

学位研究紹介

Porphyromonas gingivalis 抗原刺激に対する T 細胞の IL-17, RANKL 発現
T cell expression of IL-17 and RANKL by *Porphyromonas gingivalis* antigen in vitro

新潟大学大学院医歯学総合研究科
摂食環境制御学講座
歯周診断・再建学分野
小田太郎

Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental
Sciences
Taro Oda

【目 的】

T 細胞は免疫応答の制御において中心的な役割を担う細胞である。これまでのサイトカインプロファイルについての研究から歯周炎病変部の T 細胞が細胞性・体液性免疫応答に関与している事が示されてきたが、歯周組織破壊における T 細胞の直接的な関与については未だ明らかにされていない。近年、T 細胞が関与する組織破壊機構が明らかにされつつあり、その中で IL-17 (IL-17A) と receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) が注目されている。IL-17 は活性化 T 細胞 (CD4⁺CD45RO⁺ T cell) が特異的に産生するサイトカインであり、慢性炎症状態 (リウマチ関節炎) における結合組織破壊や骨吸収に関与していることが報告されている。一方、RANKL は in vitro において CSF-1 存在下で破骨細胞前駆細胞の分化を誘導し、成熟破骨細胞を活性化して骨吸収を引き起こす。また、IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α , PGE₂ といった炎症性メディエーターによってその発現が上昇することが報告されており、これら 2 つの因子が歯周炎の病態形成に深く関与する可能性が考えられた。そこで我々は IL-17 と RANKL の歯周組織における発現と、歯周病原細菌刺激に対する発現動態について検討した。

【方 法】

インフォームドコンセントにより同意の得られた成人性歯周炎患者 19 名 (歯周炎群: 平均年齢 52.8 \pm 11.7 歳,

平均 probing depth (PD) 6.6 \pm 2.3 mm, 平均 attachment level (LA) 7.5 \pm 2.4 mm, 平均骨吸収度 52.9 \pm 24%) と臨床的健常者 12 名 (歯肉炎群: 平均年齢 28.8 \pm 5.3 歳, 平均 PD 3 mm 以下, 平均 LA 3 mm 以下) を被検者とした。病変部よりポケット上皮を含む歯周組織を採取し、また同患者の末梢血より比重遠心法にて単核細胞 (PBMC) を分離した。それぞれの全 RNA を AGPC 法により抽出し、IL-17, RANKL 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。2% アガロースゲル電気泳動, Ethidium-Bromide 染色後 UV 下で検出した。NIH image software を用いて数値化し、T 細胞レセプター鎖定常域遺伝子 (C₁) の PCR 産物との比で、IL-17 と RANKL の mRNA の発現について検索した。

また、同様に成人性歯周炎患者 19 名と臨床的健常者 12 名の PBMC を 24 穴プレートに 2 \times 10⁶ 個 /ml/well の濃度で播種し、*Porphyromonas gingivalis* outer membrane protein (*P.g* OMP) (2.0 μ g/ml) で刺激し、6 日間培養後、全 RNA を抽出した。以下同様に RT-PCR を行い、UV 下で検出した。培養上清を回収し、IL-17 産生量を ELISA 法にて測定した。さらに、歯周炎患者 5 名に関して、*P.g* OMP 刺激後の T 細胞における RANKL の発現を flow cytometry にて検討した。

統計解析は歯周炎群と歯肉炎群との群間比較を Mann-Whitney の U 検定、刺激群と未刺激群との比較を paired t-test を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

【結 果】

歯肉炎、歯周炎と組織学的に異なる組織中のどちらにおいても高頻度に IL-17 mRNA 発現を認め、RANKL mRNA 発現は IL-17 mRNA 発現と比較して強さも頻度も少なかった (図 1 (a), (b))。

また、in vitro にて歯肉炎、歯周炎患者の PBMC を *P.g* OMP にて刺激すると、IL-17 は病態にかかわらず mRNA レベル (図 2 (a)), タンパクレベル (図 3) で増加した。しかし、RANKL の発現は遺伝子レベルでわずかに上昇傾向がみられたものの (図 2 (b)), flow cytometry におけるタンパクレベルでは明らかな上昇は認められなかった (図 4 (a), (b))。

【考 察】

本研究において、歯周病原細菌により IL-17 が誘導

され、歯周組織中においても IL-17 が強く検出されたことから、IL-17 が歯周炎の病態形成に関与していることが考えられた。我々はすでに歯肉炎、歯周炎病変歯肉中に浸潤している T 細胞の大部分が CD4⁺ CD45RO⁺ memory T 細胞であることを報告している。しかしながら、歯肉炎組織よりも歯周炎病変組織に浸潤している T 細胞数の方が多いため、組織中の IL-17 レベルは歯周炎の方が歯肉炎よりも高いことが考えられる。変わりに歯肉炎の病態では IL-17 の作用を調節する何らかの因子が存在する可能性が示唆された。

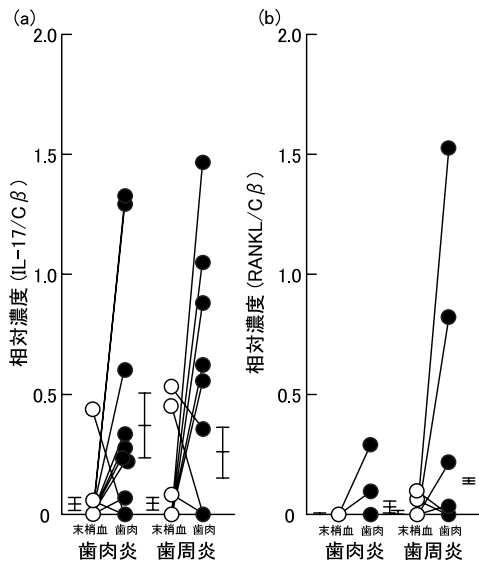


図1 末梢血、歯周組織における IL-17 (a), RANKL (b) mRNA 発現の検索。直線をつないだ が本研究における対象者を示す。mRNA 発現が認められなかった対象は一つの で示している。歯肉炎患者群と歯周炎患者群との間に統計学的有意差は認められなかった。

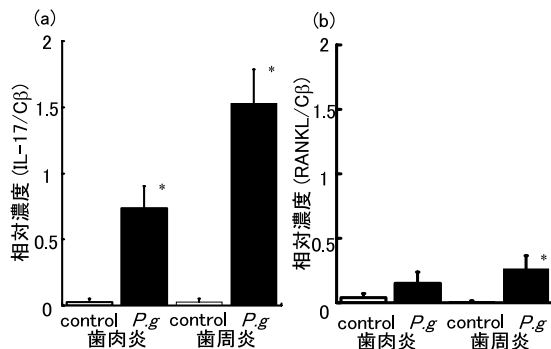


図2 歯周病原細菌刺激による末梢血単核球の IL-17 (a), RANKL (b) mRNA 発現の検索。末梢血単核球を *P.g* OMP (2 μg/ml) で刺激し 6 日間培養した。mRNA 発現は数値化し、T 細胞レセプター 鎖定常域遺伝子(C)との比で検討した。* : 刺激により統計学的有意に mRNA 発現の上昇を認めた。歯肉炎患者群と歯周炎患者群との間に統計学的有意差は認められなかった。

一方、*P.g* OMP による RANKL の発現は IL-17 と比較して強さ、頻度ともに弱く、慢性歯周炎の病態形成において T 細胞上に発現する RANKL が作用する可能性は低いことが示唆された。これまでに早期発症型歯周炎患者の T 細胞上の RANKL 発現が *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a*) によって誘導され病態形成に関与することが動物実験で報告されているが、今回の結果で *P.g* では細胞上に RANKL 発現が確認されなかった点が興味深い。

現在我々は歯周炎組織中より T 細胞をクローニングし、そのサイトカインプロファイルを検討している(投稿中)。今後も T 細胞と歯周炎の病態形成との関わりについてさらに検討していく必要がある。

Oda T, Yoshie H, Yamazaki K: *Porphyromonas gingivalis* antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-κB ligand *in vitro*. Oral Microbiol Immunol, 18: 30-36, 2003.

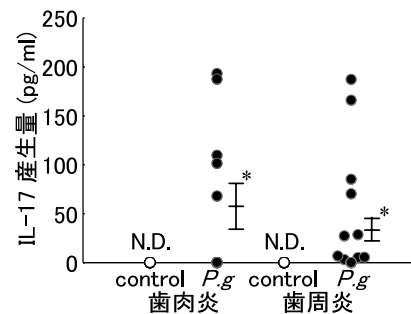


図3 歯周病原細菌刺激による末梢血単核球の IL-17 産生の検索。末梢血単核球を *P.g* OMP (2 μg/ml) で刺激し 6 日間培養した。培養上清中の IL-17 産生量を ELISA 法にて測定した。検出限界以下の対象は一つの で示す。* : 刺激により統計学的有意に IL-17 産生の上昇を認めた。歯肉炎患者群と歯周炎患者群との間に統計学的有意差は認められなかった。

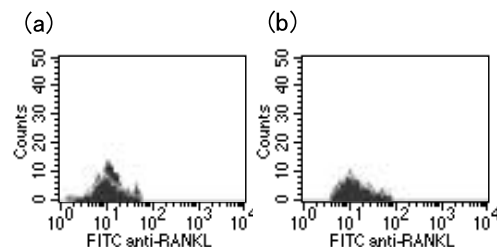


図4 歯周病原細菌刺激による CD4 陽性 T 細胞 (a), CD8 陽性 T 細胞 (b) における RANKL 発現の検討。末梢血単核球を *P.g* OMP (2 μg/ml) で刺激後 6 日間培養し、flow cytometry 解析した。線はアイソタイプコントロールを示す。T 細胞上に RANKL の明らかな発現は認められなかった。