

氏 名	福原 大樹
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5951号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Impact of commensal flora on periodontal immune response to lipopolysaccharide (リポポリサッカライドに対する歯周免疫応答への常在菌の影響)
論文審査委員	大原 直也 教授      高柴 正悟 教授      稲葉 裕明 准教授

### 学位論文内容の要旨

#### 論文内容の要旨 (2000字程度)

##### 〈緒言〉

常在菌は適正な免疫応答に必要不可欠である。腸内常在菌は、腸管内の獲得免疫の機能調整に影響をおよぼすことが知られている。口腔常在菌は、継続的に歯周組織局所の免疫応答を誘発するだけでなく、腸管内に定着することによって、T細胞の過剰な活性化を引き起こすことが報告されている。しかし、常在菌の存在が、リポポリサッカライド (LPS) を代表とする歯周病原因因子に対する免疫応答にどのような影響を与えているのかは不明である。本研究の目的は、無菌マウス (germ-free, GFマウス) と常在菌を保有する specific-pathogen-free マウス (SPFマウス) における歯肉へのLPS塗布後の免疫応答の違いを評価することである。

##### 〈方法〉

8週齢のGFならびにSPFマウスを、ベースライン群 (4匹) および3種類の実験群 (各6匹) に分けた。実験群には *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) を口蓋側歯肉溝に 5 $\mu$ l 塗布し、LPS 塗布の3時間後、24時間後、そして72時間後の3群に分けた。屠殺時に、腹腔大静脈から採血および歯周組織の採取を行った。血液からリンパ球を単離し、CD4<sup>+</sup>T細胞と CD8<sup>+</sup>T細胞の発現をフローサイトメトリーで評価した。歯周組織をパラフィン包埋して薄切標本を作製し、好中球、CD4<sup>+</sup>T細胞、そしてCD8<sup>+</sup>T細胞を特異的抗体で免疫染色して、それらの数を計測した。また、歯肉組織から RNA を抽出して逆転写後にリアルタイム PCR で、chemokine (C-X-C motif) receptor 1 (*Cxcl1*), *Cxcl2*, tumor necrosis factor- $\alpha$  (*Tnf- $\alpha$* ), interleukin-17A (*Il-17A*), *Il-10*, forkhead box protein p3 (*Foxp3*) の mRNA 発現量を定量した。統計分析には、Mann-Whitney U 検定、二元配置分散分析、そして Bonferroni 法を用い、有意水準を 5%とした。

##### 〈結果〉

SPFマウスでは、ベースラインと比較し、LPS塗布3時間後で歯肉組織中のCD4<sup>+</sup>T細胞数が有意に増加し

ていた。また、ベースラインおよびLPS塗布3時間後において、GFマウスよりも、SPFマウスのCD4<sup>+</sup>T細胞数が有意に高かった。一方、GFマウスのCD4<sup>+</sup>T細胞数には経時的に有意な変化はなかった。ベースライン時およびLPS塗布後におけるCD8<sup>+</sup>T細胞数には、GFマウスとSPFマウスとともに、有意な変化はなかった。好中球数はGFマウスとSPFマウスとともにLPS塗布24時間後にピークを迎えた。SPFマウスの好中球数はすべての計測時点でGFマウスより有意に高い値を示した。

血液分析の結果、ベースライン時において、GFマウスよりも、SPFマウスの血液中のCD4<sup>+</sup>T細胞数は有意に高い値を示した。また、SPFマウスでは、ベースライン時に対してLPS塗布3時間後のCD4<sup>+</sup>T細胞数が有意に減少した。

GFマウスとSPFマウスとともに、歯肉組織における*Cxcl1*と*Cxcl2*mRNA発現量はLPS塗布3時間後にピークを迎えた。一方、*Tnf-α*と*Foxp3*mRNA発現量は、GFマウスよりもSPFマウスの方が有意に増加した。

#### 〈考察〉

SPFマウスでは、ベースライン時と比較して、LPS塗布3時間後で歯周組織中のCD4<sup>+</sup>T細胞数が有意に増加した。また、LPS塗布3時間後において、SPFマウスにおける歯周組織中の*Tnf-α*と*Foxp3*のmRNA発現量はGFマウスよりも有意に増加した。これらの結果から、LPS塗布はSPFマウスにおいて免疫応答を誘発したことを見た。一方で、GFマウスでは歯周組織中のCD4<sup>+</sup>T細胞数には変化がなかった。SPFマウスにおける常在菌が歯周組織におけるLPSに対する免疫応答を誘導したと考えられる。また、歯周組織とは対照的に、LPS塗布3時間後のSPFマウスにおける末梢血中CD4<sup>+</sup>T細胞数はベースライン時よりも有意に減少した。SPFマウスにおいて、末梢血中のCD4<sup>+</sup>T細胞は歯周組織へ移行した可能性が示唆される。

CD4<sup>+</sup>T細胞は獲得免疫応答の中心的役割を担う。特に、*Foxp3*を発現するCD4<sup>+</sup>T細胞は、制御性T細胞(Treg細胞)として知られており、過剰な免疫応答の抑制や自己反応性T細胞の制御に機能し、腸管炎症の抑制に重要な役割を果たす。また、SPFマウスにおいて、*Bifidobacterium*属や*Lactobacillus*属はTreg細胞の発現誘導に関与し、*Bacteroides fragilis*はTreg細胞の分化やIL-10の産生を促進することが報告されている。さらに、GFマウスと比較し、Treg細胞はSPFマウスの腸管粘膜固有層に豊富に存在する。そのため、SPFマウスは、GFマウスと比較して、異物に対する免疫応答が適切に制御されている可能性が考えられる。本実験においても、歯周組織へのLPS刺激に対して、SPFマウスにおけるTreg細胞を中心とするCD4<sup>+</sup>T細胞の発現が誘導され、免疫応答が抑制的に制御された可能性が推測される。

GFマウスとSPFマウスとともに、LPS塗布3時間後に、歯周組織中の*Cxcl1*と*Cxcl2*mRNA発現量がピークとなり、LPS塗布24時間後に歯周組織への好中球浸潤が誘発された。一方で、SPFマウスの好中球数はすべての計測時点でGFマウスより有意に高い値を示した。したがって、歯周組織に常在している好中球数はSPFマウスの方が多いが、LPS刺激に対する好中球の走化性は常在菌の有無に影響を受けない可能性がある。

本実験において、末梢血中のCD4<sup>+</sup>T細胞を含むリンパ球数をフローサイトメトリーで定量した。一方、歯周組織においては免疫染色によってCD4<sup>+</sup>T細胞数を計測したため、厳密な定量的評価は行っていない。また、末梢血および歯周組織とともに、Treg細胞といったCD4<sup>+</sup>T細胞亜群の特定を行っていない。GFマウスならびにSPFマウスの歯周組織での免疫応答の相違

を明確にするため、今後はこれらの追跡調査が必要と考えられる。

#### 〈結論〉

常在菌を保有する SPF マウスでは GF マウスに比較して、歯周組織への LPS 刺激に対して早期に *Tnf- $\alpha$*  と *Foxp3* 遺伝子発現量や CD4<sup>+</sup>T 細胞数が増加した。これらのことから、常在菌の存在は免疫応答を促進的に制御していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

常在菌は全身に存在し、適正な免疫応答に必要不可欠である。腸内の常在菌は、腸管内での獲得免疫の機能調整に影響をおよぼすことが知られている。口腔内の常在菌は、継続的に歯周組織局所の免疫応答を誘発するだけでなく、異所性に腸管内に定着することによって、Th1細胞の過剰な活性化を引き起こすことが報告されている。しかし、常在菌の存在が、リポポリサッカライド (LPS) を代表とする歯周病原因因子に対する免疫応答にどのような影響を与えていているのかは不明である。本研究では、無菌マウス (germ-free, GFマウス) と全身に常在菌を保有する specific-pathogen-free マウス (SPFマウス) における歯肉への LPS 塗布後の免疫応答の違いを評価することを目的としている。

8週齢の GF ならびに SPF マウスを、ベースライン群 (4匹) と 3種類の実験群 (各6匹) に分けた。実験群には *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (10 µg/µl) を口蓋側歯肉溝に 5 µl 塗布し、LPS 塗布の 3時間後評価、24時間後評価、そして 72 時間後評価の 3群に分けた。屠殺時に、下大静脈から採血するとともに、歯周組織を採取した。血液からリンパ球を単離し、CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD8<sup>+</sup>T 細胞の発現をフローサイトメトリーで評価した。歯周組織の薄切標本を作製し、好中球、CD4<sup>+</sup>T 細胞、および CD8<sup>+</sup>T 細胞を免疫染色し、それらの数を計測した。また、歯肉組織から total RNA を抽出し、リアルタイム PCR で、*chemokine (C-X-C motif) receptor 1 (Cxcl1)*, *Cxcl2*, *tumor necrosis factor- $\alpha$  (Tnf- $\alpha$ )*, *interleukin-17A (Il-17A)*, *Il-10*, および *forkhead box protein p3 (Foxp3)* の mRNA 発現量を定量した。

歯肉組織中において、SPF マウスでは、ベースラインと比較して、LPS 塗布 3 時間後の CD4<sup>+</sup>T 細胞数が有意に増加していた。一方、GF マウスでは変化がなかった。また、CD8<sup>+</sup>T 細胞数は両マウス共に変化がなかった。好中球数は、GF マウスと SPF マウスとともに、LPS 塗布 24 時間後にピークに達した。SPF の好中球数は、すべての計測時点で、GF マウスよりも有意に多かった。次に血液中の免疫細胞数を検討した結果、ベースラインでは、CD4<sup>+</sup>T 細胞数は GF マウスよりも SPF マウスで有意に多く観察された。SPF マウスでは LPS 塗布 3 時間後の CD4<sup>+</sup>T 細胞数が有意に減少した。しかし、GF マウスにおいて変化はなかった。また、CD8<sup>+</sup>T 細胞数には両マウス共に LPS 塗布による変化はなく、両マウス間でも同等であった。さらに歯肉組織中の mRNA 量を検討したところ、GF マウスと SPF マウスとともに、*Cxcl1* と *Cxcl2* mRNA 発現量は LPS 塗布 3 時間後にピークに達した。また、*Tnf- $\alpha$*  と *Foxp3* mRNA の発現量は、LPS 塗布 3 時間後の SPF マウスで顕著に増加していた。

CD4<sup>+</sup>T 細胞は免疫応答の中心的役割を担う。特に、*Foxp3* の発現を特徴とする制御性 T 細胞 (Treg 細胞) は、過剰な免疫応答の抑制や自己反応性 T 細胞の制御に機能する。そのため、SPF マウスでは、LPS 刺激によって Treg 細胞が誘導され、免疫応答が適切に制御されている可能性が考えられる。

本論文は、歯周組織への LPS 刺激に対して、常在菌の存在が CD4<sup>+</sup>T 細胞と *Foxp3* mRNA の発現を誘導することを示し、常在菌の存在によって免疫応答が適切に制御されているという新たな可能性を示したものである。本研究の結果は口腔内の免疫機構と常在菌に関する今後の研究に重要な情報を提供するものとして重要性がある。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。