

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861820

研究課題名(和文) T細胞を基盤とした歯槽骨吸収および歯周ポケット形成の発症メカニズム解明

研究課題名(英文) elucidation of the onset mechanism of alveolar bone resorption and attachment loss based on T cells

研究代表者

高森 明子(藏本明子)(TAKAMORI, Akiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：30631478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞が歯槽骨吸収に促進的に関与することは広く知られているが、免疫複合体存在下での歯周炎への関与については明らかになっていない。本研究では成熟T細胞が欠損しているヌードラットを我々がこれまでに確立した実験的歯周炎モデルに用いることで、歯周ポケット形成と歯槽骨吸収へのT細胞の関与を検討した。その結果、当初我々が想定していたヌードラットの骨吸収の抑制は生じず、逆に、歯周組織破壊は、野生型ラットと比較してヌードラットで有意に進行していた。

研究成果の概要(英文)：It is widely known that T cells are promotively involved in alveolar bone resorption, but involvement in periodontitis in the presence of immune complexes has not been elucidated. In this study, we investigated the involvement of T cells in periodontal pocket formation and alveolar bone resorption by using nude rats deficient in mature T cells with our experimental periodontitis model which we have established. As a result, against expectations, inhibition of bone resorption of nude rats was not occurred. On the contrary, periodontal tissue destruction was significantly progressed in nude rats as compared with wild type rats.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織破壊 T細胞 免疫複合体

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎患者の特徴の一つである歯槽骨吸収は破骨細胞により生じる。この破骨細胞形成には receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) が重要な役割を果たす (Udagawa *et al.* *Bone* 1999)。RANKL のレセプターである RANK は破骨細胞前駆細胞や成熟破骨細胞表面に存在し、破骨細胞前駆細胞の RANK は骨芽細胞上に発現する RANKL を介した細胞間接触により活性化する (Hofbauer *et al.* *J Bone Miner Res* 2000)。細菌やグラム陰性細菌の構成要素である lipopolysaccharide (LPS) は T 細胞の RANKL 発現を誘導し、破骨細胞形成を誘導する (Jiang *et al.* *Infect Immun* 2002)。また、炎症性サイトカインの一つである TNF- $\alpha$  は LPS 誘導性骨吸収に関与しており (Abu-Amer *et al.* *J Clin Invest* 1997)、活性化した T 細胞では TNF- $\alpha$  産生が促進する (Cenci S *et al.* *J Clin Invest* 2000) など、T 細胞は骨吸収に重要である。当講座ではこれまでに、LPS と免疫系活性化による歯槽骨吸収への影響を調べる一連の実験を行っている。SCID マウスを使用した実験では、T 細胞を移入した後にマウス歯肉へ *Escherichia coli* (*E. coli*) LPS を注入すると骨吸収が生じたことから、T 細胞は B 細胞非存在下でも炎症性骨吸収を誘導することを報告した (Yamaguchi *et al.* *J Periodontal Res* 2008)。さらに、LPS で免疫感作したマウスの脾臓から T 細胞を分離、あるいは感作を行っていないマウスから T 細胞を分離し、それぞれ LPS とともに SCID マウスの上顎歯肉へ頻回投与した。その結果、LPS 感作したマウスより分離した T 細胞を投与した SCID マウスでは、非感作マウスより分離した T 細胞を投与した SCID マウスと比較して歯槽骨吸収が増加していた。非感作マウスより分離した T 細胞を投与した SCID マウスでは、T 細胞を移入していない SCID マウスと

同程度の歯槽骨吸収しか生じていなかった。この結果から、局所に存在する T 細胞が歯槽骨吸収を促進し、抗原による免疫感作も重要であることが示唆された (Ozaki *et al.* *Bone* 2009)。

事実、歯周炎患者では歯周病原性細菌に対する血清抗体価が上昇していること (Taubman *et al.* *J Periodontal Res* 1992) が報告されている。そこで我々はこれまで、免疫感作による特異抗体レベルの上昇が歯周炎の発症および進行に関与していると考え、以下の実験を行ってきた。ラットの腹腔に LPS を投与して免疫系を活性化した感作ラットを作製、感作ラットの心血を採取して血清を分離、IgG を精製し、これを抗 LPS IgG 抗体とした。そして LPS と抗 LPS IgG をラット歯肉溝へ交互に滴下し、右図のように歯肉溝で免疫複合体を形成させると、両実験群で明確な歯周ポケットを形成した。このことから、局所での免疫複合体形成が歯周ポケット形成に関与することを報告した (Kuramoto *et al.* *J Periodontal Res* 2012)。本来歯肉溝へ滲出する IgG は内因性のものであり血清に由来することから、我々は前述の結果をより詳細に検討するため、LPS で感作したラット歯肉溝へ高濃度 LPS を滴下して同様の現象が起こることを確認し、ラット歯周炎モデルを確立した (Yoshinaga *et al.* *J Periodontal Res* 2012)。このモデルでは免疫感作したラットで 10 日目に明確な歯周ポケットが認められると同時に、抗 LPS 血清 IgG 抗体レベルも上昇しており、歯周炎の発症には特異的抗体レベルの上昇が関与することが示唆された。さらに、20 日目には歯槽骨吸収も認められた。

## 2. 研究の目的

免疫複合体形成に重要な特異抗体産生には B 細胞が関与しているが、我々のモデルで生じた歯周ポケット形成と歯槽骨吸収に T 細胞が関連しているかについては不明であり、

この点を明らかにすることは歯周炎発症メカニズムの解明に重要である。したがって本研究では前述の知見を基に、成熟 T 細胞が欠損しているヌードラットを我々がこれまでに確立した実験的歯周炎モデルに用いることで、歯周ポケット形成と歯槽骨吸収への T 細胞の関与を検討した。

### 3. 研究の方法

#### 実験動物

本実験は長崎大学先導生命科学研究支援センター・動物実験施設の実験指針に従い承認を得た後に行われた。実験には 9 週齢の雄性の F344NJcl ラット、F344NJcl-rnu/rnu ラットを使用し SPF 環境下で飼育した。

#### 実験デザイン

F344NJcl ラット(W)、F344NJcl-rnu/rnu ラット(Nu)各 10 匹を LPS で感作を行った感作群、感作を行わなかった非感作群の 4 群に分けた(IW 群、nIW 群、INu 群、nINu 群)。感作群のラットは 0.5 mg/kg の *E. coli* LPS (O111: B4; Sigma, St Louis, MO, USA) を PBS で希釈したものと Freund's complete adjuvant の懸濁液を腹腔内に投与し、その 28 日後にブースターとして PBS で希釈した LPS と Freund's incomplete adjuvant の懸濁液を腹腔内投与した。非感作群は PBS と Freund's complete adjuvant を腹腔内に注入し、その 28 日後に PBS と Freund's incomplete adjuvant の懸濁液を腹腔内に注入した。ブースターの 1 日後に当講座の過去の報告同様に *E. coli* LPS 滴下を行った(Yoshinaga et al. J Periodontal Res 2012)。イソフルラン全身麻酔下にて PBS で希釈した LPS (50 $\mu$ g/ $\mu$ L)をマイクロシリンジにて上顎右側第一臼歯口蓋側歯肉溝に滴下し、左側はコントロール側として PBS のみを滴下した。5 分毎に 3 $\mu$ L ずつ 7 回滴下を行い 1 クールとし、これを 24 時間ごとに 20 回繰り返した。20 日間滴下後の 1 時間後に安楽死させた。

#### ELISA

血液サンプルを眼窩下静脈より、滴下開始直前、滴下 5 日、10 日、20 日の時点で採取し、過去の報告と同様に血清抗 LPS 抗体レベルを ELISA 法にて測定した。

#### 切片作製

安楽死後、上顎骨を摘出し 4%パラホルムアルデヒド溶液にて 4 時間で 10 時間固定後、10%EDTA 溶液にて 3 週間脱灰し、AMeX 法にてパラフィン包埋した。各ブロックから上顎第一臼歯頬口蓋断面にて、頬側根・口蓋側根が同時に認められる角度で 4 $\mu$ m 間隔の連続切片を作製した。

#### 染色

作製した連続切片は 10 枚間隔でヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。

破骨細胞同定のため、10 枚間隔で酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)染色を行った。

免疫複合体検出のために、抗 C1q 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。即ち脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止のため、3% $H_2O_2$ /メタノール溶液に 30 分間浸漬した。次にヤギ正常血清に 30 分間反応させ、非特異的結合を阻害した。一次抗体として、ウサギ抗 C1q 抗体(AVIVA Systems Biology, USA)を 4 時間で一晚反応させた。一次抗体反応後、PBS で洗浄し、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体(Dako, Denmark)を滴下し、室温で 30 分間反応させた。切片を PBS で洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジン(Dako)に室温で 30 分間反応させた。再度 PBS で洗浄後、DAB 溶液で発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。

抗原である LPS 検出のために、抗 LPS 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。即ち脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活

性の阻止のため、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノール溶液に30分間浸漬した。次にヤギ正常血清に30分間反応させ、非特異的結合を阻害した。一次抗体として、マウス抗 E.coli LPS 抗体 (AVIVA Systems Biology, USA) を4℃で一晩反応させた。一次抗体反応後、PBS で洗浄し、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗マウス抗体 (Wako, Japan) を滴下し、室温で30分間反応させた。切片を PBS で洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジン (Dako) に室温で30分間反応させた。再度 PBS で洗浄後、DAB 溶液で発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。

## 測定

HE 染色切片を用いて、セメントエナメル境 (CEJ) から接合上皮 (JE) 歯根面付着部歯冠側端までをアタッチメントロスとして計測した。CEJ から歯槽骨頂部までの距離を歯槽骨レベルとして計測した。また、接合上皮周囲の結合組織内の4つの単位領域内の炎症性細胞数を計測し単位面積当たりの炎症性細胞数を測定した。TRAP 染色切片を用いて、骨頂部から 500 $\mu$ m の距離の骨面に接した TRAP 陽性細胞数を計測した。

## 統計分析

全ての統計分析は StatMate (ATMS Co. Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。血清抗体レベルの比較では Mann-Whitney Test を行い、有意水準を  $P < 0.001$  で検討した。アタッチメントロス、炎症性細胞数、歯槽骨レベル、TRAP 陽性細胞数については Kruskal-Wallis Tukey Type Test を行い、有意水準を  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$  で検討した。

## 4. 研究成果

### 血清中抗 LPS IgG 抗体レベル

血清中抗 LPS IgG 抗体レベルは感作群で滴下開始5日の時点で滴下前と比較して有意に

上昇した一方で、非感作群では5日目の時点では有意差は見られなかった。感作群の抗体レベルは滴下20日まで維持されていた。非感作群では、滴下開始から20日までに徐々に上昇し、nIW 群で滴下前と比較して有意に上昇したが IW 群と比較して低いレベルであった。

## 病理組織学的所見

コントロール側では4群とも接合上皮の根尖側端は CEJ 付近に位置しておりアタッチメントロスは観察されなかった。接合上皮内及び接合上皮結合組織中には炎症性細胞浸潤はほとんど見られず、歯槽骨表面には TRAP 陽性の破骨細胞は観察されなかった。LPS 滴下側では非感作群で軽度のアタッチメントロスが観察され、接合上皮内及び接合上皮結合組織には軽度の炎症性細胞浸潤がみられ、歯槽骨表面に TRAP 陽性の破骨細胞の発現が観察された。一方で、感作群ではより強いアタッチメントロスと炎症性細胞浸潤、歯槽骨表面に多数の TRAP 陽性の破骨細胞の発現が観察された。

## 組織形態学的所見

### アタッチメントロス

アタッチメントロスは LPS 滴下側でのみ認められ、W ラットでは非感作群と比較して感作群で有意に増加していた。Nu ラットでも同様に非感作群と比較して感作群で有意なアタッチメントロスの増加が観察された。感作群では IW 群 INu 群に有意差は見られず、非感作群では nIW 群と nINU 群に有意差は見られなかった。

### 炎症性細胞数

炎症性細胞数は全ての群で、コントロール側と比較して LPS 滴下側で有意な増加を認めた。W ラット、Nu ラットは共に非感作群と比較して感作群で有意な炎症性細胞数の増加が観察された。非感作群では nINu 群と

比較して nIW 群で有意な炎症性細胞の増加を認めた一方で、感作群間の比較では IW 群と比較して INu 群で有意な炎症性細胞の増加が観察された。

### 歯槽骨レベル

歯槽骨レベルは、全ての群でコントロール側と比較して LPS 滴下側で有意に低下していた。非感作群では nINu 群と比較して nIW 群で有意な歯槽骨レベルの低下が認められた一方で、感作群で歯槽骨レベルは IW 群と比較して INu 群で有意に低下していた。

### 破骨細胞数

破骨細胞はコントロール側では観察されず、LPS 滴下側でのみ観察され、IN 群で最も多く観察された。非感作群では nINu 群と比較して nIW 群で有意な破骨細胞数の増加を認められたが、感作群では INu 群と IW 群で有意差は見られなかった。

### C1qB、LPS の免疫組織科学的所見

C1qB、LPS 共にコントロール側では発現が認められず、LPS 滴下側でのみ観察され、発現部位は C1qB と LPS で変化はなく同じ範囲に限局していた。nIW 群、nINu 群では C1qB・LPS は接合上皮および接合上皮直下結合組織に発現がみられ、IW 群、INu 群では接合上皮から結合組織、歯槽骨上までの大きな範囲で発現が認められた。

上述の結果を基に、現在論文を執筆中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)泉 聡史, 吉永 泰周, 中村 弘隆, 高森 明子, 高森 雄三, 山下 恭徳, 小林 弘樹, 小山 美香, 鷓飼 孝, 原 宜興、ラット歯周組織破壊における免疫複合体形成及びT細胞の関与についての病理組織学

的検討、第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会、2016 年 10 月 06 日~2016 年 10 月 08 日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

高森 明子 (TAKAMORI, Akiko)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号 : 30631478

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし

#### (4) 研究協力者

なし