を行った。ILC 集団の経時的な変化や遺伝子発現は Seurat (R パッケージ) を用いて評価した。また、細胞間相互作用を評価するために NicheNet 解析を行った。

(3) 歯周炎進行における T 細胞および ILC が骨吸収に与える影響の評価

Rag2^{-/-} (T 細胞欠損) マウスおよび *Il2rg*^{-/-}*Rag2*^{-/-} (T 細胞および ILC 欠損) マウスを用いて歯周炎を惹起させ、7 日後にマイクロ CT 解析にて歯槽骨吸収量を評価した。また、脱灰組織切片を作製して TRAP 染色を行い、破骨細胞の活性を評価した。

(4) マウス歯周炎モデルにおける細胞間相互作用の評価

scRNA-seq 解析のデータを用いて NicheNet 解析を行い、細胞間相互作用を評価した。

4. 研究成果

(1) 絹糸結紮マウス歯周炎モデル確立

マイクロ CT 解析の結果、マウス歯周炎モデルにおいて、絹糸結紮後 4 日目より骨吸収が

開始し、7 日目に顕著な骨吸収を認めた。このことから、上顎第二臼歯に絹糸を結紮することで歯周炎を惹起できることが明らかとなった。

(2) 歯周炎進行に伴う ILC3s の増加

フローサイトメトリーの結果、歯周炎を惹起させると野生型マウスの歯肉において、ILC3s の数が著しく上昇することを明らかにした。また、この ILC3 集団は骨吸収を促進する *Il17a* を強く発現したことから、この ILC3s が歯周炎進行における骨吸収に大きく関与する可能性が示された。

(3) ILC3s による歯槽骨吸収の促進

歯周炎進行における ILC3s の機能を調べる目的で、T 細胞を欠損した *Rag2*^{-/-} マウスおよび T 細胞および ILCs を欠損した *Il2rg*^{-/-} *Rag2*^{-/-} を用いて歯周炎を惹起させた。その結果、*Rag2*^{-/-} マウスと比較して *Il2rg*^{-/-} *Rag2*^{-/-} マウスにおいて歯槽骨の破骨細胞の数が有意に減少し、歯槽骨吸収が抑制された。このことから、マウス歯周炎モデルにおいて ILC3s は破骨細胞を活性化し、歯槽骨吸収を促進する可能性が示唆された。

(4) 特定歯肉線維芽細胞集団による ILC3s の活性化

シングルセル RNA シーケンス解析の結果、歯周炎惹起歯肉において複数の歯肉線維芽細胞集団を認めた。そのうちの一つの細胞集団が歯周炎の進行に伴い、他の免疫細胞遊走を促進するケモカイン *Cxcl* を強く発現したことから、この集団を fibroblasts added guiding phenotype (AG-fibroblasts) と名付けた。Nichenet 解析の結果、AG-fibroblasts が発現する多くの遺伝子が ILC3s の発現遺伝子の制御に関与していたことから、歯周炎進行過程において AG-fibroblasts が多くの潜在的な分子によって ILC3s を制御する可能性が示された。

以上の結果から、口腔粘膜において特定の歯肉線維芽細胞集団 AG-fibroblasts によって活性化された ILC3s は、破骨細胞の活性化を介して歯槽骨吸収を引き起す可能性が示された。今後、ILC3s を制御することで新たな歯周炎治療法の確立に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Kondo Takeru, Gleason Annie, Okawa Hiroko, Hokugo Akishige, Nishimura Ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Mouse gingival single-cell transcriptomic atlas identified a novel fibroblast subpopulation activated to guide oral barrier immunity in periodontitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP88183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.88183	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 -
1. 著者名 Kondo Takeru, Otake Koki, Kakinuma Hiroaki, Sato Yumi, Ambo Sara, Egusa Hiroshi	4. 巻 In press
2. 論文標題 Zinc- and fluoride-releasing bioactive glass as a novel bone substitute.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Kondo Takeru, Okawa Hiroko, Hokugo Akishige, Shokeen Bhumika, Sundberg Oskar, Zheng Yiyang, McKenna Charles E., Lux Renate, Nishimura Ichiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Oral microbial extracellular DNA initiates periodontitis through gingival degradation by fibroblast-derived cathepsin K in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 962 ~ 962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03896-7	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 -
1. 著者名 Kondo Takeru, Yamada Masahiro, Egusa Hiroshi	4. 巻 In press
2. 論文標題 Innate immune regulation in dental implant osseointegration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPR_D_23_00198	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 -

1. 著者名 Kondo Takeru, Kanayama Keiichi, Egusa Hiroshi, Nishimura Ichiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Current perspectives of residual ridge resorption: Pathological activation of oral barrier osteoclasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 12~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPR_D_21_00333	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 -

1. 著者名 Kondo Takeru, Kakinuma Hiroaki, Fujimura Kanna, Ambo Sara, Otake Koki, Sato Yumi, Egusa Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Incomplete Polymerization of Dual-Cured Resin Cement Due to Attenuated Light through Zirconia Induces Inflammatory Responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9861~9861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24129861	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 -

1. 著者名 Okawa Hiroko, Kondo Takeru, Hokugo Akishige, Cherian Philip, Campagna Jesus J, Lentini Nicholas A, Sung Eric C, Chiang Samantha, Lin Yi-Ling, Ebetino Frank H, John Varghese, Sun Shuting, McKenna Charles E, Nishimura Ichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanism of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) revealed by targeted removal of legacy bisphosphonate from jawbone using competing inert hydroxymethylene diphosphonate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP88183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.76207	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 -

1. 著者名 Kakinuma Hiroaki, Koyama Shigeto, Kondo Takeru, Harata Takayuki, Furukawa Hidemitsu, Egusa Hiroshi	4. 巻 131
2. 論文標題 In vitro evaluation of shape-memory hydrogels for removable dental prostheses and optimization of phase-transition temperature for intraoral use	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Prosthetic Dentistry	6. 最初と最後の頁 708.e1~708.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prosdent.2024.01.016	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 -

1. 著者名 Shokeen Bhumika, Pham Elaine, Esfandi Julia, Kondo Takeru, Okawa Hiroko, Nishimura Ichiro, Lux Renate	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Calcium Ion Supplementation on Oral Microbial Composition and Biofilm Formation In Vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1780 ~ 1780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10091780	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 -

1. 著者名 Akashi Yoshihiro, Nagasaki Atsuhiko, Okawa Hiroko, Matsumoto Takuya, Kondo Takeru, Yatani Hirofumi, Nishimura Ichiro, Egusa Hiroshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Cyclic pressure-induced cytokines from gingival fibroblasts stimulate osteoclast activity: Clinical implications for alveolar bone loss in denture wearers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 77 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPR_D_21_00238	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 近藤威, 江草宏
2. 発表標題 プラーク由来細胞外DNAに着目した歯周病リスク診断の新機軸
3. 学会等名 日本歯科医学会 第38回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤威, Ichiro Nishimura, 江草宏
2. 発表標題 口腔粘膜における特定歯肉線維芽細胞集団による免疫機構
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第132回学術大会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------