

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792472

研究課題名(和文)新しく確立されたT細胞サブセットT(FH)は歯周炎に与するか

研究課題名(英文)The role of Follicular helper T cell in Periodontitis regions

研究代表者

伊藤 晴江(ITO, HARUE)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30397145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎の進行や病態形成には宿主側の免疫応答が関与する。近年、慢性閉塞性肺疾患の病変部に浸潤しているT細胞とB細胞がリンパ濾胞を形成し、これが疾患の進行に関与する可能性がある事が報告されている。本研究ではこの異所性のリンパ濾胞の新生が歯周炎の進行に関与するのか検索を行った。歯周炎罹患組織を検索したところT-B相互作用が起きている事を示すOX40,OX40L mRNA分子が発現していることが認められた。また歯周病原細菌でPBMCの刺激を行ったところ、OX40,OX40L mRNAの発現上昇が認められた。これらの結果から歯周炎の病態形成にはT細胞とB細胞の相互作用が関与している事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The ultimate determinant of periodontal disease progression and clinical outcome is the host's immune response. It has been reported that T cells and B cells which infiltrate in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) lesions form lymphoid follicles and relate progression. In the present study, we investigate the relation between progression of periodontal disease and extranodal lymphoid neogenesis. OX40 and OX40L mRNA, which indicate that there is interaction of T-B cells, were detected in periodontal tissues. And both OX40 and OX40L mRNA expression were increased by porphyromonas gingivalis stimulation. These results suggested that there is T-B cell interaction and it promote periodontal destruction.

研究分野：歯周治療系歯学

科研費の分科・細目：歯周免疫機能学

キーワード：歯周炎 TFH OX40

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性歯周炎の原因は歯周病原菌による細菌感染である。しかしながら歯周組織破壊を伴う病態形成は歯周病変局所に浸潤している細胞の免疫応答によるものである事が知られている。近年、慢性閉塞性肺疾患などの慢性炎症の病変局所において炎症性の浸潤細胞 (T細胞、B細胞) の配置はリンパ組織と似通っており、いわゆる異所性のリンパ濾胞を形成している事が報告されている。また、慢性炎症のみならず関節リウマチの様な自己免疫疾患においてもその患部にしばしば異所性のリンパ濾胞を形成し、そこに浸潤しているB細胞は活性化、増殖して病態形成に関与する事が報告されている (Takemura et al., J Immunol. 2001)。異所性のリンパ濾胞の正確な役割は明確ではないが、急性炎症により浸潤したリンパ球を炎症組織局所に蓄積し、慢性の持続的炎症へ移行させる事に関与している可能性がある。このリンパ濾胞内においてB細胞の維持、活性化機構に重要な役割を果たすと報告されている細胞がfollicular helper T cell (T_{FH})である。 T_{FH} はこのようなリンパ濾胞内に認められ、B細胞の活性化に重要である事が報告されている。(Nicols et al., Immunity. 2009)。 T_{FH} はIL-17やIL-21のサイトカインを産生し、またCXCR5^{high}CCR7^{low}のフェノタイプを示している。我々はこれまでに歯周炎組織中にはIL-17を産生している細胞が存在していること (Ito et al., Oral Microbiol Immunol. 2005)、B細胞を最も強力かつ選択的に誘因する走化性因子であり、局所的なB細胞、T細胞の活性化及び炎症の維持に重要な役割を果たすCXCL13が歯周炎組織中に発現していること、さらにはCXCL13の受容体であり、特定のT細胞及びマクロファージの移動促進へ関与するCXCR5が歯周炎組織中に発現していること、リンパ濾胞内に存在する follicular dendritic cell が歯周炎組織中に存在していること (Nakajima, Ito., et al., J Periodont Res. 2008) を報告してきた。また、歯周炎罹患患者において細菌と哺乳動物で極めて相同性の高い分子量60kDaの熱ショックタンパク (Hsp60) に対する体液性応答を検索した結果、細菌由来よりはむしろ自己Hsp60に対する抗体が上昇していること (Tabeta et al., Clin Exp Immunol. 2000)、自己Hsp60で活性化されたT細胞はIFN- γ を産生して単球・マクロファージ系の細胞による炎症性サイトカイン産生を上昇させ、歯周組織破壊に関与している可能性があることを我々はこれまでに示してきた。(Yamazaki, Ito et al., Infect Immun. 2002)。これらの結果より慢性の炎症性疾患であると併に自己免疫疾患様の側面をもつ歯周炎においてもその進行に異所性のリンパ濾胞形成とそれに伴う免疫応答が関与していることが考えられた。

2. 研究の目的

これまでの報告から慢性炎症性歯周炎における歯周組織破壊は歯周組織に浸潤している細胞の免疫応答により引き起こされる事が知られてきている。歯周炎罹患組織中には数多くのB細胞とともにT細胞が浸潤している事が認められている。T細胞とB細胞の間での相互作用に関与する T_{FH} は歯周炎の病態形成にも関与している可能性が高い。本研究では T_{FH} が歯周炎の病態形成に関与するかその可能性について探る。

3. 研究の方法

- (1) 歯周炎組織中における T細胞、B細胞の局在の確認。またT細胞とB細胞の間に相互作用が起きているかその関連を示す分子の局在を解析。

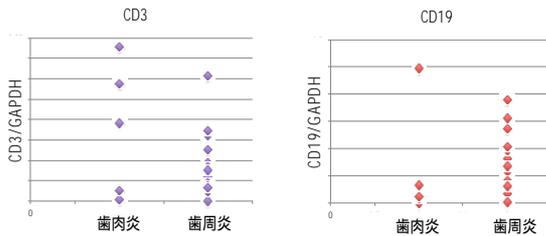
インフォームドコンセントを得た上で歯周炎患者より歯周外科手術時あるいは抜歯時に切除した歯周炎罹患組織を採取する。又、その他の患者より歯周炎以外の理由による抜歯時に臨床的歯肉炎あるいは臨床的健康歯肉を採取する。得られた組織からRNAを抽出し、逆転写酵素を用いて相補的なDNA (cDNA) を作成する。作成されたcDNA中にT細胞マーカーのCD3分子とB細胞マーカーのCD19分子の遺伝子が認められるかPCR法にて検索を行う。また、同様にT細胞とB細胞の相互作用を示す分子の存在についても検索を行う。

- (2) 歯周病原細菌による刺激後の T_{FH} 関連遺伝子発現の検索

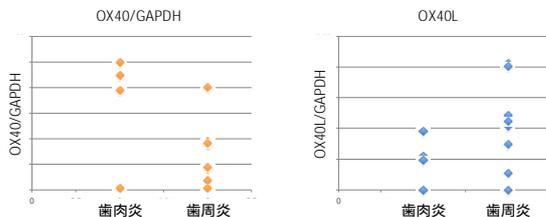
ヒト末梢血から比重遠心法にて単核球の分離を行う。分離された細胞を歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) を用いて刺激培養を行う。培養された細胞から(1)同様の方法によりcDNAを作成する。作成されたcDNA中に T_{FH} 関連遺伝子が認められるかPCR法にて検索を行う。

4. 研究成果

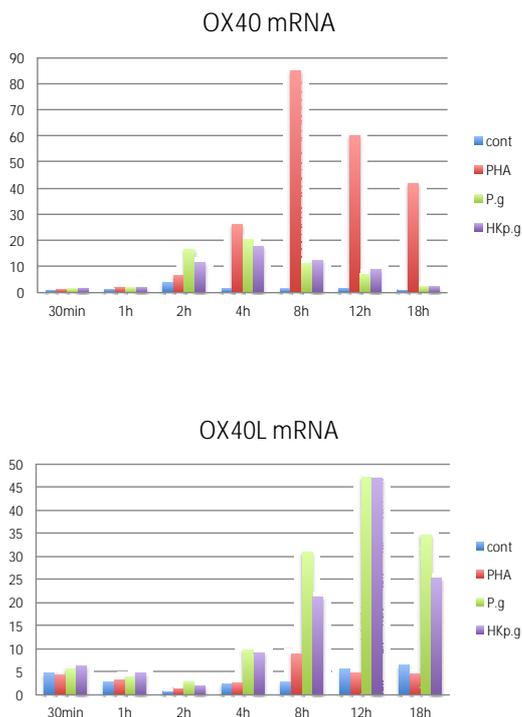
- (1) 歯周炎罹患組織及びそれ以外の歯周組織中においてT細胞、B細胞の局在を確認した。



- (2) 歯周炎罹患組織及びそれ以外の歯周組織中においてT細胞、B細胞が相互作用している可能性を示すOX40及びOX40L分子の発現が確認された。



- (3) ヒト末梢血単核細胞を歯周病原細菌にて刺激培養した所、T細胞とB細胞の相互作用を示す分子の発現の増加が認められた。



OX40は活性化したT細胞上に発現し、またこのOX40に対するリガンド(OX40L)はB細胞上に発現する事が報告されている。OX40-OX40LシグナルはT細胞の増殖、生存、分化を促進し免疫応答を亢進させ、炎症性疾患及び自己免疫疾患に関与する事が報告されている。これら分子が歯周炎罹患組織中に発現している事、また歯周病原細菌の刺激によりこれら分子の発現の上昇を認めた事から歯周炎の病態形成にT細胞とB細胞の相互作用が関与している可能性がある事が示唆された。

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2件)

Okui T, Aoki Y, Ito H, Honda T, Yamazaki K: The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. J Dent Res. 2012 Jun; 91(6): 574-9. (査読有り)

Nakajima T, Okui T, Miyauchi S, Honda T, Shimada Y, Ito H, Akazawa K, Yamazaki K: Effects of systemic sitafloxacin on periodontal infection control in elderly patients. Gerodontology. 2012 Jun; 29(2): e1024-32. (査読有り)

[学会発表](計6件)

中島貴子, 奥井隆文, 伊藤晴江, 中島麻由佳, 多部田康一, 山崎和久: 歯周ポケットから臨床分離株に対する抗菌薬の有効性, 耐性の検討. 日本歯科保存学会 2013年度秋季学術大会(第139回), 秋田市, 2013年10月17日

杉田典子, 中曽根直弘, 花井悠貴, 高橋昌之, 伊藤晴江, 両角俊哉, 久保田健彦, 奥田一博, 吉江弘正: 歯周炎患者における塩酸クロルヘキシジンおよびCPC配合洗口液の抗菌作用. 第56回秋季日本歯周病学会学術大会, 前橋市, 2013年9月22日

中島貴子, 伊藤晴江, 奥井隆文, 中島麻由佳, 宮下博考, 多部田康一, 山崎和久: 歯周病安定期治療中の活動性歯周ポケットに対する経口抗菌療法の細菌学的効果(第2報). 第56回秋季日本歯周病学会学術大会, 前橋市, 2013年9月22日

中島貴子, 奥井隆文, 伊藤晴江, 多部田康一, 山崎和久: 歯周病安定期治療中の活動性歯周ポケットに対する2種類の経口抗菌療法の細菌学的効果. 第55回秋期日本歯周病学会学術大会, つく

ば市，2012年9月23日

宮沢春菜，本田朋之，宮内小百合，青木由香莉，宮下博考，高橋直紀，前川知樹，奥井隆文，土門久哲，伊藤晴江，中島貴子，多部田康一，山崎和久：歯周炎疾患がPCSK9および脂質プロファイルに及ぼす影響．第54回秋季日本歯周病学会学術大会，下関市，2011年9月24日

奥井隆文，青木由香莉，伊藤晴江，本田朋之，山崎和久：歯周炎病変部におけるIL-17⁺FOXP3⁺T細胞の関与．第54回春季日本歯周病学会学術大会，福岡市，2011年5月27日

6．研究組織

(1)研究代表者

伊藤 晴江 (ITO HARUE)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：30397145

(2)研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3)連携研究者

無し ()

研究者番号：