

博士論文

骨破壊性 T 細胞による口腔細菌感染制御

塚崎 雅之

題目: 骨破壊性 T 細胞による口腔細菌感染制御

所属: 東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻

指導教員名: 高柳 広

申請者名: 塚崎 雅之

要旨: 脊椎動物の最外層には上皮バリアが存在し、病原体の侵入を物理的に防いでいる。口腔では、歯が粘膜を貫通し植立しており、歯周粘膜は上皮連続性が破綻した脆弱なバリア部位として知られる。歯周炎に伴い口腔細菌は血流へと侵入し、様々な全身疾患に影響を及ぼすと考えられているが、口腔細菌に対する生体防御機構は不明な点が多い。私は、歯周炎に伴い特殊な T 細胞が歯周粘膜に集積し、抗菌免疫と歯の支持骨吸収を誘導することで、口腔細菌感染を制御することを見出した。本研究で得られた知見は、歯周炎の病態理解に繋がるのみならず、これまで他の炎症性骨疾患で悪玉とされてきた骨破壊性 T 細胞の、生体防御における役割を提唱するものである。

目次

第一章 序文

1-1. 骨免疫学の進展と炎症性骨破壊のメカニズム	・・・6
1-2. 生体バリア部位における宿主細菌相互作用	・・・14
1-3. 歯周粘膜バリアの特殊性	・・・16
1-4. 口腔—全身連関の医学史	・・・19
1-5. 歯周炎のメカニズム	・・・22
1-6. 研究目的	・・・25

第二章 方法

2-1. 実験試薬／器具	・・・26
2-2. 実験動物	・・・26
2-3. マウス歯周炎モデル	・・・27
2-4. マイクロCT解析法	・・・30
2-5. 組織学的解析法	・・・30
2-5-1. パラフィン切片作製法	・・・30
2-5-2. パラフィン切片染色法	・・・30
2-5-3. <i>In situ</i> hybridization	・・・33
2-6. 歯周組織調整法	・・・34
2-7. 細胞調整法	・・・34
2-7-1. 歯周組織からの細胞調整法	・・・34

2-7-2. リンパ節及び脾臓からの細胞調整法	・・・35
2-8. 遺伝子発現解析法	・・・35
2-9. フローサイトメトリー法	・・・38
2-10. Th17 細胞及び exFoxp3Th17 細胞の in vitro 誘導法	・・・41
2-11. 細菌学的解析	・・・42
2-11-1. 肝臓及び脾臓からの細菌検出法	・・・42
2-11-2. 細菌 DNA 抽出法	・・・43
2-11-3. 細菌量の評価法	・・・43
2-11-4. 16s rRNA の網羅的シーケンス	・・・43
2-11-5. 16s rRNA の網羅的解析	・・・44
2-12. 図中の画像データの表示	・・・44
2-13. 統計解析法	・・・44

第三章 結果

3-1. 炎症性骨破壊による感染菌の排除は口腔細菌の遠隔臓器への波及を防ぐ	・・・46
3-2. Th17 細胞は口腔細菌依存的に歯周炎組織に集積する	・・・51
3-3. Th17 細胞は口腔細菌の排除と骨破壊の両方に寄与する	・・・56
3-4. 歯周炎組織では Foxp3 陽性 T 細胞が exFoxp3Th17 細胞へ分化転換する	・・・59
3-5. 骨芽細胞と歯根膜細胞が産生する膜型 RANKL が歯槽骨吸収に必要なものである	・・・61
3-6. exFoxp3Th17 細胞は抗菌免疫と骨破壊を誘導し口腔細菌感染を制御する	・・・66

第四章 考察	
4.1. 歯周炎における炎症性骨破壊のメカニズム	・・・71
4.2. 炎症性骨破壊の意義	・・・71
4.3. 今後の展望	・・・75
第五章 結論	・・・77
引用文献	・・・78
謝辞	・・・92

第一章 序文

1-1. 骨免疫学の進展と炎症性骨破壊のメカニズム

骨は生体の支持や臓器の保護、運動に必須の構造であると同時に、体液のカルシウム濃度調節や造血の場としての機能を持ち、陸棲脊椎動物の生命現象を維持する上で必須の役割を果たしている¹。骨組織の恒常性は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスが保たれることで維持されている。免疫系の過剰な活性化は骨形成を阻害、骨吸収を促進することで骨恒常性を破綻させ、炎症性骨破壊を引き起こすことが知られており、関節リウマチや歯周病、癌の骨転移など、様々な疾患の病態形成において重要な役割を果たしている^{2,3,4} (図1)。

免疫系と骨代謝系の連関を示した最初の証拠は、1972年に遡る。Hortonらは、歯周病患者から採取したプラーク（口腔常在菌が歯牙表面に形成したバイオフィルム）で刺激したヒト末梢血白血球の培養液を、ラットの長管骨臓器培養系に添加すると、破骨細胞が増加して骨吸収が起こることを報告し、活性化した白血球が破骨細胞活性化因子を分泌することで、炎症性骨破壊を引き起こすことを提唱した⁵。Hortonらの実験系において想定された骨吸収促進因子(OAF: osteoclast activating factor)は、interleukine(IL)-1 β と同一分子であることが後に明らかとなった⁶。しかしながら、炎症性骨破壊の詳細なメカニズムに関しては、近年に至るまで不明であった。

1988年に、Takahashiらが破骨細胞を試験管内で効率よく誘導する手法として、骨芽細胞と脾臓細胞との共存培養系を確立し⁷、骨芽細胞が細胞膜上に破骨細胞分化因子(ODF: osteoclast differentiation factor)を発現することで、破骨細胞形成を制御するという

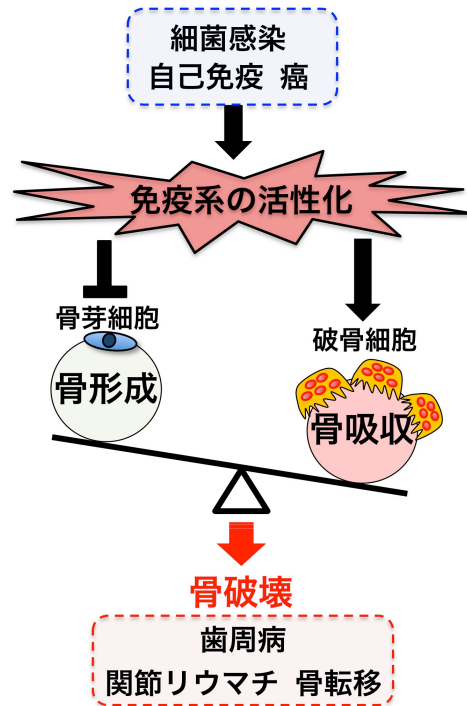


図1 炎症性骨破壊の概念図

細菌感染や癌、自己免疫応答に伴う過剰な免疫系の活性化は、破骨細胞による骨吸収を促進、骨芽細胞による骨形成を阻害し、歯周病や癌の骨転移、関節リウマチに伴う骨破壊を引き起こす。

「ODF 仮説」が提唱された。同グループは、雪印乳業と共に骨芽細胞株の cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、1998 年に、316 アミノ酸残基からなる膜型タンパク質 ODF をクローニングした⁸。この分子は、同時期に異なる複数のグループから OPGL(osteoprotegerin ligand)⁹、TRANCE(TNF-related activation-induced cytokine)¹⁰、そして T 細胞が発現する樹状細胞活性化因子 RANKL(receptor activation of nuclear factor-kB ligand)¹¹ としてクローニングされたタンパク質と同一であることが分かり、現在では RANKL としてその名称は統一されている。RANKL 及び受容体 RANK の遺伝子欠損マウスでは、破骨細胞の完全な欠損を伴う重篤な大理石骨病を呈する^{12,13,14}。ヒトにおいても同様に、RANKL 及び RANK 遺伝子に変異を持つ患者は大理石骨病を発症することが報告されており^{15,16}、RANKL-RANK 経路が破骨細胞分化において必須の役割を持つことが生体レベルで証明されている¹⁷。

生理的な破骨細胞分化における RANKL の重要性が明らかになると、病的な骨破壊における RANKL の役割についても注目が集まるようになった。代表的な炎症性骨疾患である関節リウマチでは、関節破壊病巣に多数の破骨細胞が観察され、増殖した滑膜線維芽細胞の他にも、T 細胞や B 細胞、マクロファージなど多くの免疫細胞が浸潤している^{2,3,4}。Takayanagi らは、関節リウマチ患者の滑膜から得られた細胞を培養すると破骨細胞が出現すること、滑膜に存在する細胞の中で破骨細胞分化を支持する細胞は滑膜線維芽細胞であること、さらにこの分化誘導は RANKL 依存的であることを報告した^{18,19}。その後、RANKL 欠損マウスや、破骨細胞を欠損したマウスでは実験的に関節炎を誘導しても骨破壊が認められないことが報告され^{20,21}、炎症性関節破壊の実行役は破骨細胞であり、また炎症下における病的な破骨細胞形成も、RANKL-RANK 経路に依存す

ることが示されている^{22,23,24}。

自己免疫疾患である関節リウマチにおいて、自己免疫応答の中核となる T 細胞が、どのように骨破壊を引き起こすのかは長年不明であった。RANKL は T 細胞上に発現する分子としてクローニングされた経緯もあり、Kong らは固定した T 細胞と破骨細胞前駆細胞を共培養すると T 細胞上の RANKL 依存的に破骨細胞が形成されることを報告し、活性化した T 細胞自身が RANKL を発現し、直接的に破骨細胞分化を促進することで骨破壊を誘導するという説を提唱した²⁵。これに対し Takayanagi らは、活性化した T 細胞を生きた状態で破骨細胞の分化培養系に添加した場合、T 細胞が産生する interferon(IFN)- γ の作用に依存して破骨細胞分化を強力に抑制することを報告し、正常な活性化 T 細胞の破骨細胞分化に対する負の制御機構を明らかにした²⁶。この Takayanagi らの報告は、Nature の news & views にて Choi らに「Osteoimmunology (骨免疫学)」という新しい学際領域を切り拓いた論文として紹介され、これを機に骨免疫学という学問体系が生まれ、進展していくこととなった。

骨免疫学という言葉が初めて使用された当時、CD4 陽性 T 細胞は IFN- γ を分泌し、細胞内寄生性細菌やウイルスの排除に寄与する Th1 細胞と、IL-4, IL-13 など分泌し、主に寄生虫に対する感染防御やアレルギーに関わる Th2 細胞の二種類に分類され、この Th1/Th2 パラダイムで免疫病態が説明されており²⁷、関節リウマチは Th1 型の疾患であると考えられていた。その後、IL-17 を産生し、細胞外細菌・真菌感染の防御や自己免疫炎症に関与する Th17 細胞^{28,29} と、Foxp3(forkhead box 3)をマスター転写因子に持ち、免疫抑制能を有する regulatory T (Treg)細胞^{30,31,32} が新たに CD4 陽性 T 細胞サブセットとして分類され、関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患の病態において Th17/

Treg バランスが重要であることが明らかとなり、免疫学分野において大きなパラダイムシフトが起きた。Sato らは、各 Th サブセットが破骨細胞分化へ及ぼす効果を個別に検討し、Th17 細胞が唯一、破骨細胞分化を正に制御する Th サブセットであることを報告した³³。Th17 細胞は IL-17 の産生を介して、骨芽細胞や滑膜線維芽細胞といった間葉系細胞上に RANKL の発現を誘導することで、破骨細胞形成を促進する^{33,34}。Th1, Th2 細胞はそれぞれ IFN- γ 、IL-4 を分泌することで破骨細胞分化を阻害し³³、Treg は IL-10 及び CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) を介して破骨細胞分化を強力に抑制することが報告されている^{35,36,37}。(図 2)

これら CD4 陽性 T 細胞サブセットは、ナイーブ T 細胞に由来し、それぞれが分化の最終段階であると考えられてきた³⁸。しかし近年、*in vivo* における細胞系譜解析の結果から、Th サブセットが異なる種類のサブセットへと分化転換することが生体レベルで示されてきており、CD4 陽性 T 細胞サブセットの分化可塑性は、多発性硬化症^{39,40}、⁴¹や糖尿病⁴²、喘息⁴³、がん⁴⁴、腸炎⁴⁰、感染症^{40,45}、関節炎⁴⁶など、様々な炎症性疾患の病態において重要な役割を担うことが示されている。Komatsu らは、本来炎症を抑制するはずの Foxp3 陽性 T 細胞が、関節炎環境下において Th17 細胞(exFoxp3Th17 細胞)へと分化転換し、関節リウマチの炎症及び骨破壊を増悪することを報告した⁴⁶。exFoxp3Th17 細胞は RANKL や IL-17 を高発現しており、滑膜線維芽細胞との共存培養系において従来のナイーブ T 細胞由来 Th17 細胞よりも高い破骨細胞分化誘導能を有した⁴⁶。細胞特異的 RANKL 欠損マウスの解析から、関節破壊における RANKL の主要な産生源は T 細胞ではなく滑膜線維芽細胞であることが明らかとなっており⁴⁷、Th17 細胞や exFoxp3Th17 細胞は主に IL-17 の産生を介して滑膜線維芽細胞上に RANKL 発現を誘

導することで、関節破壊に寄与すると考えられている³。(図3)

自己免疫疾患である関節リウマチにおいては病理学的に中心的な役割を果たす Th17 細胞だが、細胞外寄生性細菌や真菌に対する感染防御においても重要な役割を担うことが知られている。Th17 細胞が産生する IL-17 は、上皮細胞に Defensin などの抗菌ペプチド産生を誘導すると同時に、G-CSF や CXCL1 の誘導を介し好中球の活性化や遊走を促し、菌体排除に寄与することが示されている。^{48,49}

上述のように、骨免疫学という概念の確立は、骨代謝研究と免疫学研究の共進化をもたらし、炎症性骨破壊機構の理解を進め、関節リウマチ治療薬の開発やその作用機序の理解に大きく貢献してきた³。しかしながら、細胞内寄生性細菌やウイルスの排除に重要な Th1 細胞や、寄生虫の排除に重要な Th2 細胞によって誘導される炎症は骨破壊を抑制する一方で、なぜ細胞外寄生性細菌から生体を防御するために存在する Th17 型免疫応答のみが骨破壊を誘導する役割を有するのかに関しては、これまで議論されてこなかった。

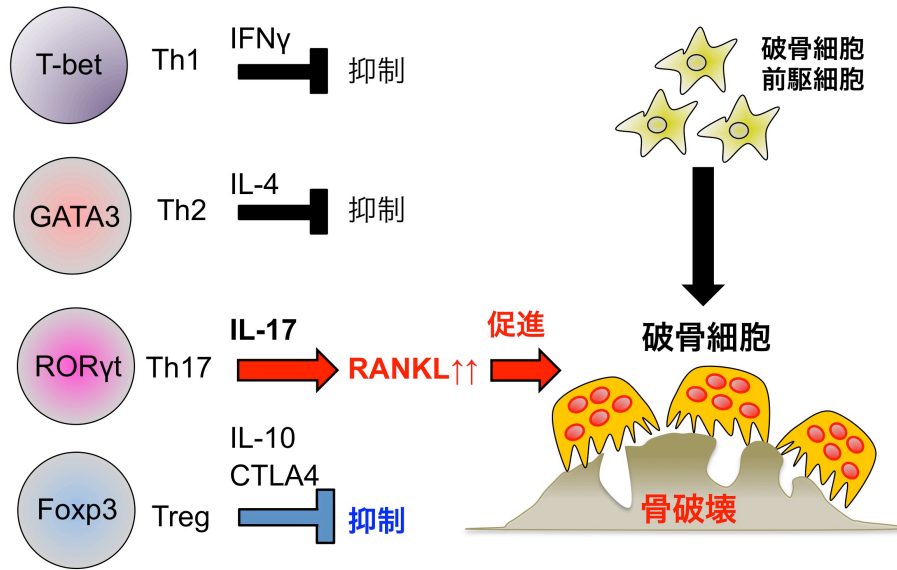


図2 各Thサブセットの破骨細胞分化への影響

Th1細胞、Th2細胞はそれぞれIFN- γ 、IL-4の産生を介し、破骨細胞分化を阻害する。炎症抑制能を持つTregは、IL-10及びCTLA-4を介して破骨細胞分化も抑制し、炎症性骨破壊を阻害する。Th17細胞はIL-17の産生を介し、炎症を誘導すると同時にRANKLの局所濃度を上昇させることで破骨細胞分化を正に制御し、骨破壊を誘導する。これらの知見から、TregとTh17細胞のバランスが炎症性骨破壊において重要な役割を果たすと考えられている。

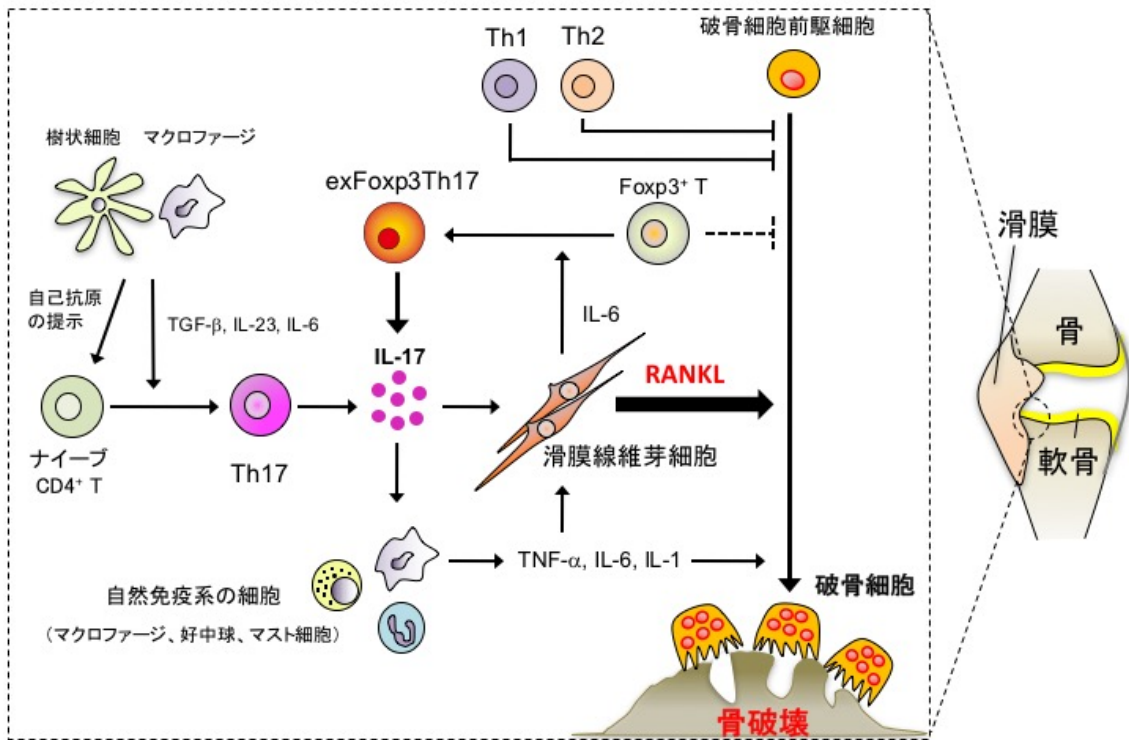


図3 関節リウマチにおける骨破壊メカニズム

滑膜線維芽細胞由来の IL-6 は、炎症及び骨破壊抑制能を有する Foxp3 陽性細胞を exFoxp3Th17 細胞へと分化転換させる。exFoxp3Th17 細胞及び Th17 細胞が産生する IL-17 は、滑膜線維芽細胞上に RANKL の発現を誘導すると同時に、自然免疫系の細胞に働きかけ、炎症性サイトカインの産生を促進する。TNF- α や IL-6、IL-1 といった炎症性サイトカインは、RANKL と協調的に働くことにより破骨細胞分化を正に制御し、骨破壊を促進する。

1-2. 生体バリア部位における宿主細菌相互作用

外部環境と接する皮膚や粘膜は、タイトジャンクションによって強固に連結された上皮細胞シートにより覆われており、内部成分の自由拡散を防ぐと同時に生体防御の一次防衛線として病原体の侵入を拒んでいる⁵⁰。皮膚、口腔、鼻腔、腸、膣、尿道などの各バリア部位には、それぞれ量や種類は異なるものの多数の常在菌が生息しており、宿主と平衡関係を維持している⁵¹。近年、腸管粘膜を中心に、常在菌と宿主との恒常性破綻が、炎症性腸疾患のみならず代謝性疾患や自己免疫疾患、神経疾患、癌など様々な病態に関与する可能性が示唆されてきており⁵²、常在菌と宿主免疫系との相互作用の解明が大きな科学的関心を集めている。

腸の常在菌は、腸管粘膜において免疫細胞を誘導することで宿主の恒常性に影響を与えることが知られている。SPF(Specific pathogen-free) 環境下で飼育されたマウスでは、小腸の粘膜固有層において Th17 細胞が豊富に存在しているが、無菌マウスでは殆ど存在していない⁵³。さらに、同系統の SPF マウスでも、購入する会社によって腸管粘膜の Th17 細胞数に差があることが知られている。Ivanov らは、腸管 Th17 細胞を多く含む Taconic 社から購入したマウスと、腸管 Th17 細胞が殆ど存在しない Jackson 社のマウスの腸内細菌叢を比較することで、セグメント細菌(SFB : Segmented filamentous bacteria)を Th17 細胞誘導細菌として同定した⁵⁴。SFB によって腸管粘膜で誘導された Th17 細胞は、病原菌の腸管への定着を阻害することが示され、SFB と宿主は相互扶助的な関係にあることが示唆されている⁵⁴。しかしながら、SFB を無菌マウスに定着させることで、Th17 細胞の増加を介して関節炎⁵⁵や多発性硬化症⁵⁶といった自己免疫炎症モデルが増悪することも報告されており、常在菌によって腸管粘膜で誘導された Th17 細胞

が、遠隔臓器に遊走し炎症性疾患に関与する可能性も示唆されている。

近年では、腸管以外のバリア部位における常在菌と宿主免疫系の関係性も注目を集めている。皮膚においては、常在菌である表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)が、CD8 陽性の IL-17 産生 T 細胞を誘導することで、病原細菌の定着を防ぐことが示されており⁵⁷、眼の結膜においては、*Corynebacterium mastitidis* と呼ばれる常在菌が、IL-17 産生型の $\gamma\delta$ T 細胞を誘導することで、感染防御に寄与することが報告されている⁵⁸。このように、外界と接するバリア部位では、常在菌が適度に IL-17 産生型の免疫細胞を誘導することで病原細菌の定着を阻害するという共生機構が報告されているが、口腔粘膜に関しては、常在菌非依存的な Th17 細胞誘導メカニズムが提唱されている⁵⁹。Dutzan らは、免疫学研究において一般的に使用される週齢である生後 8 週齢のマウスの歯周粘膜には Th17 細胞はほとんど存在しないものの、24 週齢の老齢マウスの歯周粘膜には Th17 細胞が豊富に存在することを見出した⁵⁹。加齢に伴う歯肉 Th17 細胞の増加は、無菌マウスでも SPF マウスと同程度認められたことから、生理的条件下における歯肉 Th17 細胞の誘導は、細菌非依存的であることが示唆された⁵⁹。興味深いことに、柔らかい餌で飼育したマウスでは加齢に伴う歯肉 Th17 細胞の増加が認められなかったことから、咀嚼に伴う機械的刺激が、加齢に伴う歯肉 Th17 細胞の増加に必要なことが示唆された⁵⁹。一方で、ヒトにおいては、健常人の歯周組織には Th17 細胞は少ないものの、歯周炎患者の歯周組織には Th17 細胞が顕著に集積していることや、歯周炎患者では健常者と比較して歯周組織における IL-17、IL-6、RANKL の発現が高いことが報告されている^{60,61,62,63,64}。歯周炎は口腔細菌依存的な病態である^{65,66} ことから、歯周炎においては口腔細菌による Th17 誘導経路が重要な役割を担う可能性があり、口腔粘

膜における細菌と免疫系の相互作用に関しては未だ不明な点が多い。

1-3. 歯周粘膜バリアの特殊性

消化管の最前線に位置する口腔は、食餌由来の豊富な栄養、35-36°Cの湿潤環境、pH6.75-7.25 と、細菌が生息するのに理想的な環境を有している⁶⁷。胃酸や消化酵素による選択を受けた細菌が生着する腸管とは異なり、多種多様な微生物に暴露する機会を有しており、口腔常在菌、食事や大気由来の微生物、食餌抗原、咀嚼に伴う物理的刺激など、様々な刺激に曝されるユニークなバリア部位である^{66,67}。ヒトの口腔内には約700種類の細菌が生息しており、複雑な生態系を形成している⁶⁸。口腔内においても、舌、頬粘膜、そして歯牙表面のプラークでは菌の組成が異なることが報告されており⁶⁹、プラークが最も高密度かつ多様な菌叢を有していることが知られている^{70,71}。

口腔粘膜は重層扁平上皮により覆われており、頬や口腔底を覆う非角化上皮である被覆粘膜(lining mucosa)、歯肉や硬口蓋を覆い、粘膜固有層が顎骨と結合し、咀嚼に伴う機械的刺激に耐えうる角化上皮である咀嚼粘膜(masticatory mucosa)、舌の表面を覆い、味覚受容器である味蕾を含む特殊粘膜(specialized mucosa)の3種類に大きく分類される^{72,73}。咀嚼粘膜である歯肉には、歯が粘膜を貫通して顎骨に植立しており、歯と歯肉の境界に歯肉溝(gingival crevice)を形成している。歯肉溝は、歯肉溝上皮(sulcular epithelium)と呼ばれる薄い非角化上皮で覆われており、直下には毛細血管が多数存在している。上皮は歯肉溝底に近づくにつれ更に薄くなり、接合上皮(junctional epithelium)と呼ばれる透過性の高い上皮が、ヘミデスマゾーム構造を介して歯と接している⁷³(図4)。このことから、上皮細胞同士がタイト結合によって強固に連結されている他のバリア部

位とは異なり、歯周組織はタイト結合の連続性が破綻した脆弱なバリア部位として知られている。口腔細菌に起因する歯周組織の炎症である歯周炎は、アメリカの成人の約半数が罹患しており、世界で最も罹患率の高い感染症の一つとして知られている^{65,66,74,75}。

接合上皮を介した粘膜と歯の接触は、機械的刺激や、細菌感染に伴う炎症により容易に破壊される。その結果、口腔細菌は歯周組織の血管から、全身循環へと侵入することが知られている^{68,76,77,78}。特に歯周炎患者では、咀嚼⁷⁹やブラッシング^{79,80}、フロッシング^{81,82,83}、歯石除去^{77,84}といった歯周組織への軽微な刺激により、一過性の菌血症が誘発されることが知られており、赤十字社のガイドラインでは、歯科医院で歯石除去などを受けた患者は72時間献血することが禁止されている。

以上のように、腸管や皮膚といった他のバリア部位とは異なり、歯周組織は細菌が直接血流を介して全身へと波及する侵入路として知られ^{76,77,78}、口腔細菌が全身に及ぼす影響に関しては、後述のように古くから様々な議論がなされてきた。

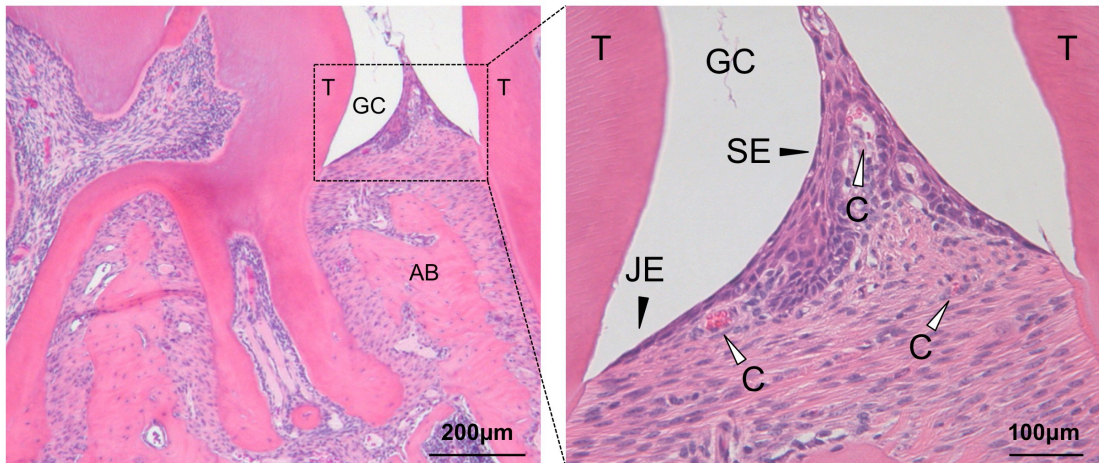


図4 マウス歯周組織のHE染色像

歯と歯肉の境界には歯肉溝(GC)と呼ばれる間隙が存在する。歯肉溝は、歯肉溝上皮(SE)と呼ばれる薄い非角化上皮で覆われており、直下には毛細血管(C)が多数存在する。歯との界面では、接合上皮(JE)と呼ばれる透過性の高い上皮がヘミデスマゾーム構造を介して歯面と接しており、タイト結合の連続性が破綻した脆弱なバリア部位を形成している。
 T : tooth, AB : alveolar bone, GC : gingival crevice, SE : sulcular epithelium, C : capillary, JE : junctional epithelium

1-4. 口腔—全身連関の医学史

口腔疾患が全身疾患に関与するという概念は、医学の歴史において繰り返し提唱されてきた。最古の医学書の一つである中期王朝エジプト(2100 BC)のパピルスには、歯痛と婦人科疾患の関連が記されており、第 12 王朝(2130- 1930 BC)の王家の墓からは口腔清掃器具が発見されている⁸⁵。医学の父として知られる Hippocrates(400 BC)は、状態の悪い歯の抜去により、リウマチ患者の関節痛が寛解した症例を 2 例報告しており^{86,87,88}、同様に 1818 年には、アメリカ合衆国建国の父の一人としても著名な医師である Benjamin Rush が、リウマチを含む幾つかの疾患が、患歯の除去により寛解した症例を複数報告している^{86,87,89}。しかしながら、上記の報告は全て少数の患者の症例報告に基づいた現象論の記載に留まっており、口腔の状態と全身疾患が関連するメカニズムに関しては不明であった。

口腔細菌の存在は、顕微鏡の発明者である Antony von Leeuwenhoek により初めて報告された。1683 年、Leeuwenhoek は 2 人の女性と、生涯一度も歯を磨いたことのない 2 人の男のプラークを自作の顕微鏡で観察し、口腔清掃状態と口腔細菌（当時は、微小動物 "animalcule" と名付けていた）の量が相関することを記録し、ロンドン王立協会に報告している⁸⁶。Leeuwenhoek の観察から長い間、口腔細菌は世の関心を集めることはなかったが、1800 年代後半に Robert Koch と Louis Pasteur によって「細菌説」が確立され、細菌が様々な疾患の原因であることが受け入れられるようになると、口腔細菌に大きな脚光が集まるようになった⁸⁶。

Robert Koch の弟子であり、歯科医師でもあった Willoughby D. Miller は、う蝕の原因は口腔細菌が分泌する酸による無機質の脱灰であるという、「Miller の化学細菌説」

⁹⁰ の提唱者として広く知られるが、口腔細菌が遠隔臓器の疾患に影響を与える可能性について初めて言及したのも Miller であった^{86,87,91,92}。Miller は口腔衛生や歯科治療の重要性を指摘したが、全身疾患の治療・予防として患歯の除去を推奨した訳ではなかった。しかし、この Miller の仮説は次第に口腔敗血症(oral sepsis)という名で呼ばれるようになり、oral sepsis の原因である感染歯を抜去することで様々な疾患が寛解したという症例が相次いで報告される事となった^{93,94}。次第に、扁桃や虫垂なども含め、局所の感染が遠隔臓器の疾患を引き起こすという概念をまとめて病巣感染説(focal infection theory)と呼ぶようになり⁹⁵、リウマチなど全身疾患の治療や予防のために無菌顎にする者まで現れ、保存的な歯科治療よりも抜歯を推奨する考え方が 1900 年代初期の医学・歯学領域で広く受け入れられていった^{86,87,92}。

1940 年頃になると、当時広く行われていた抜歯を含む病巣摘出術の治療効果を検討したコホート研究の結果が報告されるようになった。その中には、病巣摘出術を受けた 200 人のリウマチ患者のうち、1 人も治癒せず 3 人増悪したという報告⁹⁶や、リウマチの予防のために無菌顎にした患者がその後リウマチと消化不良を発症した⁹⁷というもの等が含まれ、次第に病巣摘出術の治療効果が疑問視されることとなった。1940 年代には抗生物質による感染制御法が登場したことも相まり、1952 年 JAMA(Journal of American Medical Association)の editorial にて病巣摘出術の治療効果の否定が宣言され⁹⁸、病巣感染説は医学研究の舞台から姿を消し、忘れ去られることとなった^{86,87,92,98}。

1989 年、一つの症例報告がこの古い概念に関する議論を再燃させた。Mattila らは、急性心筋梗塞で集中治療室に搬送された 100 名の患者は、ランダムに選出された 102 名の対照群と比較して、う蝕や歯周病を含む口腔疾患の重症度が有意に高いことを報告

した⁹⁹。その後、歯周病と心疾患の関連は様々な研究により支持され^{100,101}、現在では感染性心内膜炎の起因菌の35-45%が口腔常在菌であることが広く知られている¹⁰²。上述のように、歯周組織への微細な刺激が口腔細菌の血流への侵入を促すことから、感染性心内膜炎の発症リスクが高いと考えられる患者（心内膜炎の既往を有するもの、人工弁置換患者、先天性心疾患を有する患者など）においては、歯科処置前の抗菌薬予防投与がアメリカ心臓学会のガイドラインで推奨されており、日本もこれに倣っている¹⁰³。一方で、イギリスでは、歯科処置前の抗菌薬投与による感染性心内膜炎の予防効果を示したエビデンスが不足しているとし、2008年のNICE(National Institute for Health and Clinical Excellence)ガイドラインで、歯科治療前の抗菌薬予防投与の推奨を全面的に中止した¹⁰⁴。その結果、イギリス全土で感染性心内膜炎の発症率が有意に上昇していることが2015年Lancet誌に報告され¹⁰⁴、口腔細菌の侵入が遠隔臓器の疾患に影響を与えることが改めて示唆された^{104,105}。心疾患以外にも、糖尿病や関節リウマチ、早産・低体重児出産、アルツハイマー、肝疾患など、様々な疾患と歯周病の有病率及び重症度が相関することが近年の研究によって明らかにされてきており、かつて”oral sepsis”、”focal infection theory”と呼ばれた古い概念は、現在では歯周病と全身疾患の関係を中心に、”periodontal medicine”と名を変え再び注目を集めている^{66,86,87,92}。

1-5. 歯周病のメカニズム

歯周病は歯と歯肉の境界部に形成されるプラークが原因で生じる感染症であり、歯肉に限局した可逆性の炎症である歯肉炎と、歯槽骨の破壊を伴う歯周炎に分類され、歯周炎は成人の歯の喪失の主な原因となっている⁶⁵。歯周病と最も相関が高い口腔細菌群「Red complex」として、*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythensis*の3種が報告され¹⁰⁶、特に*Porphyromonas gingivalis*（以下P.g.菌）は歯周病において最も重要な役割を担う細菌として考えられてきた^{65,67}。

歯周病の発症にはプラーク、すなわち口腔細菌の存在が必須であるが、その進行には宿主の免疫応答が重要な役割を果たす。1976年、PageとSchroederは歯周病患者の検体を用いた組織学的解析により、初期の歯周炎組織はT細胞病変であり、進行した歯周炎組織はB細胞病変であると報告し、獲得免疫系が歯周炎に重要な役割を持つことを示唆した¹⁰⁷。Kawaiらは、抗RANKL抗体を用いた免疫染色により歯周炎組織においてB細胞の90%、T細胞の50%がRANKL陽性であり、B細胞とT細胞が歯周炎におけるRANKLの主要な産生源であることを提唱している¹⁰⁸。同グループは、活性化したB細胞をラットに移入することで、B細胞上のRANKLにより歯槽骨吸収が促進することを報告している^{109,110}。更に、B細胞を欠損したマウス(μMTマウス)では野生型と比較して定常状態で歯槽骨の高さが低く、P.g.菌を感染させてもそれ以上骨吸収が進行しないという報告¹¹¹や、マウスの歯牙に絹糸を結紮することで常在菌の蓄積を促し、歯周炎を誘導するモデル（詳細は後述）においても、骨吸収が部分的に抑制されることが報告されている¹¹²。一方で、高脂肪食で飼育した場合にはμMTマウスは野生型と比較してP.g.菌感染による歯槽骨吸収が抑制されるものの、低脂肪食で飼育した場合は差が見られな

いという報告もあり¹¹³、B細胞の歯周炎における役割に関しては統一した見解は得られていない。

様々な動物モデルを用いた解析から¹¹⁴、歯周炎の進行や骨破壊には、T細胞が必須の役割を果たすことが示唆されている^{65,66,115,116}。Ukaiらは、大腸菌由来のLPSを歯肉に注射することで炎症性歯槽骨破壊を誘導するモデルを用い、T細胞を欠損したヌードマウスでは骨破壊が起こらず、T細胞を移入したヌードマウスでは骨破壊が起こることから、T細胞が歯槽骨破壊に重要な役割を持つことを報告した¹¹⁷。同様に、Bakerらは獲得免疫系を欠損したSCID (Severe Combined Immuno Deficiency) マウスや、CD4陽性T細胞を欠損したMHCII欠損マウス(H2-A β ⁺)では、P.g.菌感染による歯槽骨吸収が生じない一方で、CD8陽性T細胞を欠損したMHCI欠損マウス(β 2m⁺)では野生型と同程度の骨吸収が生じることから、CD4陽性T細胞が歯周炎の骨破壊に重要であることを報告している¹¹⁸。同様にTengらは、重度複合免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) では歯周炎関連菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 感染に伴う歯周骨破壊が抑制されるものの、歯周炎患者の末梢血を移入することで骨破壊が増悪すること、様々な免疫細胞種の中で、CD4陽性T細胞を末梢血から除去して移入した場合にのみ骨破壊が抑制されることを報告し、歯周炎における歯槽骨破壊はCD4陽性T細胞依存的であると報告した¹¹⁹。他にも、 $\alpha\beta$ T細胞を欠損するTCR α 鎖欠損マウスでは、P.g.菌による歯槽骨破壊が抑制されること¹²⁰や、SCIDマウスではLPSによる歯槽骨破壊が起こらないものの、T細胞の移入のみで骨破壊が回復する¹²¹ことが報告されており、歯周炎の骨破壊においてCD4陽性T細胞が必須の役割を持つことが示唆されている。しかしながら、CD4陽性T細胞の中でどのような種類の細胞が、どのように歯槽骨破壊を誘導するのか、そ

の詳細なメカニズムに関しては未だ不明である^{114,115,116}。

上述(1-1. 骨免疫学の進展と炎症性骨破壊のメカニズム)のように、CD4陽性T細胞の中でTh17細胞が唯一の骨破壊誘導性T細胞であり、更には歯周炎患者の歯周組織にTh17細胞が集積していることが報告されており、歯周炎の病態におけるTh17細胞の関与が示唆されている^{60,61,62,63,64}。動物モデルを用いた報告でも、抗IL-17抗体の投与により、絹糸結紮による歯周炎モデル(詳しくは後述)で歯槽骨吸収が阻害されること¹²²や、IL-17欠損マウスでは加齢に伴う歯槽骨吸収が抑制されることが報告されている^{59,122}。しかし、IL-17の受容体(IL-17RA)を欠損したマウスでは、P.g.菌感染モデルにおいて、歯槽骨吸収が逆に増悪するという報告もなされており¹²³、Th17細胞の歯周炎における真の役割に関しては、統一した見解が得られていないのが現状である^{66,115,116,124}。

1-6. 研究目的

Th17 細胞や exFoxp3Th17 細胞といった骨破壊性 T 細胞が引き起こす炎症性骨破壊は、関節リウマチにおける運動機能障害や疼痛の原因となり、患者の quality of life を著しく低下させる。骨破壊性 T 細胞による骨破壊誘導機序の解明と制御を目指し、これまで様々な研究が行われてきたが、本来は細菌感染から生体を防御するために存在する Th17 型免疫応答の活性化が、なぜ骨吸収を誘導するのかについては議論されてこなかった。口腔細菌は歯周炎組織から容易に血流へと侵入し、様々な全身疾患に影響を及ぼすことが知られている。歯周炎が進行すると、歯の支持骨は炎症性骨吸収を起こし、最終的に感染源である歯が脱落し、口腔粘膜の感染及び炎症は終息する。これらの臨床的知見から、私は Th17 型免疫応答による炎症性骨破壊は、感染源である歯を脱落させることで、口腔細菌から生体を防御する役割を持つのではないかと仮説を立てた。

ヒト歯周炎組織には IL-17 陽性 T 細胞が集積していることから、その病態への関与が疑われているが、遺伝子改変動物を用いた因果の証明は不十分であり、歯周炎における Th17 細胞の役割や、その誘導機序、歯槽骨破壊のメカニズムを含め、口腔細菌に対する宿主応答機序は未だ十分に理解されていない。本研究は、歯周炎における骨破壊を担う免疫細胞の同定を通して、口腔細菌に対する生体防御機構を解明することを目的とする。

第二章 方法

2-1. 実験試薬/器具

特に記載のない場合、化学薬品については、ナカライテスク社、和光純薬社の特級試薬を使用した。同様に、プレート、チューブ、フィルターやシャーレ類は BD 社の製品を使用した。

2-2. 実験動物

実験に用いたマウスは SPF 環境下にて飼育し、全ての実験は「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」に従って行った。C57BL/6J 野生型マウスは日本クレアより入手した。*Tnfrsf11*^{flox/flox} マウス(Cre 発現細胞で RANKL を欠損するマウス)¹²⁵、*Tnfrsf11*^{ΔS/ΔS} マウス(可溶性 RANKL 欠損マウス)¹²⁶ は当研究室で樹立したマウスである。*Foxp3*^{hCD2} ノックインマウス(*Foxp3* プロモーター下で human CD2 抗原を発現するマウス)¹²⁷、*Foxp3*-GFP-Cre マウス(*Foxp3* プロモーター下で蛍光分子 GFP と Cre を発現するマウス)⁴²、*Mbl*-Cre マウス(B 細胞特異的 Cre 発現マウス)¹²⁸、ROSA26-loxP-Stop-loxP-YFP マウス(Cre 発現細胞で蛍光分子 YFP を発現するマウス)⁴⁶、*Scx*-Cre マウス(歯周組織において歯根膜線維芽細胞特異的に Cre を発現するマウス)^{129,130}、*Cd4*-Cre マウス(T 細胞特異的 Cre 発現マウス)¹³¹、ROSA-CAG-lox-stop-lox-hKikGR マウス (Cre 発現細胞で、紫色光により緑色から赤色に変化する蛍光タンパク KikGR を発現するマウス)¹³² はそれぞれ東京大学大学院薬学系研究科 免疫・微生物学教室の堀昌平博士、University of California, San Francisco の Jeffrey A Bluestone 博士、Max Planck Institute の Michael Reth 博士、Harvard University の Edward Lamperti

博士、広島大学の宿南知佐博士、Clinical Research Institute of Montreal の Jean Vacher 博士、大阪大谷大学の戸村道夫先生よりご供与頂いた。*Tcr α ⁺* マウス($\alpha\beta$ T 細胞を欠損するマウス)¹³³、*Vav-iCre mice*(血球系細胞特異的 Cre 発現マウス)¹²⁶は Harvard University の Anjana Rao 博士よりご供与頂いた。*Il17a⁺* マウス⁴⁹、*Il17f⁺* マウス⁴⁹は、東京理科大学の岩倉洋一郎博士よりご供与頂いた。*Il17a-GFP* ノックインマウス(*Il17a* プロモーター下で蛍光分子 GFP を発現するマウス)⁴⁶は BIOCYTOGEN 社より入手した。*Sp7-tTA-tetO-Cre* マウス(ドキシサイクリン非存在下で骨芽細胞特異的に Cre を発現するマウス)、*Il6⁺* マウス、*Foxp3-YFP-Cre* マウス(*Foxp3* プロモーター下で蛍光分子 YFP と Cre を発現するマウス)、*Il6ra^{fllox/fllox}* マウス(Cre 発現細胞で IL-6 受容体を欠損するマウス)、*Tcrd⁺* マウス($\gamma\delta$ T 細胞を欠損するマウス)は Jackson Laboratory より入手した^{43, 134, 135}。

2-3. マウス歯周炎モデル

上述のように、歯周病における P.g.菌の重要性が提唱されて以降、歯周病のメカニズムを解析する際には、P.g.菌を動物の口腔内に感染させるモデルが主に使用されてきた^{111, 113, 114, 118, 120, 123}。しかしこのモデルでは、P.g.菌が口腔内に定着し骨吸収が生じるまでに 2-3 ヶ月を要する上、骨吸収の程度が非常に軽微であり、解析が難しいという欠点があった¹¹⁴ (図 5 A)。

2011 年、Hajishengallis らは P.g.菌を SPF マウスの口腔内に感染させた場合は、歯周炎を発症し歯槽骨吸収が生じるものの、無菌マウスに P.g.菌を感染させても骨吸収が起こらないことを報告し、P.g.菌は単独では歯周炎を誘導できず、常在菌の量・質的な

バランスの破綻(Dysbiosis)を介して間接的に歯周炎を誘導することを提唱し¹³⁶、歯周病学研究に大きなパラダイムシフトが起きた^{67,137}。このことから、歯周炎における口腔常在菌の重要性が明らかとなり、常在菌が炎症性骨破壊を引き起こすメカニズムの解明が必要となった¹³⁶。

口腔常在菌に依存した歯周炎モデルとして、動物の歯の周囲に絹糸を結紮する方法が1966年にラットで確立されている¹³⁸。コンベンショナル環境下で飼育したラットでは、絹糸を結紮するだけで歯周炎が起こる一方で、無菌ラットの歯に絹糸を結紮しても骨破壊が生じないことから、このモデルは口腔常在菌依存的事であることが示されている^{114,138}。絹糸モデルの利点として、口腔常在菌と宿主との相互作用が解析できる点や、歯槽骨吸収が短期間で安定して得られるため、骨破壊メカニズムの解析に適している点が挙げられるが、マウスの口腔内が小さすぎるため、これまでラットや犬、霊長類など大型動物でのみ適応可能と考えられてきた(図5A)¹¹⁴。しかし2013年、AbeとHajishengallisが、小さい特殊な器具を使用することでマウスの歯に絹糸を結紮する方法を確立し、これにより様々な遺伝子改変マウスを用いた解析が可能となった¹³⁹。本研究では、私はこの絹糸結紮によるマウス歯周病モデルを解析に使用した。具体的には、生理食塩水(Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)により1/10希釈したペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル; 共立製薬)を $10\mu\text{lg}^{-1}$ 腹腔内投与し、全身麻酔を施した。麻酔奏功後、マウスの上顎第二大臼歯に5-0絹糸(Roboz Surgical Instrument Co., MD, USA)を結紮し、歯周炎を誘導した^{122,139}。(図5B)骨吸収の評価は先行報告に従い、頬舌側12点のエナメルセメント境~歯槽骨頂の距離を測定し、対側の非処置歯をコントロールとした骨吸収の合計を測定することにより骨吸収を評価した^{122,139}。

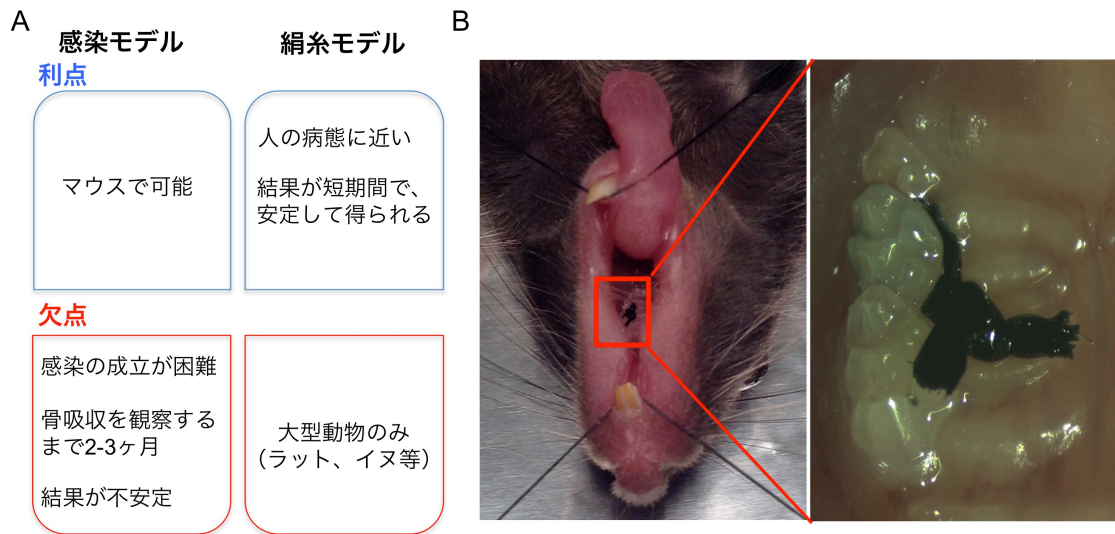


図5 絹糸結紮によるマウス歯周炎モデル

A. 感染モデルと絹糸モデルとの比較。絹糸結紮による歯周炎モデルは、人の病態に近く、結果も短期間で安定して得られるという利点があったが、マウスの口腔が小さいためこれまで大型動物でのみ適用可能とされてきた。**B.** 絹糸結紮によるマウス歯周炎モデル。麻酔下でマウスを開口させ、上顎第2大臼歯に5-0の絹糸を結紮する。

2-4. マイクロ CT 解析法

マウスを頸椎脱臼法により屠殺後、上顎骨を摘出し、70%エタノールで浸漬固定し、解析まで保存した。固定した上顎骨を X 線装置(ScanXmate-D090S105、Comscantecno)および Xsys software (Comscantecno)を用いて CT 撮像し、得られた断面像より coneCT express software (White Rabbit)を用いて三次元画像を構築した。TRI/3D Bon software (Ratoc System Engineering)により解析パラメーターを算出した。

2-5. 組織学的解析法

2-5-1. パラフィン切片作製法

マウスを頸椎脱臼法により屠殺後、上顎骨を摘出し、4%パラフォルムアルデヒド(PFA)で一晩浸漬固定した。固定した組織を脱灰液(OSTEOSOFT, Merck Millipore)中で3週間脱灰した。脱灰した組織は全自動密閉式ティッシュプロセッサ(Leica)を用いて脱水、脱脂、パラフィン浸透し、パラフィン包埋装置(Leica)により包埋した。作成したブロックをマイクロトーム(Leica)により厚さ 7 μ m の切片に薄切し、42°Cの温水上で伸展した後、スライドガラス (松浪硝子工業) 上に回収し、約 40°Cで一晩静置し、乾燥、伸展、接着した。

2-5-2. パラフィン切片染色法

パラフィン切片を用いて酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)染色を行った。

脱パラフィンは以下の手順で行った。

<脱パラフィン>

1.キシレン 5分間

2.キシレン 5分間

3.キシレン 5分間

4.100%エタノール 30秒間

5.100%エタノール 30秒間

6.99.5%エタノール 30秒間

7.95%エタノール 30秒間

8.90%エタノール 30秒間

9.80%エタノール 30秒間

10.70%エタノール 30秒間

TRAP 染色には、以下の要領で用時調整した TRAP 染色液を用いた。切片を3分間洗浄後、30分間 TRAP 染色液に浸漬、染色した後、純粋で洗浄した。その後、ヘマトキシリンに数秒浸漬し対比染色を行った。流水中で30分洗浄した後、脱パラフィンの逆の手順で透徹し、封入剤（マルチマウント 480、松浪硝子工業）とカバーガラス（松浪硝子工業）により封入した。TRAP 陽性で3核以上の多核巨細胞を破骨細胞とし^{24,33,46,125,134,135}、

上顎歯槽骨の面積あたりの破骨細胞数を評価した。

<TRAP 染色液調整法 (用時調整) >

① 基質原液

ナフトール AS-BI リン酸塩 0.07g

N,N-ジメチルホルムアミド 7ml

② 4%パラローズアニリン溶液 (冷却後濾過)

パラローズアニリン 5g

純粋 (50~60°C) 100ml

塩酸 25ml

③ 亜硝酸ナトリウムーアニリン溶液

亜硝酸ナトリウム 0.15g

超純水 3.75ml

②で作製した4%パラローズアニリン溶液 3.75ml

④ 0.2M 酢酸溶液

氷酢酸 2.875ml

純水 250ml

⑤ 0.2M 酢酸ナトリウム溶液

酢酸ナトリウム 8.2g

純水 500ml

⑥ 0.2M 酢酸緩衝液

④で作製した0.2M 酢酸溶液 250ml

⑤で作製した0.2M 酢酸ナトリウム溶液 500ml

(水酸化ナトリウム水溶液により pH5.0 に調整)

⑦ TRAP 染色液

超純粋 45ml

⑥ で作製した0.2M 酢酸緩衝液 60ml

① で作製した基質原液 6ml

③ で作製した亜硝酸ナトリウム-アニリン溶液 7.5ml

酒石酸ナトリウム 1g

(水酸化ナトリウム水溶液により pH5.1 に調整後濾過)

2-5-3. *In situ* hybridization

マウスを断頭により屠殺後、上顎骨を摘出し、ホルムアルデヒド系の組織固定

液 G-Fix (Genostaff)で一晩浸漬固定した。その後、キレート剤を含むマイルドタイプの中性脱灰液 G-Chelate Mild (Genostaff) を使って 2~8°Cにて約 1 ヶ月間脱灰した。キシレン代替品として低毒性溶剤 G-Nox (Genostaff) を使用し、パラフィン包埋装置 CT-Pro20 (Genostaff) を用いてパラフィン包埋しブロックを作製、5 μ m の厚さで薄切し、切片を作製した。組織切片を脱パラフィン化し、10%ホルマリン in PBS で固定(37°C 30 分)し、超純水にて洗浄した。0.2N HCl に浸漬(37°C 10 分)し、PBS で洗浄後、4 μ g/ml Proteinase K in PBS で処理(37°C 10 分)した。*Tnfsf11* または *Il6* に対するプローブ(Genostaff)を 250ng/ml の濃度で調整し、60°Cで 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。対比染色は Kernechtrot Stain Solution(Muto Pure Chemicals)により行った。

2-6. 歯周組織調製法

マウスを頸椎脱臼法により屠殺後、上顎を回収した。回収した上顎を PBS 中に浸漬し、実体顕微鏡下で歯周粘膜を上顎から剥離し、単離した。

2-7. 細胞調製法

2-7-1 歯周組織からの細胞調整法

マウスを頸椎脱臼法により屠殺し、2-5 と同様に上顎を回収した。酵素溶液 (2% Foetal bovine serum (FBS)、2mg/ml Collagenase Type 2 (Worthington Biochemical Corp.)、1mg/ml DNase Type 1 (SIGMA) in PBS) の中で、歯周粘膜を上顎骨から単離した。歯周粘膜を鉗

にて細断した後、37°Cで20分間振盪させた。0.5MEDTAを20 μ m添加し、更に10分間37°Cで振盪させた。振盪終了後、12mlの2% FBS in PBS溶液を添加し、70 μ mメッシュを通した後遠心し、歯周粘膜細胞を回収した¹⁴⁰。

2-7-2 リンパ節及び脾臓からの細胞調整法

マウスを頸椎脱臼法により屠殺し、リンパ節または脾臓を回収した。6wellプレートを用いて、IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma Aldrich))に浸した70 μ mメッシュ上で臓器を擦り潰し、細胞を回収した。脾細胞に関しては、塩化アンモニウム溶血バッファー (Red blood cell lysing buffer, Sigma) を加え室温で静置し、赤血球を除去した。

2-8. 遺伝子発現解析法

2-6の要領で調製した歯周組織から TRIzol® (Life technologies)を用い、acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform(AGPC)法により全RNAを抽出した。Superscript® III reverse transcriptase (Invitrogen)を用い、メーカーの提供するプロトコールに従い全RNAを鋳型とした一本鎖cDNAを合成した。SYBR® Green (Toyobo) と LightCycler® (Roche)を用いて、リアルタイムRT-PCR法により遺伝子発現を解析した。目的の遺伝子の発現量は $\Delta\Delta C_t$ 法により相対値として算出した。このとき、内部標準として *Gapdh* を用いた。解析に用いたプライマーの配列を以下に示す。PCR反応条件は、熱変性 (95°C、10秒間)、アニーリング・伸長 (60°C、30秒間) を45サイクル行った。実験はすべて n=3 以

上の個体数で行い、1つの個体につき3ウェル解析をして平均値を算出した。

プライマー配列一覧

Gapdh

Fw; 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Rv; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

Tnfsf11

Fw; 5'-AGCCATTTGCACACCTCAC-3'

Rv; 5'-CGTGGTACCAAGAGGACAGAGT-3';

Il17a

Fw; 5'-TCCCTCTGTGATCTGGGAAG-3'

Rv; 5'-AGCATCTTCTCGACCCTGAA-3';

Il17f

Fw; 5'-CAAAACCAGGGCATTCTGT-3'

Rv; 5'-ATGGTGCTGTCTTCCTGACC-3'

Il4

Fw; 5'-CCTCACAGCAACGAAGAACA-3'

Rv; 5'-ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT-3'

Ifnjg

Fw; 5'-GCGTCATTGAATCACACCTG-3'

Rv; 5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3';

Tnfa

Fw; 5'-GCTGAGCTCAAACCCTGGTA-3'

Rv; 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'

Il6

Fw; 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3'

Rv; 5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'

Rorc

Fw; 5'-TGCAAGACTCATCGACAAGG-3'

Rv; 5'-AGGGGATTCAACATCAGTGC-3'

Defb1

Fw; 5'-AGGTGTTGGCATTCTCACAAG-3'

Rv; 5'-GCTTATCTGGTTTACAGGTTCCC-3'

Defb4

Fw; 5'-GCAGCCTTTACCCAAATTATC-3'

Rv; 5'-ACAATTGCCAATCTGTCGAA-3'

Cxcl1

Fw; 5'-CGCTTCTCTGTGCAGCGCTGCT-3'

Rv; 5'-CAAGCCTCGCGACCAATTCTTGA-3'

Cxcl2

Fw; 5'-TCCAGAGCTTGAGTGTGACG-3'

Rv; 5'-TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC-3'

2.9. フローサイトメトリー法

2-6 の要領で調製した細胞に対して、解析終了まで全ての手順を 4°C にて行った。試薬の希釈や細胞の洗浄には FACS バッファー (5%FBS、PBS) を用い、洗浄は 2 回ずつ行った。細胞を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1.0×10^6 個以下の個数分取し、洗浄後、1/100 に希釈した抗 CD16/32 抗体 (93、Biolegend) 40 μ l を添加し、10 分間蛍光灯を照射してブロッキングした。1/50 に希釈した抗体溶液を 10 μ l 添加し、遮光状態で 30 分間反応させた。二次抗体や蛍光標識ストレプトアビジンを用いた多

段階の染色を行った際には、洗浄後 1/100 に希釈した抗体溶液を 20 分間反応させた。

細胞内のサイトカイン染色の際には、染色の前に PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 50 ng/ml, Sigma-Aldrich) 、 ionomycin (500 ng/ml; Sigma-Aldrich)、及び GolgiPlug (500 ng/ml; BD Biosciences)を含む IMDM 溶液にて 37°C で 4~5 時間刺激を加えた。細胞内の Foxp3 を染色する際には、Foxp3 staining buffer set (eBioscience) をメーカーの提供するプロトコールに従って使用した。

染色した検体からは、FACS CANTO II (BD Bioscience) を用いてデータを取得し、FlowJo ソフトウェア (TREE STAR) によって解析を行った。細胞のソーティングには BD FACS Aria III (BD Bioscience) を用いた。

フローサイトメトリー法で用いた抗体

抗 CD4 (RM4-5, eBioscience)

抗 CD25 (PC61, eBioscience)

抗 CD39 (24DMS1, eBioscience)

抗 CD44 (IM7, eBioscience)

抗 CD62L (MEL-14, eBioscience)

抗 CD62L (MEL-14, eBioscience)

抗 CD103 (2E7, eBioscience)

抗 OX40 (OX-86, eBioscience)

抗 OX40 (OX-86, eBioscience)

抗 GITR (DTA-1, eBioscience)

抗 TCR- β (H57-597, eBioscience)

抗 TCR- β (H57-597, eBioscience)

抗 CCR6 (140706, eBioscience)

抗 RANKL (IK22/5, eBioscience)

抗 KLRG1 (2F1, eBioscience)

抗 FR4 (eBio12A5, eBioscience)

抗 Foxp3 (FJK-16s, eBioscience)

抗 CTLA-4 (UC10-4B9, eBioscience)

抗 IFN- γ (XMG1.2, eBioscience)

抗 IL-4 (11B11, eBioscience)

抗 IL-17A (eBio17B7, eBioscience)

抗 Helios (22F6, BioLegend)

抗 Nrp1 (FAB566N, R&D Systems)

抗 human CD2 (RPA-2.10, eBioscience)

2-10. Th17 細胞及び exFoxp3Th17 細胞の in vitro 誘導法

2-3 の要領で *Foxp3^{hCD2} Il17a-GFP* ダブルノックインマウスに歯周炎を誘導し、一週間後にリンパ節及び脾臓から 2-6-2 の要領で細胞を調整した。パニングプレート (抗 IgG Fc 抗体 (Cappel, 55472, 2mg/ml) を 1/200 の濃度で PBS に希釈し、10cm プレート底に定着させたもの) を用いて、非特異的に IgG 抗体に接着する細胞を除去した後、抗ヒト CD2 抗体で染色した。抗 PE マイクロビーズ (Mlitenyi Biotech) と LS カラム (Mlitenyi Biotech) を使用し、hCD2 抗体陽性の集団 (*Foxp3* 陽性細胞) と、hCD2 抗体陰性の集団 (*Foxp3* 陰性細胞) をそれぞれ回収し、抗 CD4 抗体、抗 CD44 抗体、抗 CD62L 抗体で染色し、FACS Aria III を用いて、ナイーブ T 細胞 ($CD44^lo CD62L^hi Foxp3^{hCD2-} CD4^+$ 細胞) と、*Foxp3* 陽性 T 細胞 ($Foxp3^{hCD2+} CD4^+$ 細胞) を回収した。ナイーブ T 細胞と *Foxp3* 陽性 T 細胞を Th17 分化誘導培地 (下記載) において 4 日間培養し、*Foxp3^{hCD2-} Il17a-GFP⁺ CD4⁺*細胞をそれぞれ Th17 細胞及び exFoxp3Th17 細胞とし、再びソーティングにより回収し、遺伝子発現及び細胞膜上の RANKL 発現を解析した。細胞移入実験の際には、*Tcra⁺* マウスに全身麻酔を施し、 3×10^4 の Th17 細胞または exFoxp3Th17 細胞を経静脈的に移入し、同時に 2-3 の要領で歯周炎を誘導した。

<Th17 細胞分化誘導培地>

Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma Aldrich)

2mM L-glutamine (Sigma)

10% FBS (BOVOGEN)

50 μM 2-Mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific)

100 U ml^{-1} penicillin and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin (Thermo Fisher Scientific)

10 ng ml^{-1} recombinant mouse IL-1 β (rmIL-1 β) (R&D Systems)

100 ng ml^{-1} rmIL-6 (Pepro Tech)

50 ng ml^{-1} rmIL-23 (R&D Systems)

5 ng ml^{-1} recombinant human transforming growth factor- β 1 (rhTGF- β 1) (R&D Systems)

5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ anti-IFN- γ (XMG1.2, BD Biosciences)

5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ anti-IL-4 (11B11, BD Biosciences)

25 μl per 1×10^6 cells beads coated with monoclonal antibodies to CD3 and CD28 (Dyna)

2-11. 細菌学的解析

2-11-1. 肝臓及び脾臓からの細菌検出法

マウスを頸椎脱臼法により屠殺し、全身を70%エタノールでよく消毒した後、クリーンベンチ内で肝臓及び脾臓を摘出した。臓器表面を70%エタノールで消毒した後、滅菌した生理食塩水でよく洗浄した。臓器を滅菌した生理食塩水に浸漬し、Tissue homogenizing CKMix (Bertin Technologies)を用いてホモジナイズし、Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (BD Bioscience) で好気培養を、CDC Anaerobe blood agar (BD Bioscience) で嫌気培養を37°Cで二日間行った。嫌気環境の作製には、アネロパック・ケ

ンキ（三菱ガス化学）を用いた。

2-11-2. 細菌 DNA 抽出法

2-11-1 で臓器から得られた細菌、新鮮な糞便、歯に結紮した絹糸をマウスから採取し、Nucleospin® Tissue Kit (Takara) を用いてメーカーの提供するプロトコールに従い DNA を抽出した。

2-11-3. 細菌量の評価法

2-11-2 で得られた細菌 DNA を、Bacteria (*tuf* gene) Quantitative PCR Kit (Takara) を用いて、SYBR® Green (Toyobo) と LightCycler® (Roche) を使用したリアルタイム RT-PCR 法により、細菌 DNA 量を定量的に解析した。

2-11-4. 16s rRNA の網羅的シーケンス

2-11-2 の要領で抽出した DNA 検体の 16s rRNA の V4 領域を PCR 反応にて特異的に増幅した。増幅した細菌 DNA は Nextera XT Index Kit v2 (Illumina) にてバーコードを付けて標識した。菌叢 DNA 検体は Illumina Miseq (Illumina) にて 150bp のペアエンドシーケンスを行なった。

V4 領域の増幅に利用したプライマー

Fw; 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' (F515)

Rv; 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (R806)

2-11-5. 16s rRNA の網羅的解析

2-11-4 の手順で得た腸内細菌のリードデータを CLC genomics workbench microbial genomics module (filgen)を用いて解析した。

2-12. 図中の画像データの表示

図中の顕微鏡写真、フローサイトメトリー法のドットプロット、ヒストグラムは複数回の実験のうち、典型的な結果を表示した。

2-13. 統計解析法

2 群間の比較には Student の t 検定を適用した。多群間の比較に際しては、analysis of variance (ANOVA) 法による多重比較 (Dunnnett 法または Turkey 法) を行なった。細菌叢の weighted UniFrac に対しては permutational ANOVA (PERMANOVA)法を用いた。解析に適用した検定法はそれぞれの図に示す。 P 値が 0.05 未満である場合、統計的に有意な差があると判定した。グラフの*は P 値が 0.05 未満、**は 0.01 未満、***は 0.005 未満であることを示し、NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。統計解

析を行った実験は全て $n=3$ 以上の個体数で行い、データは全て平均値±標準誤差で表した。

第三章 結果

3-1. 炎症性骨破壊による感染菌の排除は口腔細菌の遠隔臓器への波及を防ぐ

まず、絹糸結紮による歯周炎モデルの骨破壊進行をマイクロCT及び組織学的解析により観察した。絹糸結紮後2週間で、歯槽骨が破骨細胞により吸収され、歯の動揺を認めるまで炎症性骨破壊が進行することが明らかとなった(図6)。

歯周炎患者が頻繁に菌血症を起こすことはよく知られているが、口腔細菌が遠隔臓器に波及することを実験的に示した証拠は少ない^{68,76,77}。興味深いことに、歯周炎を持続的に誘導したマウスでは、肝臓及び脾臓細胞の培養プレートから、細菌のコロニーが検出された(図7A,C,D)。一方で、炎症性骨破壊のピークで感染菌を除去したマウスでは、その後抜歯窩は粘膜で被覆され(図7B)、肝臓や脾臓への口腔細菌の波及も終息した(図7C,D)。

肝臓と脾臓から細菌が検出されたマウスの、歯に結紮した絹糸及び便から細菌DNAを抽出し、16S シークエンス解析により菌叢を解析したところ、肝臓と脾臓で検出された細菌は絹糸からも検出される一方で、便からは検出されないことが明らかとなり(図8)、炎症の持続による歯周粘膜バリアの破綻から口腔細菌が侵入し、遠隔臓器まで波及することが示唆された。口腔粘膜の炎症性サイトカインの遺伝子発現を検討したところ、歯周炎を持続させたマウスでは、IL-6やIL-17AといったTh17細胞関連遺伝子の発現が上昇していたが、感染菌を除去したマウスでは粘膜局所における炎症性サイトカインの発現が低下した(図9)。以上の結果から、炎症性骨破壊による感染菌の脱落は、口腔細菌の遠隔臓器への波及と局所炎症を終息させる働きを持つことが示唆された。

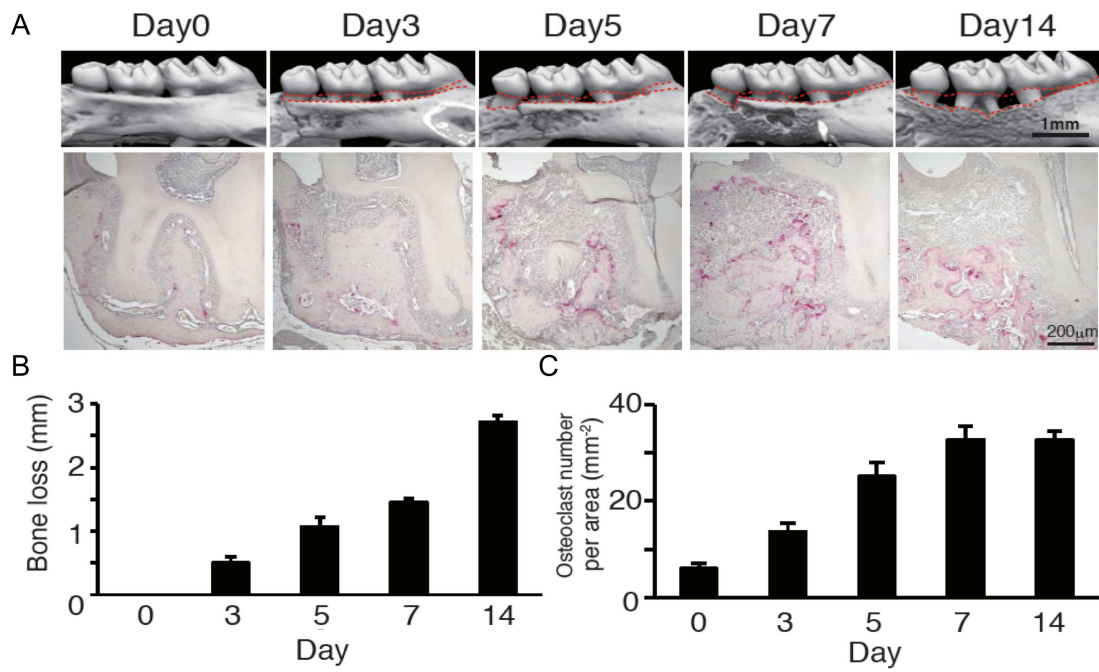


図6 マウス歯周炎モデルにおける骨破壊の進行

A. マイクロCT像及びTRAP染色像。 B. セメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離。(n=2-3) C. 歯周組織における破骨細胞数。(n=2-3)

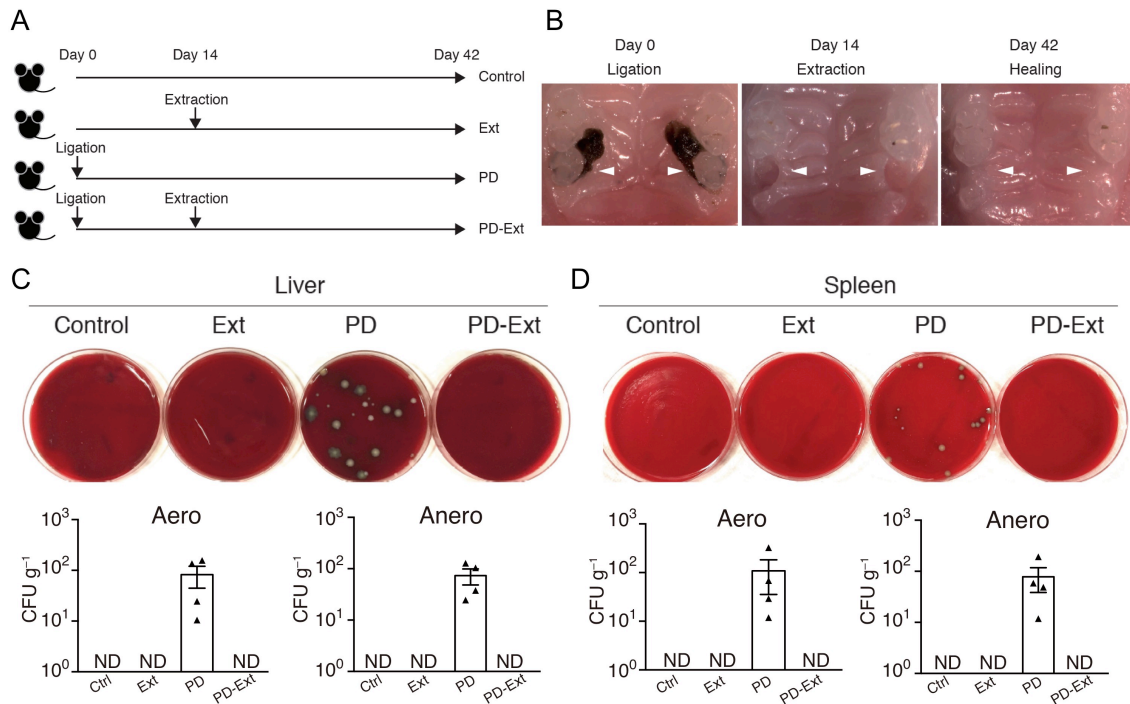


図7 感染歯の排除は遠隔臓器感染を阻害する

A. 実験のタイムコース。Control 群、Ext 群(絹糸は結紮せず、Day 14 で第二大臼歯を抜歯した群。)、PD 群 (Day 42 まで菌周炎を持続させた群。絹糸は週に一度新しいものに交換した。)、PD-Ext 群 (絹糸結紮後、Day 14 で患歯を除去した群。) を準備し、Day 42 で臓器培養及び口腔粘膜の遺伝子発現解析を行った。 **B.** PD-Ext 群における抜歯窩の治癒過程。白矢頭は第二大臼歯の抜歯窩を示す。 **C and D,** 肝臓(C)及び脾臓(D)細胞の好気(Aero)及び嫌気(Anero)培養から検出された細菌コロニー。PD 群ではコロニーが検出されたが、PD-Ext 群ではコロニーが検出されなかった。(n=3-4)

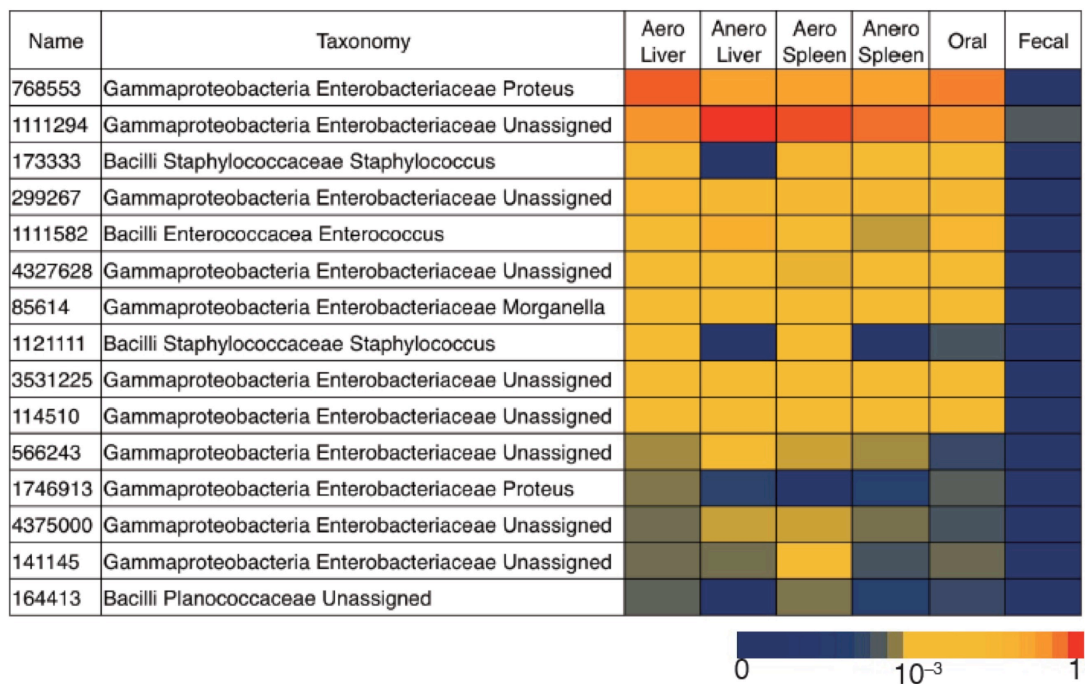


図8 肝臓及び脾臓から検出された細菌は口腔に由来する

肝臓及び脾臓から得られた細菌コロニーと、歯牙に結紮してあった絹糸(Oral)、及び同じマウスより得た糞便(Fecal)から回収した細菌DNAに対し16Sシーケンス解析を行い、各菌の相対量を定量化した。肝臓の好気培養(Aero Liver)で最も検出頻度の高かった菌種(綱(class)、科(family)、属(genus)を記載)を上から順に15種類並べた。肝臓及び脾臓から検出された菌種は同じマウスの口腔からも検出されたが、便からは検出されなかった。3回以上行った実験の中で、代表的なデータを示す。

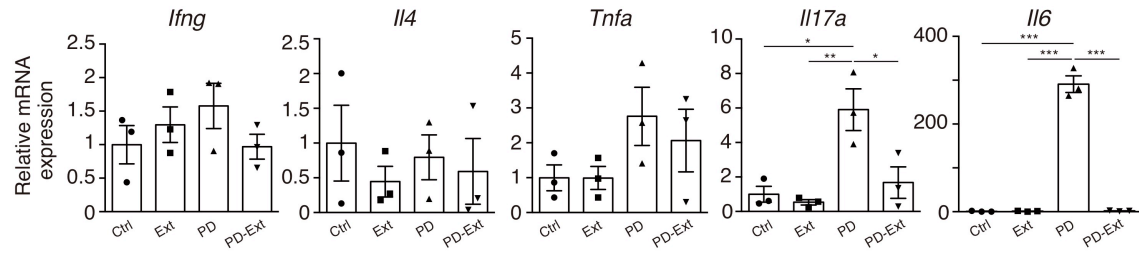


図9 感染菌の排除は口腔粘膜における Th17 型の炎症を終息させる

Control 群、Ext 群、PD 群、PD-Ext 群から口腔粘膜を回収し、qPCR 法によって炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析した。PD 群では IL-17A や IL-6 といった Th17 関連遺伝子の発現上昇が認められたが、PD-Ext 群では認められなかった。(n=3)

3-2. Th17 細胞は口腔細菌依存的に歯周炎組織に集積する

そこで私は、炎症性骨破壊を誘導する細胞が、口腔細菌感染制御に重要な役割を果たすという仮説を立てた。これまでに、CD4 陽性 T 細胞が歯周炎の骨破壊において必須の働きをしていることが報告されている^{115,116,119} ことから、どのような種類の CD4 陽性 T 細胞が、歯周炎組織に集積しているかをフローサイトメトリーにより検証した。その結果、Th1 細胞、Th2 細胞、Treg は、歯周炎環境下においてその割合が増加しないことが明らかとなった (図 10)。歯周炎組織では Th17 関連遺伝子が上昇するという結果 (図 9) と一致し、歯周炎組織では IL-17 陽性 CD4 陽性 T 細胞が顕著に集積していた (図 11 A)。

近年、Dutzan らは、8 週齢のマウスの歯周組織には Th17 細胞が殆ど存在しないものの、24 週齢のマウスには多く存在していることを報告している。この現象は無菌マウスでも認められた事から、生理的条件下では、Th17 細胞は加齢に伴い口腔細菌非依存的に口腔粘膜に集積することが提唱されている⁵⁹。Dutzan らの報告と一致して、Th17 細胞は8 週齢のマウスの歯周組織には殆ど存在しなかったが、歯周炎を誘導したマウスの歯周組織では、Th17 細胞の数及び頻度が顕著に増加していた (図 11 A, D, E)。

歯周炎組織での Th17 細胞誘導における口腔細菌の役割を検討するため、絹糸結紮の一週間前からマウスを抗生剤カクテル (ampicillin 1 mg ml⁻¹, streptomycin 5 mg ml⁻¹, colistin 1 mg ml⁻¹) 入りの水で飼育し解析した¹⁴¹。通常の水で飼育したマウスでは、歯牙に1週間結紮した絹糸には大量の口腔細菌が蓄積していたが、抗生剤カクテル入りの水で飼育したマウスの絹糸からは口腔細菌が検出できず、この条件ではほぼ完全にマウス口腔細菌を除去できる事が示された (図 11 B, C)。抗生剤カクテル入りの水で飼育したマウスで

は、歯周炎による Th17 細胞の集積が完全に阻害された (図 11 D,E) ことから、歯周炎において Th17 細胞は細菌依存的に口腔粘膜に集積することが明らかとなった。マウスに抗生剤入りの水を飲ませる実験系は腸内細菌にも影響を与えるため¹⁴¹、腸内細菌が死滅することによって腸管粘膜で Th17 細胞が減少し、その結果として歯周炎組織に遊走する Th17 細胞が減少した可能性も排除できない。そこで私は、歯周炎組織に集積する Th17 細胞が腸管粘膜由来であることを調べるため、波長 436 nm の紫色光により色が緑から赤に変化する蛍光タンパク KikGR を、血球細胞特異的に発現するマウス (ROSA-CAG-lox-stop-lox-hKikGR × *Vav-iCre* マウス) を使用した。このマウスに歯周炎を誘導し、絹糸結紮後 5 日目 (Day 5) で、腸管粘膜の中で最も Th17 細胞が多く存在する回腸遠位端¹⁴² に紫色光を照射し、絹糸結紮後 7 日目 (Day 7) で歯周炎組織に集積した Th17 細胞の蛍光タンパクの色を解析した (図 12 A)。まずはコントロールの実験として腸間膜リンパ節を解析したところ、紫色光を照射していないマウスの腸間膜リンパ節では、赤色 (KikGR-red) に標識される細胞は検出されない一方で、Day 5 で腸管粘膜に紫色光を照射したマウスでは、KikGR-red 陽性の T 細胞が検出され、腸管粘膜から腸間膜リンパ節へと T 細胞が遊走していることが明らかとなった (図 12 B)。同条件下で、歯周炎を誘導したマウスの歯周組織と頸部リンパ節を解析したところ、Th17 細胞は KikGR-red 陰性であることが明らかとなり、歯周炎組織に集積する Th17 細胞は腸管粘膜由来ではなく、口腔細菌依存的に歯周炎組織で分化、増殖することが示唆された (図 12 C)。

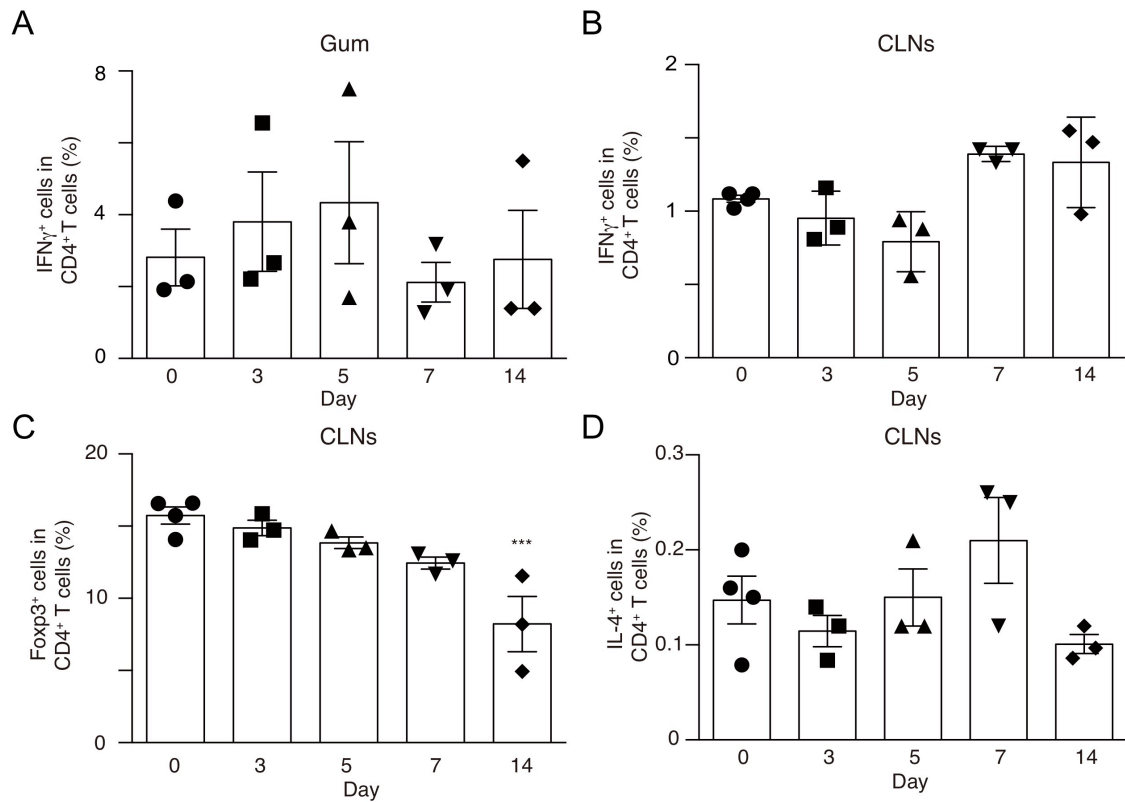


図 10 歯周炎における Th1, Th2, Treg 細胞の割合の変動

A. 歯周組織(Gum)における Th1 細胞の割合の変動。(n=3) B. 歯周炎マウスの頸部リンパ節(CLN)における Th1 細胞の割合の変動。(n=3) C. 歯周炎マウスの頸部リンパ節(CLN)における Treg の割合の変動。(n=3-4) D. 歯周炎マウスの頸部リンパ節(CLN)における Th2 細胞の割合の変動。(n=3-4)

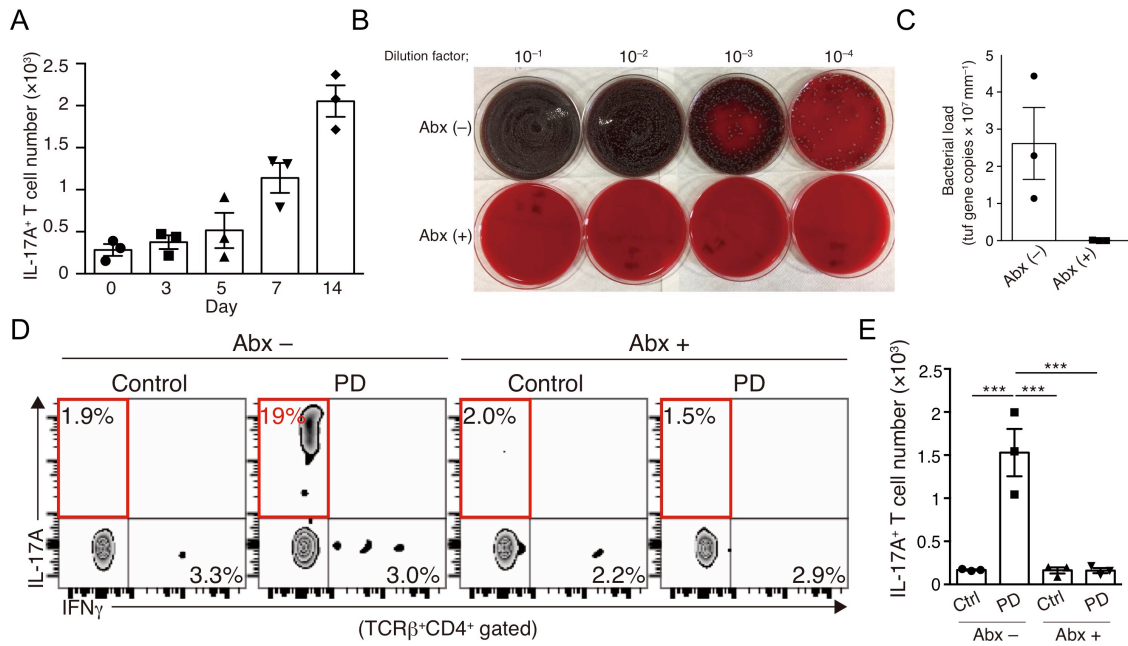


図 11 歯周炎において Th17 細胞は口腔細菌依存的に口腔粘膜に集積する

A. 歯周炎組織における Th17 細胞数の変動。(n=3) **B.** 通常の水で飼育したマウス (Abx (-)) 及び絹糸を結紮する 1 週間前から抗生剤カクテル入りで飼育したマウス (Abx (+)) から、結紮して 1 週間後の絹糸を回収し、希釈系列を作製し培養した。 **C.** B で得た絹糸から細菌 DNA を回収し、qPCR 法により菌 DNA の総量を解析した。(n=3) **D, E.** 通常の水で飼育したマウス (Abx (-)) と抗生剤カクテル入りで飼育したマウス (Abx (+)) において、コントロール(Ctrl)及び歯周炎誘導群(PD)の口腔粘膜における Th17 細胞の割合(D)及び細胞数(E)を解析した(n=3)。

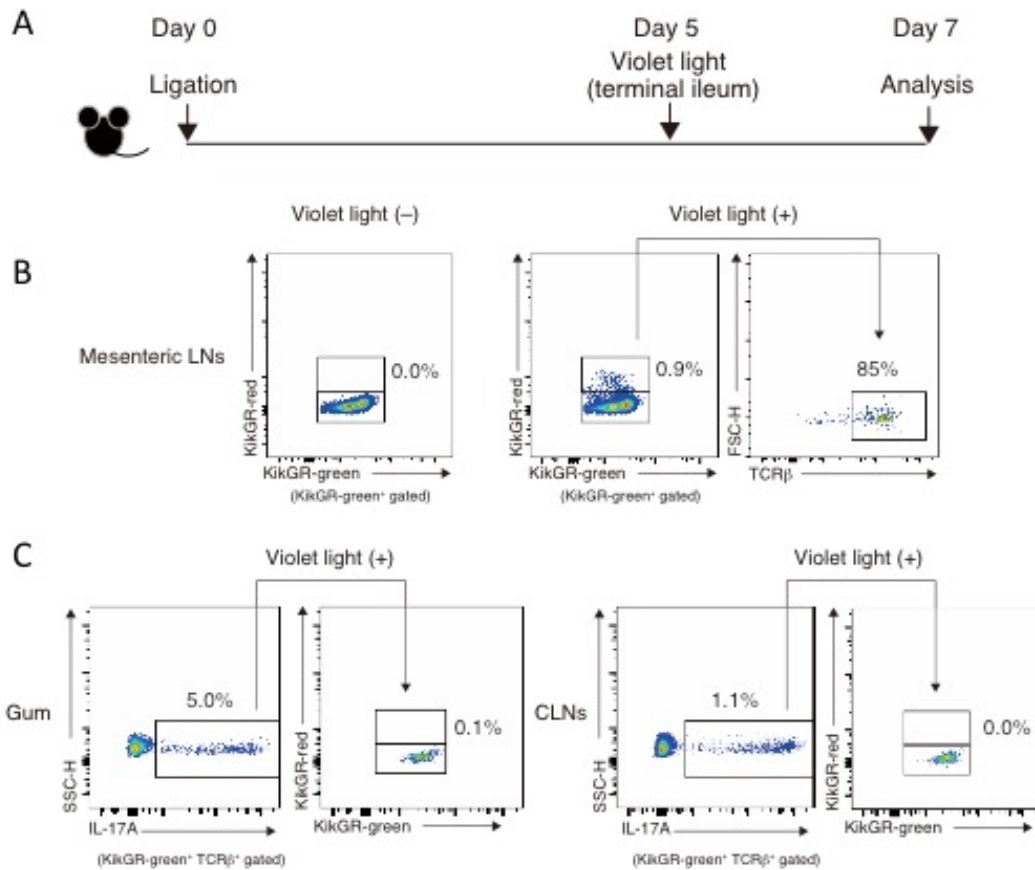


図 12 歯周炎組織に集積する Th17 細胞は腸管粘膜には由来しない

A. 実験のタイムコース。ROSA-CAG-lox-stop-lox-hKikGR × *Vav-iCre* マウスに歯周炎を誘導後、Day 5 で回腸遠位端に紫色光を照射し、Day 7 で歯周炎組織及び腸間膜リンパ節を解析した。 **B.** 腸間膜リンパ節における、KikGR-red 陽性細胞の割合。波長 436 nm の紫色光(Violet light)で回腸遠位端を照射しなかったマウス (左) では KikGR-red 陽性細胞が検出されない一方で、Day 5 で回腸遠位端に紫色光を照射したマウスでは、Day 7 で KikGR-red 陽性細胞が検出され、その多くは T 細胞であった。 **C** 歯周炎組織(Gum)及び頸部リンパ節(CLN)の Th17 細胞における、KikGR-red 陽性細胞の割合。歯周炎に伴い集積する Th17 細胞は KikGR-red 陰性であり、腸管粘膜由来ではないことが示唆された。3 回以上行った実験の中で、代表的なデータを示す。

3-3. Th17 細胞は口腔細菌の排除と骨破壊の両方に寄与する

これまでの多くの報告から、Th17 細胞は IL-17 の産生を介して骨破壊を誘導することが示されている^{3,33,46,47}。そこで歯周炎マウスにおける Th17 細胞の働きを検討するため、*Il17a*⁺マウス及び *Il17f*⁺に歯周炎を誘導し、骨破壊を検討した。歯周炎組織では IL-17A が高発現していたが (図 9、図 13)、予想に反して *Il17a*⁺マウスでも野生型と同程度に骨破壊が誘導された (図 13)。そこで *Il17a*⁺マウスの歯周炎組織の遺伝子発現を検討したところ、IL-17A と相同性が高く同じ受容体を共有する IL-17F の発現が上昇していた。IL-17F も IL-17A と同様に破骨細胞分化を促進することから^{49,49,49}(Ishigame et al., 2009)(49)^{49,49,49}、代償的に過剰産生された IL-17F が、IL-17A の機能を補償している可能性が考えられた。そこで *Il17a*⁺ *Il17f*⁺マウスを解析したところ、歯周炎における骨破壊が部分的にはあるが有意に抑制されることが明らかとなった (図 14 A,B)。IL-17A 及び IL-17F は腸管や結膜、皮膚といったバリア部位において、好中球の遊走や上皮細胞の抗菌ペプチドの発現制御を介して細菌感染防御に寄与する事が知られている⁴⁹。そこで歯周炎を誘導したマウスの絹糸から回収した細菌 DNA 量を解析したところ、*Il17a*⁺ *Il17f*⁺マウスでは、野生型と比較して口腔細菌の量が有意に増加しており、その組成も有意に変化していることが明らかとなった (図 14 C-E)。

以上の結果から、歯周炎組織に集積した Th17 細胞は IL-17 を産生し、骨破壊を誘導すると同時に口腔細菌を量・質的に制御することで、歯周炎における口腔細菌への生体防御に寄与していることが示唆された。

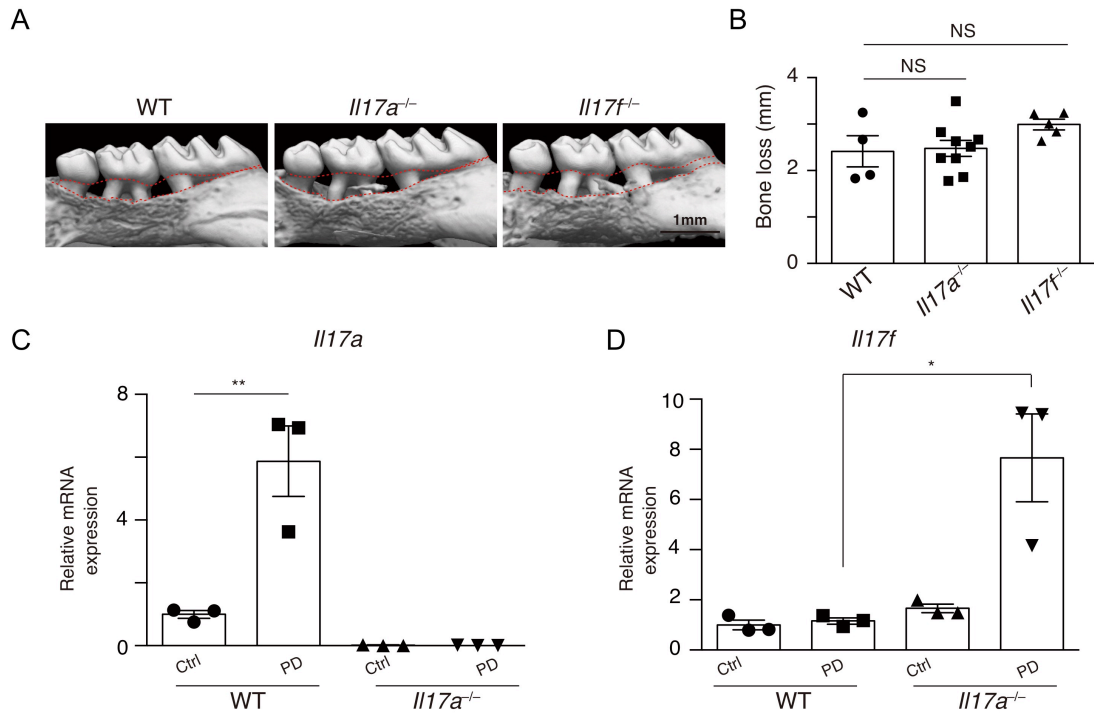


図13 IL-17A 欠損マウスの歯周炎組織ではIL-17F の発現が上昇する

A, B. 野生型マウス、*Il17a^{-/-}*マウス及び *Il17f^{-/-}*マウスにおける歯周炎組織のマイクロ CT 像(**A**)及びセメントエナメル境～歯槽骨頂距離(**B**)。 (n=4-9) **C.** コントロール (Ctrl) 及び歯周炎を誘導(PD)した、野生型マウス及び *Il17a^{-/-}*マウスの歯周組織における *Il17a* 遺伝子発現。 (n=3) **D.** 野生型マウス及び *Il17a^{-/-}*マウスの歯周組織における *Il17f* 遺伝子発現。 (n=3)

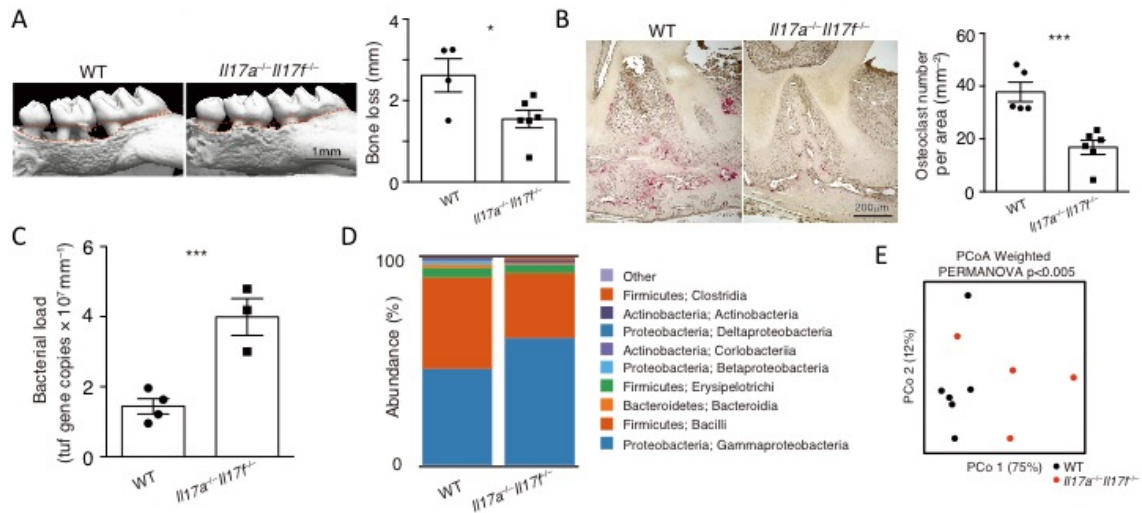


図 14 Th17 細胞は歯周炎において骨破壊と細菌制御に寄与する

A. 野生型マウス及び *Il17a^{-/-}Il17f^{-/-}* マウスにおける歯周炎組織のマイクロ CT 像とセメントエナメル境～歯槽骨頂距離。(n=4-6) **B.** 野生型マウス及び *Il17a^{-/-}Il17f^{-/-}* マウスにおける歯周炎組織の TRAP 染色像と破骨細胞数。(n=5-6) **C.** 野生型マウス及び *Il17a^{-/-}Il17f^{-/-}* マウスに 10 日間結紮した絹糸から細菌 DNA を回収し、qPCR 法により菌 DNA の総量を解析した。(n=3-4) **D.** 野生型マウス及び *Il17a^{-/-}Il17f^{-/-}* マウスに 10 日間結紮した絹糸から細菌 DNA を回収し、16S シーケンス法により菌の組成(門 (phylum)および綱 (class))を定量解析した。(n=4-6) **E.** 絹糸に蓄積した口腔細菌叢の違いを主成分分析法 (PCoA)にて解析。統計学的検定は permutational ANOVA (PERMANOVA)法を用いて行なった。(n=4-6)

3-4. 歯周炎組織では Foxp3 陽性 T 細胞が exFoxp3Th17 細胞へ分化転換する

近年、CD4 陽性 T 細胞の分化可塑性が、様々な疾患の病態において重要な役割を担うことが示されている^{39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46}。Foxp3 陽性 T 細胞由来の Th17 細胞 (exFoxp3Th17 細胞)は、関節炎⁴⁶や喘息⁴³の病態に関与しており、試験管内において従来のナイーブ由来 Th17 細胞よりも高い破骨細胞分化誘導能を有することから、関節破壊において最強の骨破壊誘導能を持つ T 細胞であることが示唆されている⁴⁶。そこで次に私は、歯周炎で集積する Th17 細胞の中に、Foxp3 陽性 T 細胞由来の exFoxp3Th17 細胞が含まれており、歯周炎の病態に寄与しているという仮説を立てた。

これを検証するため、Foxp3 fate-mapping マウス(*Foxp3*-GFP-Cre × *ROSA26-loxP-Stop-loxP-YFP* マウス)を使用した。このマウスでは、一度でも *Foxp3* を発現した細胞は YFP で、現在も *Foxp3* を発現している細胞は GFP でラベルされるため、*Foxp3* の発現を消失した細胞(exFoxp3 細胞)を GFP⁻ YFP⁺の集団として生体内で追跡することが可能である⁴⁶。歯周炎を誘導した Foxp3 fate-mapping マウスの歯周組織及び頸部リンパ節を解析したところ、コントロールのマウスと比較して exFoxp3Th17 細胞(TCRβ⁺ CD4⁺ GFP⁻ YFP⁺ IL-17A⁺)の頻度及び細胞数が顕著に増加していることが明らかとなった(図 15 A)。試験管内で誘導した exFoxp3Th17 細胞を *Tcra*⁺ マウスに経静脈的に移入し、絹糸結紮による歯周炎を誘導したところ、生理食塩水や Th17 細胞を移入した群と比較し有意に骨破壊が促進していた(図 15 B)。歯周炎を誘導したマウスから回収した exFoxp3Th17 細胞は、Th17 細胞よりも有意に *Rorc*, *Il17a*, *Il17f*, *Tnfsf11*(RANKL)といったエフェクター分子の遺伝子発現が高く、細胞表面に膜型の RANKL を高発現していた(図 15 C,D)。

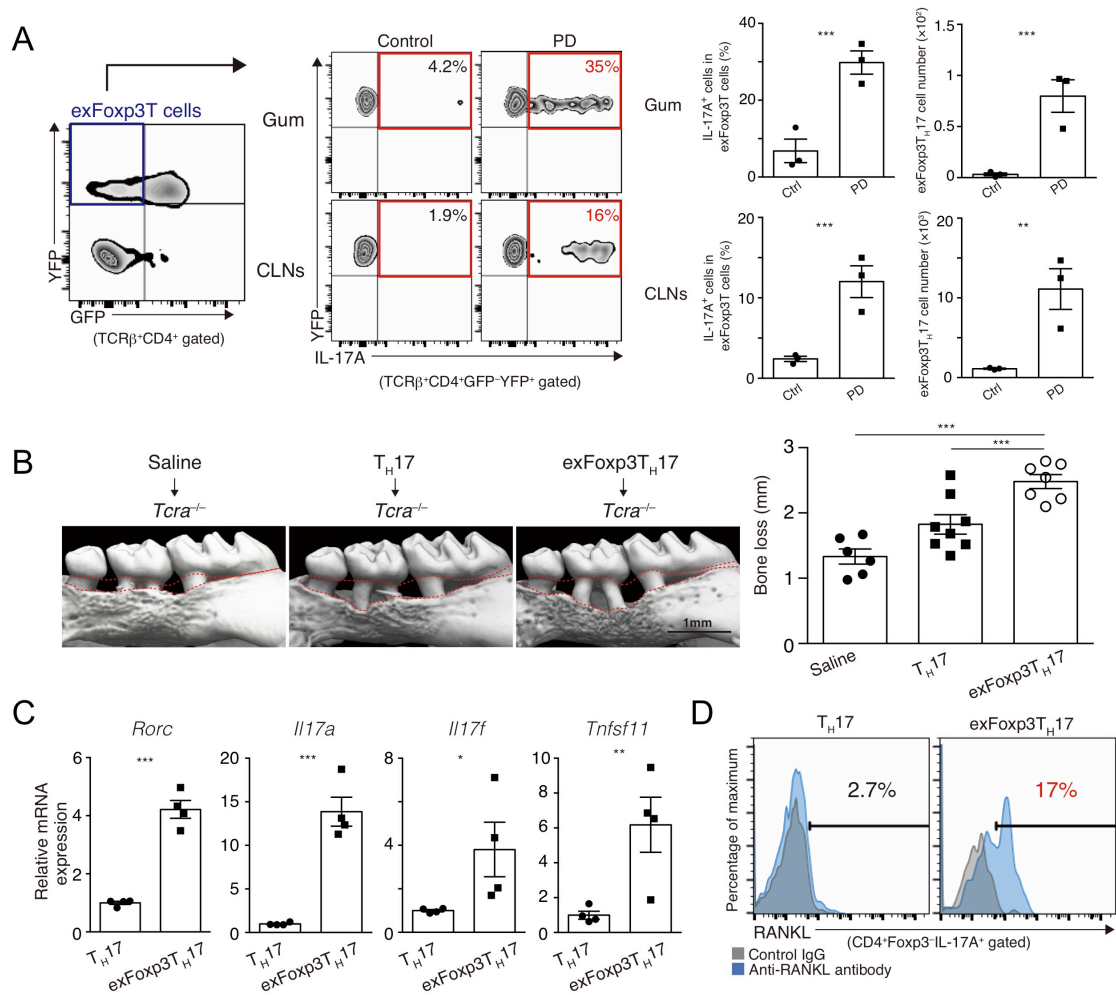


図 15 歯周炎において Foxp3 陽性 T 細胞は exFoxp3Th17 細胞へと分化転換する

A. コントロール (Control) 及び歯周炎を誘導したマウス(PD)の、歯周組織(Gum)と所属リンパ節(CLN)における exFoxp3Th17 細胞の頻度と細胞数。(n=3) B. 生理食塩水、Th17 細胞及び exFoxp3Th17 細胞を移入した *Tcra*^{-/-}マウスにおける歯周炎組織のマイクロCT 像とセメントエナメル境～歯槽骨頂距離。(n=6-8) C. Th17 細胞及び exFoxp3Th17 細胞における、*Rorc*, *Il17a*, *Il17f*, *Tnfsf11* の遺伝子発現。(n=4) D. Th17 細胞及び exFoxp3Th17 細胞における、細胞表面上の RANKL 発現。3回以上行った実験の中で、代表的なデータを示す。

3-5. 骨芽細胞と歯根膜細胞が産生する膜型 RANKL が歯槽骨吸収に必要である

exF_{oxp3}Th17 細胞は RANKL を高発現していたが (図 15 C, D)、T 細胞上の RANKL が、歯槽骨破壊にどの程度寄与しているかは不明である¹⁴⁴。前述のように、ヒト歯周炎組織の免疫染色の結果から、T 細胞と B 細胞が歯周炎における RANKL の主要な産生源であることが提唱されており¹⁰⁸、特に T 細胞と B 細胞が産生する可溶型の RANKL が重要であることが提唱されている¹⁴⁵。しかしながら、歯周炎における RANKL の供給源を示す生体レベルでの証拠はない。

RANKL は膜結合型タンパク質として細胞膜上に発現するが、TNF- α や Fas ligand (FasL)など他の TNF ファミリーの膜結合型タンパク質と同様にプロテアーゼによって切断されて可溶型に変化する⁸。膜型 RANKL はメタロプロテアーゼの MMP14 や ADAM10 によって切断され、可溶型 RANKL へと変換される^{22,146}。1988 年に Takahashi らが骨芽細胞と脾臓細胞との共存培養による破骨細胞分化培養系を確立した際、フィルターで骨芽細胞と脾臓細胞を分離すると破骨細胞が形成されなくなることを報告しており、RANKL は可溶型でなく主に膜結合型として機能する事が示唆された⁷。また Hikita らは、MMP14 欠損マウスでは骨芽細胞上の膜型 RANKL が増加するために破骨細胞が増加し、骨量が減少することを報告しており、膜結合型 RANKL の活性は可溶型 RANKL よりも強く、プロテアーゼによる RANKL の膜型から可溶型への変換は、生体において破骨細胞形成を負に制御することが示唆されている¹⁴⁶。

歯周組織において RANKL は骨芽細胞、骨細胞、歯根膜線維芽細胞、歯肉上皮細胞、T 細胞、B 細胞など様々な細胞が発現する事が報告されているが¹⁴⁴、例えば歯肉

上皮細胞は歯槽骨と近接していないため、RANKL を供給するためには可溶性 RANKL でなければ不可能である。

歯周炎の骨破壊において可溶性 RANKL と膜型 RANKL のどちらが重要かを検討するため、RANKL タンパク質の細胞外ドメインにあるプロテアーゼ認識配列が欠失した可溶性 RANKL 欠損マウス (*Tnfr1^{ΔS/ΔS}* マウス)¹²⁶ に歯周炎を誘導し解析したところ、可溶性 RANKL 欠損マウスは野生型マウスと同程度の骨破壊を起こす事が明らかとなった (図 16 A, B)。この事から、歯周炎の骨破壊では膜型 RANKL が重要な役割を担っており、RANKL 発現細胞は歯槽骨に近接していることが示唆された。In situ hybridization 法により歯周組織における RANKL の発現を解析したところ、骨表面に存在する骨芽細胞様細胞や、歯と骨の間に存在する歯根膜線維芽細胞様細胞、そして骨破壊部位の血球系細胞様細胞で RANKL が高く発現していた (図 16 C)。

次に、RANKL の主要な産生細胞を同定するために、RANKL を様々な細胞種 (B 細胞 : *Mb1-Cre*¹²⁸、T 細胞 : *CD4-Cre*¹³¹、骨芽細胞 : *Sp7-Cre*¹³⁴、歯根膜線維芽細胞 : *Scx-Cre*^{129,130}) で特異的に欠損したマウスを樹立し、歯周炎による骨破壊を検討した。骨芽細胞に関しては、*Sp7-Cre* で骨芽細胞特異的に RANKL を欠損したマウスでは歯が萌出しない事が報告されているため¹⁴⁷、ドキシサイクリン非存在下でのみ *Sp7-Cre* を発現するマウス (*Sp7-tTA-tetO-Cre*)¹³⁴ を解析に使用した。ドキシサイクリン存在下で RANKL flox マウスと *Sp7-tTA-tetO-Cre* マウスを交配し、歯の萌出後 (生後 3 週齢) にドキシサイクリン入り餌から普通餌に変更し、骨芽細胞特異的に RANKL を欠損したマウスを作成した。全ての細胞種特異的 RANKL 欠損マウスに関して、生後 8 週齢で歯周炎を誘導し 10 日後にマイクロ CT 及び TRAP 染色により骨破壊を解析した。その結果、RANKL

を骨芽細胞で欠損したマウスと、歯根膜線維芽細胞で欠損したマウスでは、歯周炎による骨破壊が顕著に抑制される事が明らかとなった（図 17）。RANKL を T 細胞で欠損したマウスでは部分的に骨破壊が抑制されたが、B 細胞で欠損したマウスでは有意な差は見られなかった（図 17）。以上の結果から、歯周組織における RANKL の主要な産生源は骨芽細胞および歯根膜線維芽細胞であることが明らかとなった。

過去の報告で、骨芽細胞や歯根膜線維芽細胞は IL-17 の刺激により RANKL 発現が誘導されることが示されていることから^{33,34,148}、exFoxp3Th17 細胞は膜型 RANKL を高発現するもののその寄与は部分的であり、主に IL-17 の産生を介して骨芽細胞と歯根膜線維芽細胞の膜型 RANKL 発現誘導を介し、骨破壊に寄与すると考えられる。

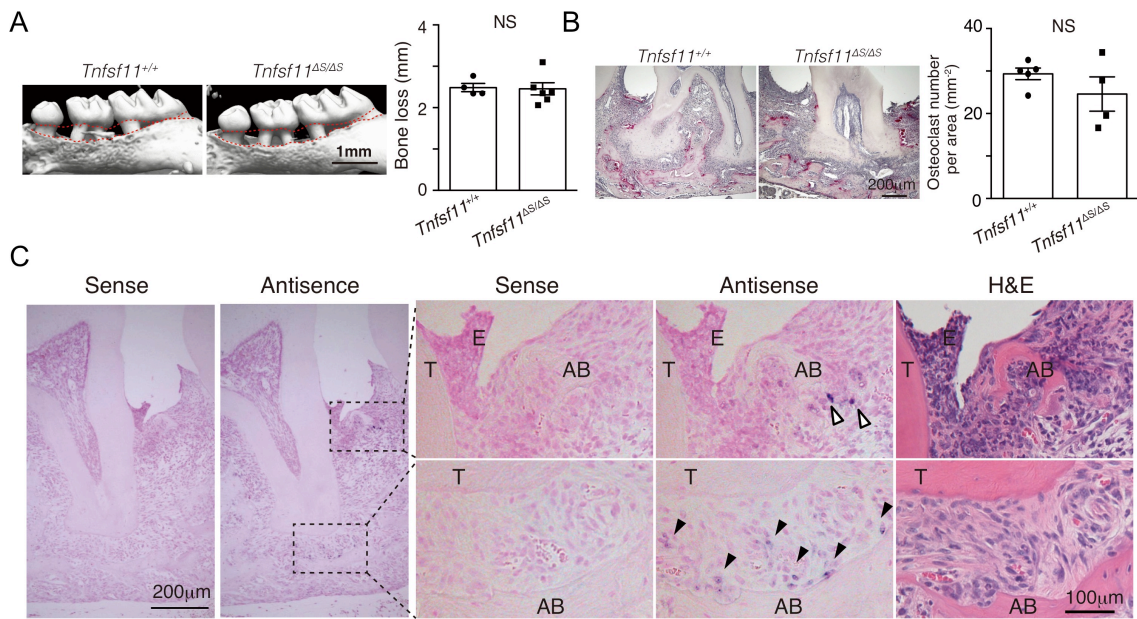


図 16 歯周炎の骨破壊において RANKL 産生細胞は歯槽骨に近接する

A. 野生型マウス及び *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスにおける歯周炎組織のマイクロ CT 像とセメントエナメル境～歯槽骨頂距離。(n=4-6) **B.** 野生型マウス及び *Tnfsf11*^{ΔS/ΔS} マウスにおける歯周炎組織の TRAP 染色像と破骨細胞数。(n=5-4) **C.** 野生型マウス歯周炎組織における RANKL mRNA 発現を *in situ hybridization* 法により解析した。白矢頭は RANKL 陽性の血球系様細胞を、黒矢頭は RANKL 陽性の間葉系様細胞を示す。3 回以上行った実験の中で、代表的なデータを示す。H&E: haematoxylin and eosin stain, T: tooth, E: epithelium, AB: alveolar bone.

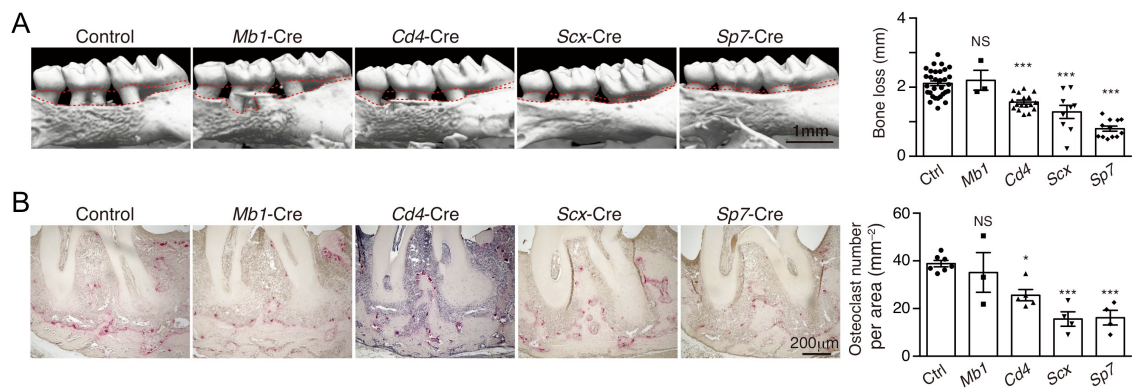


図 17 骨芽細胞と歯根膜線維芽細胞が歯周炎の骨破壊における RANKL の主な供給源である

A. コントロールマウス及び、RANKL を B 細胞(*Mb1-Cre*)、T 細胞(*CD4-Cre*)、骨芽細胞(*Sp7-Cre*)、歯根膜線維芽細胞(*Scx-Cre*)で特異的に欠損したマウスにおける歯周炎組織のマイクロ CT 像とセメントエナメル境～歯槽骨頂距離。(n=3-31) B. 上記マウスにおける歯周炎組織の TRAP 染色像と破骨細胞数。(n=3-7)

3-6. exF_{oxp3}Th17 細胞は抗菌免疫と骨破壊を誘導し口腔細菌感染を制御する

関節炎モデル⁴⁶や喘息モデル⁴³において、F_{oxp3} 陽性 T 細胞から exF_{oxp3}Th17 細胞への分化転換には、IL-6 が重要な役割を持つ事が報告されている。歯周炎組織でも IL-6 が高発現している事から (図 9)、次に私は歯周炎における IL-6 の機能について解析を行った。歯周炎を誘導して2日目の F_{oxp3} fate-mapping マウスに抗 IL-6 抗体を投与し、歯周組織及び頸部リンパ節を FACS により解析したところ、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して、抗 IL-6 抗体投与群では exF_{oxp3}Th17 細胞の細胞数及び割合が有意に減少しており、骨破壊も有意に抑制されていた (図 18 A, B)。IL-6 の欠損マウスでも、同様に歯周炎における骨破壊が有意に抑制された (図 18 C)。In situ hybridization 法により歯周炎組織における IL-6 の発現部位を解析したところ、歯根膜線維芽細胞で IL-6 が高発現していることが明らかとなった (図 18 D)。

次に私は、exF_{oxp3}Th17 の口腔細菌感染における役割を検討するために、IL-6 受容体の flox マウスと、F_{oxp3}-Cre マウスを掛け合わせ、*Il6ra^{flox}Foxp3-Cre* マウス (炎症が起きても F_{oxp3} 陽性細胞が exF_{oxp3}Th17 細胞へと分化転換しないマウス) を作製し、解析した。その結果、*Il6ra^{flox}Foxp3-Cre* マウスでは *Il17a⁺Il17f⁺* マウスと同様に、歯周炎における骨破壊が有意に抑制される一方で、口腔細菌の量が増加することが明らかとなった (図 19 A-C)。*Il6ra^{flox}Foxp3-Cre* マウスの歯周炎組織では、IL-17A や RANKL の発現に加え、腸管上皮において IL-17 の下流として報告されている抗菌ペプチド (*Defb1, Defb4*) 及び好中球遊走因子 (*Cxcl1, Cxcl2*) の発現が有意に低下していた (図 19 D)。さらに、*Il6ra^{flox}Foxp3-Cre* マウスではコントロールと比較して歯周炎における口腔細菌の組成が有意に変化していた (図 19 E, F)。以上から、exF_{oxp3}Th17 細胞は IL-17 を産生し、骨破壊

を誘導することで感染源である歯の脱落を促すと同時に、口腔粘膜上皮の抗菌ペプチドや好中球遊走因子の発現を惹起し、口腔細菌を量・質的に制御することが示唆された(図20)。

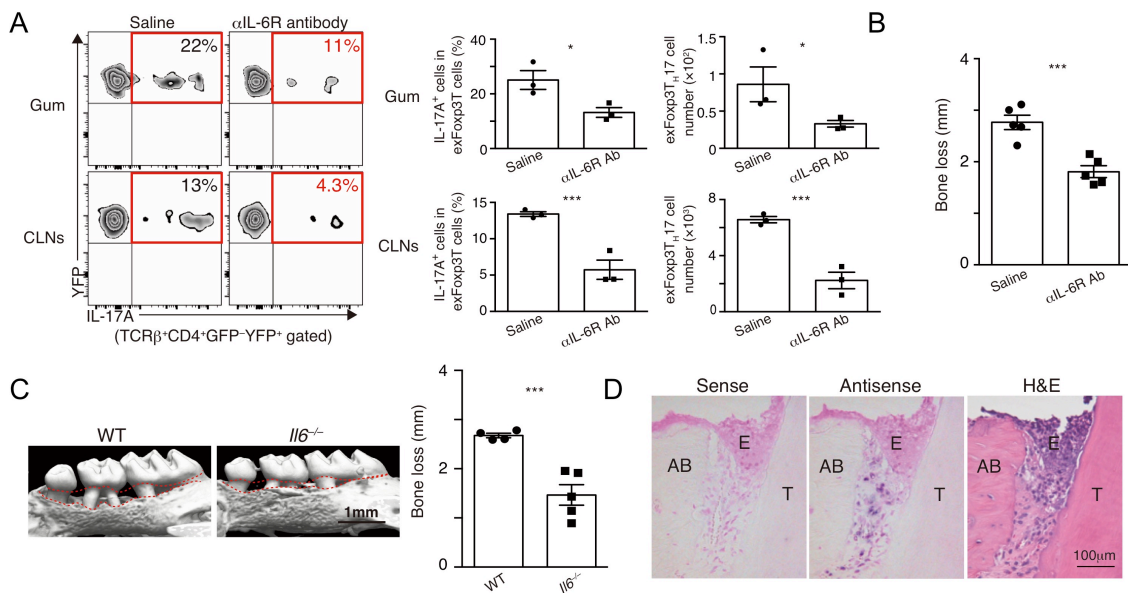


図 18 歯周炎組織において歯根膜線維芽細胞が産生する IL-6 が Fcp3 陽性 T 細胞を exFcp3Th17 細胞へと分化転換させる

A. 生理食塩水(Saline)及び抗 IL-6 抗体(α IL-6R antibody 2mg)を、絹糸結紮後 2 日目に腹腔内投与し、7 日目に歯周組織(Gum)及び所属リンパ節(CLN)における exFcp3Th17 細胞の頻度と細胞数を解析した。(n=3) **B.** 生理食塩水(Saline)及び抗 IL-6 抗体(α IL-6R antibody 2mg)を、絹糸結紮後 2 日目に腹腔内投与し、10 日目にセメントエナメル境～歯槽骨頂距離を解析した。(n=5) **C.** 野生型マウス及び *Il6*^{-/-}マウスにおける歯周炎組織のマイクロ CT 像とセメントエナメル境～歯槽骨頂距離。(n=4-5) **D.** 野生型マウス歯周炎組織における IL-6 mRNA 発現を *in situ hybridization* 法により解析した。3 回以上行った実験の中で、代表的なデータを示す。H&E : haematoxylin and eosin stain, T : tooth, E : epithelium, AB : alveolar bone.

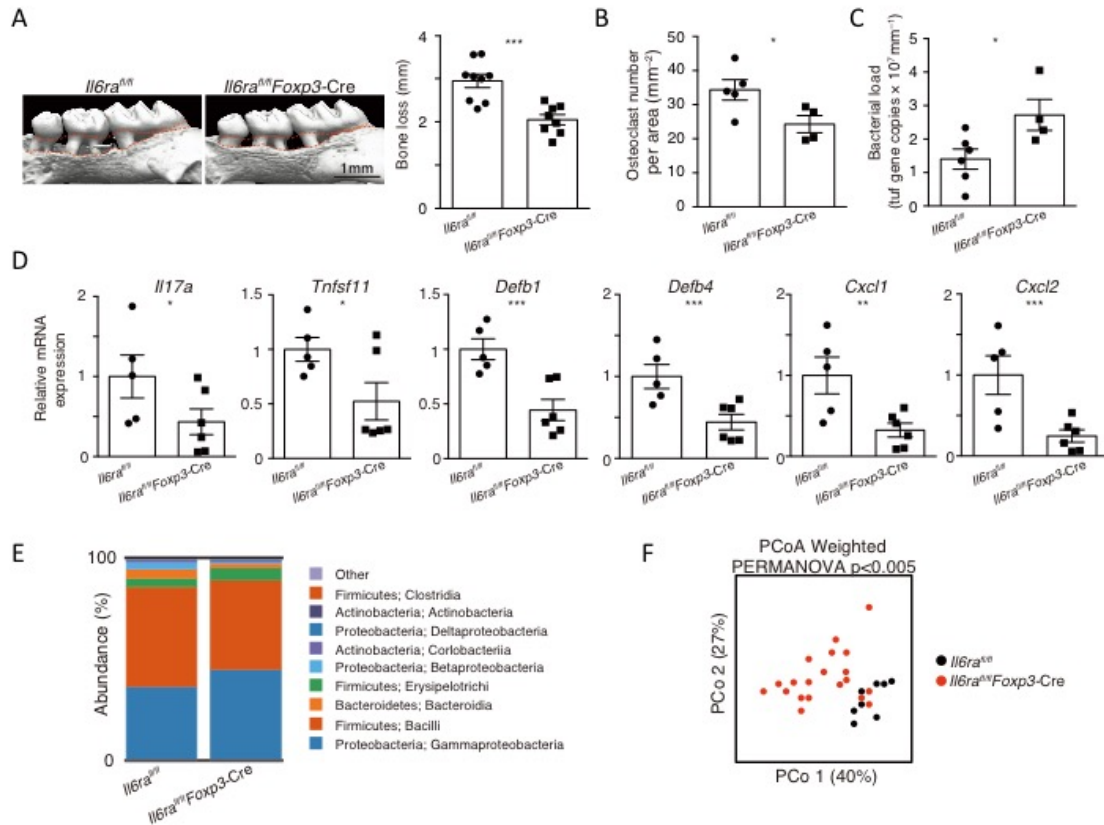


図 19 exFxp3Th17 細胞は抗菌免疫と骨破壊を誘導し口腔細菌感染を制御する

A. *Il6ra^{fl/fl}* マウス及び *Il6ra^{fl/fl}Fxp3-Cre* マウスにおける歯周炎組織のマイクロ CT 像とセメントエナメル境～歯槽骨頂距離。(n=8-9) **B.** *Il6ra^{fl/fl}* マウス及び *Il6ra^{fl/fl}Fxp3-Cre* マウスにおける歯周炎組織の破骨細胞数。(n=4-5) **C.** *Il6ra^{fl/fl}* マウス及び *Il6ra^{fl/fl}Fxp3-Cre* マウスに 10 日間結紮した絹糸から細菌 DNA を回収し、qPCR 法により菌 DNA の総量を解析した。(n=4-6) **D.** *Il6ra^{fl/fl}* マウス及び *Il6ra^{fl/fl}Fxp3-Cre* マウスの歯周炎組織における、*Il17a*, *Tnfsf11*, *Defb1*, *Defb4*, *Cxcl1*, *Cxcl2* の遺伝子発現。(n=5-6) **E.** *Il6ra^{fl/fl}* マウス及び *Il6ra^{fl/fl}Fxp3-Cre* マウスに 10 日間結紮した絹糸から細菌 DNA を回収し、16S シーケンス法により菌の組成 (門 (phylum) および綱 (class)) を定量解析した。(n=8-20) **F.** 絹糸に蓄積した口腔細菌叢の違いを主成分分析法 (PCoA) にて解析。統計学的検定は permutational ANOVA (PERMANOVA) 法を用いて行なった。(n=8-20)

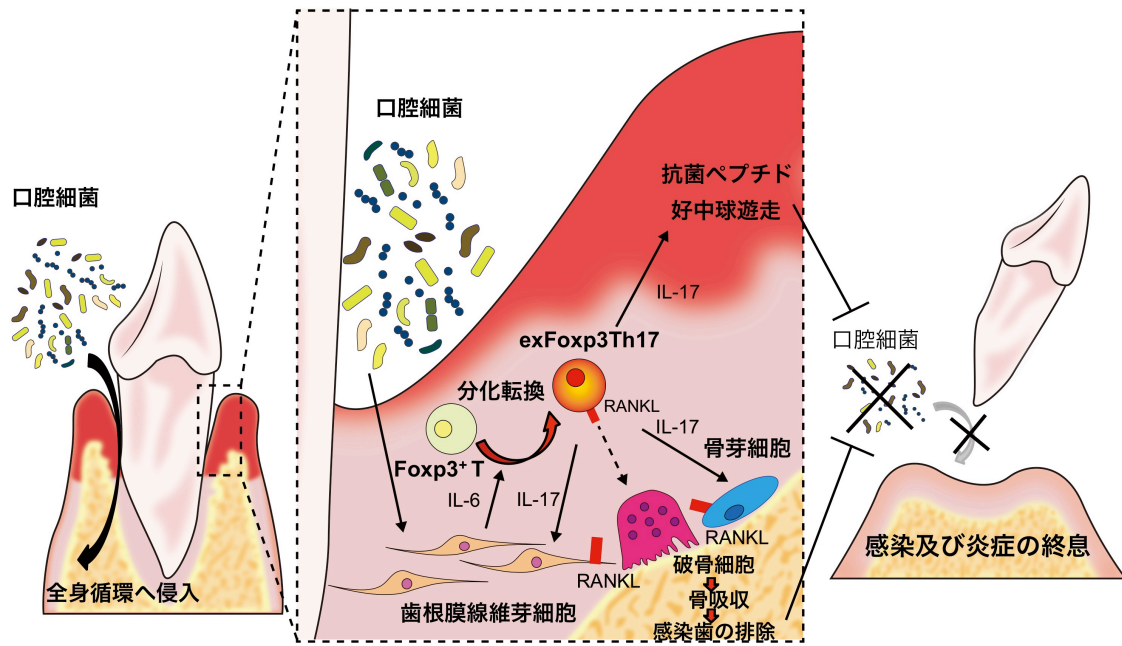


図20 骨破壊性 T 細胞による口腔細菌感染制御機構の図式モデル

歯周炎により破綻した上皮バリアから口腔細菌は血流に侵入し、遠隔臓器へと波及する。歯周炎組織では口腔細菌感染に応答して歯根膜線維芽細胞が IL-6 を産生し、Foxp3 陽性 T 細胞を exFoxp3Th17 細胞へと分化転換させる。exFoxp3Th17 細胞は IL-17 の産生を介して歯肉上皮の好中球遊走因子や抗菌ペプチドの発現を誘導することで、口腔細菌を量的・質的に制御する。更に、歯根膜線維芽細胞と骨芽細胞に膜型 RANKL の発現を誘導することで破骨細胞形成を促進し、歯槽骨吸収による感染歯の脱落を促す。感染歯の脱落后、口腔粘膜の治癒に伴い上皮バリアは回復し、感染及び炎症は終息する。

第四章 考察

4-1. 歯周炎における炎症性骨破壊のメカニズム

歯周炎に伴う炎症性骨破壊において、免疫系が必須の役割を持つことは示唆されていたが、その詳細な機序は長い間不明であった。私は、口腔細菌感染に応答して歯根膜線維芽細胞が IL-6 を産生し、本来炎症及び骨破壊を抑える役割を持つ Foxp3 陽性 T 細胞を exFoxp3Th17 細胞へと分化転換させること、歯周炎組織に集積した exFoxp3Th17 細胞及び Th17 細胞は IL-17 を産生し、歯根膜線維芽細胞と骨芽細胞上に膜型 RANKL 発現を誘導することで、骨破壊を引き起こすことを明らかにした(図 19)。マウス 1 匹から回収した歯周炎組織において、Th17 細胞の総数 1142 ± 178 (図 11A) に対し、exFoxp3Th17 細胞の数は 80 ± 16 (図 15A) であり、Th17 細胞のうち Foxp3 陽性 T 細胞に由来するものの割合は約 7% と少数であるが、exFoxp3Th17 細胞はナイーブ由来の Th17 よりも IL-17A の遺伝子発現が約 14 倍高く (図 15C)、exFoxp3Th17 細胞を特異的に除去した *Il6ra^{fl/fl}Foxp3-Cre* マウスでも歯周炎に伴う骨破壊の抑制と口腔細菌の増加が観察されたことから、exFoxp3Th17 細胞は歯周炎の病態において量的ではなく質的に重要なサブセットであると考えられる。口腔細菌感染が歯根膜線維芽細胞の IL-6 産生を誘導するメカニズムは不明だが、様々な細菌の PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern molecules) が歯根膜線維芽細胞の IL-6 発現を誘導することが報告されており、口腔細菌の構成成分が歯根膜線維芽細胞の自然免疫受容体を介して IL-6 の産生を誘導する可能性が考えられる。^{149, 150, 151, 152, 153}

4-2. 炎症性骨破壊の意義

歯周炎における歯槽骨破壊において、破骨細胞がその実行役であるならば、破骨細胞を標的とした薬剤は歯周炎の治療薬になり得るであろうか。骨粗鬆症やがんの骨転移の治療薬として、破骨細胞を標的としたビスフォスフォネート製剤 (BP 製剤) や抗 RANKL 抗体が臨床で広く使用されており、抗 RANKL 抗体は関節リウマチの炎症性骨破壊にも有効であることが近年の臨床試験によって示されている¹⁵⁴。BP 製剤や抗 RANKL 抗体の最も重篤な副作用の一つとして、顎骨壊死が知られている¹⁵⁵。抜歯が顎骨壊死の大きなリスクファクターであることがよく知られているが、抜歯の既往がない患者でも顎骨壊死は発症すること¹⁵⁵、口腔衛生不良や歯周炎がリスクファクターであること¹⁵⁵、動物実験においては、歯周炎モデルと BP 製剤または抗 RANKL 抗体の投与を組み合わせることで顎骨壊死が発症すること^{156,157}から、抜歯そのものがリスクではなく、口腔細菌の顎骨への感染が重要な役割を持つと考えられており、壊死が顎骨特異的に生じる理由として、口腔細菌の存在が示唆されている^{155,158}。

先天的な破骨細胞の機能不全である大理石骨病の患者が歯周炎を発症した場合には、重篤な顎骨骨髓炎を発症することが報告されている¹⁵⁹。重度な炎症下においても顎骨は吸収されないため、歯は顎骨に残存する。感染源である歯の抜歯と抗生剤の投与により抜歯窩は粘膜により被覆され、口腔細菌の顎骨への感染路は断たれ、最終的に骨髓炎は寛解する¹⁵⁹。このように、破骨細胞の機能不全や破骨細胞を標的とした治療の副作用として、口腔細菌による骨髓炎や壊死が生じることから、炎症性骨破壊は単なる炎症の副次的効果ではなく、口腔細菌感染への生体防御機構としての役割を持つ可能性が示唆される。

哺乳類にとって、歯は食事や戦闘に必須の臓器であるため、「感染から体を守

るために免疫系が骨を破壊して歯を脱落させる」という概念は、一見合理性を欠くように思える。感染の持続と歯の脱落は、脊椎動物の進化上どちらがより不利益だったであろうか？ 上述のように、口腔粘膜を貫通し植立している歯の周囲は上皮の連続性が破綻しているため、多くの動物において感染に脆弱なバリア部位である。哺乳類以外の脊椎動物の多くは多生歯性（歯が生涯に何度も生え変わる）であり、トカゲなどの爬虫類でも重篤な歯周炎に伴う骨吸収が観察され、歯周感染の持続はしばし致命的であることが報告されている¹⁶⁰。爬虫類の中でも、歯の生え変わりのスピードが速いものは歯周炎に罹患しにくいものの、生え変わりの頻度が減少したカメレオンやアガマ科のトカゲでは歯周炎の罹患率が高いことが報告されており、同一歯牙が長期間口腔内に残存することで歯周感染のリスクが上昇することが示唆されている¹⁶⁰。また、古生代ペルム紀の、歯の生え変わり速度が緩慢な多生歯性爬虫類の化石からも、歯原性感染に起因する骨破壊及び歯の脱落の証拠が報告されている¹⁶¹。IL-17 や RANKL 遺伝子は有顎魚類からヒトまで幅広く保存されていることも鑑みれば¹⁶²、炎症性骨破壊による感染歯牙の排除は、歯牙が代替可能であった種から進化の過程で保存されてきた原始的な感染防御機構であり、免疫の活性化が骨破壊を誘導するようになった起源は、口腔細菌への宿主応答に端を発する可能性が考えられるのではないだろうか。

ヒトの場合、若齢で発症する侵襲性歯周炎や遺伝疾患に伴う歯周炎を除き、多くの歯周炎（慢性歯周炎）において加齢がリスク要因であり、歯周炎は高齢者で特に罹患率が高い疾患である⁶⁵。生殖年齢を過ぎた後に発症する疾患に関しては直接的な自然選択圧がかからないため、「歯周炎に伴う細菌感染から体を守るため、抗菌免疫系は骨破壊を誘導するように進化した」という仮説は、ダーウィンの進化論とは矛盾するように

も思える。しかしヒトやシャチといった一部の例外を除き、自然界では繁殖年齢を過ぎても生存する生物は稀であり¹⁶³、上述の爬虫類など基本的に寿命の直前まで繁殖が可能な生物においても、歯周感染に伴う歯の脱落や重篤な歯周感染に起因する死亡症例が認められることから^{160,161}、歯周炎に対する生体防御機構が自然選択圧の影響を受け保存されてきた可能性は否定できない。

では仮にもし全ての脊椎動物において、歯周炎が繁殖可能年齢を過ぎた後に発症する疾患であった場合には、この仮説はダーウィン論によって否定されるであろうか？ヒトを含む一部の生物が繁殖年齢を過ぎた後も長期間生存するという事実は、自然選択説の大きなパラドックスとして知られる。繁殖年齢を過ぎた生物が長生きする機序が進化上保存されることを説明する有力な仮説の一つとして、繁殖能力を失った老齢の個体が育児などに協力することにより、孫の出生率や生存率を上昇させることで、自身の遺伝子が保存される確率が高まるという説が提唱されており、ヒトの場合は祖母が長寿であるほど孫の数が多いこと¹⁶⁴や、シャチにおいては繁殖年齢を過ぎた母親が群れのリーダーシップをとること、繁殖年齢を過ぎても母親が生存した方が、子供の生存率が上昇することが報告されている^{163,165}。このように、社会性を持ち協力しあうような生物に関しては、繁殖年齢を過ぎた後の形質も間接的な選択圧によって保存される可能性が示唆されており、たとえすべての生物において歯周炎が加齢性疾患であったとしても、その生体防御機構が進化の過程で保存される可能性は否定できない。以上はあくまで仮説であり実証は困難であるが、免疫の活性化に付随する骨破壊の起源に関する考察は、歯周病だけでなく関節リウマチやがんの骨転移など他の炎症性骨疾患の病態の理解を目指す上でも、重要な知見を提供すると考えられる。

4-3. 今後の展望

歯科的介入によって感染が制御できる現代においては、抜歯ではなく保存的歯科治療が口腔細菌感染制御における第一選択であることは言うまでもない¹⁶⁶。序文で述べたように、ヒト歯周炎組織には IL-17 陽性 CD4 陽性の T 細胞が集積していることや、歯周炎患者では健常者と比較して歯周組織における IL-17、IL-6、RANKL の発現が高いことが報告されている^{60, 61, 62, 63, 64}。更に、関節リウマチと歯周炎を併発した患者に対する臨床研究では、抗 IL-6 抗体の投与により歯周炎が改善したとの報告もなされている¹⁶⁷。興味深いことに、重度歯周炎により抜歯の適応となった患歯の周囲組織からのみ、IL-17 と Foxp3 両陽性の細胞が検出されることが報告されている⁶³。この IL-17 陽性 Foxp3 陽性の集団は、Foxp3 陽性 T 細胞から exFoxp3Th17 細胞へと分化転換する途中の細胞と考えられるため、IL-6 による Foxp3 陽性 T 細胞から exFoxp3Th17 細胞への分化転換は、ヒト歯周炎においても重要な役割を持つ可能性が考えられる。

LAD-1(leukocyte adhesion deficiency-1: 白血球接着不全症 1 型)の患者では、プラークコントロールが良好な患者においても、重篤な歯周炎及び歯槽骨吸収が生じることが知られている¹⁶⁸。LAD-1 患者では好中球の血管外への遊走機能が欠損しており、歯周組織において代償的に Th17 細胞が異常に増殖・活性化することが、重篤な炎症及び骨破壊のメカニズムであることが示唆されている¹⁶⁸。Moutsopoulos らは、LAD-1 患者の歯周組織では、IL-17 の遺伝子発現が慢性歯周炎患者と比較して約 10 倍、健常人と比較して約 100 倍も上昇していること、IL-17 の主な産生源は Th17 細胞であることを見出し、Th17 細胞分化の上流に位置する IL-23 の p40 サブユニットに対する抗体である ustekinumab の投与により、LAD-1 患者の歯周炎が改善することを、2017 年に The New

England Journal of Medicine 誌に報告した¹⁶⁹。我々の研究を含めたこれら一連の報告は、適切な口腔細菌のコントロールと、Th17 型免疫応答制御の組み合わせにより、歯周炎に伴う炎症性骨破壊を効果的に制御できる可能性を示唆しており、今後の更なる発展が期待される。

腸管粘膜、皮膚、結膜では、細菌依存的に IL-17 産生型の免疫細胞が誘導され、細菌によって腸管粘膜で誘導された Th17 細胞は、遠隔臓器の疾患にも影響することが示唆されている。^{54 55 56,57,58}。口腔粘膜に関しては、Th17 細胞は口腔細菌に依存せず加齢に伴い誘導されることが提唱されていたが^{59,170,171}、本研究で私は、歯周炎において Th17 細胞は口腔細菌依存的に口腔粘膜に集積することを見出した (図 11)。口腔細菌の dysbiosis が Th17 細胞を誘導する詳細なメカニズムの解明が今後重要な課題と考えられる。また、歯周病と関節リウマチとの関連性は、Hippocrates や Oral sepsis、病巣感染説の時代から現在に至るまで、様々な報告により支持されてきた。両者の間を繋ぐメカニズムに関しては、関節リウマチ患者の滑液から Pg.菌を含む歯周病関連細菌が検出されるといった知見から^{76,172,173}、口腔細菌が血流を介して直接的に関節滑膜に到達し、炎症を増悪させる可能性や、Pg.菌が口腔粘膜でシトルリン化タンパクを産生し、抗シトルリン化タンパク抗体の産生に寄与する可能性など⁶⁶、様々な経路が提唱されてきたが、依然として統一した見解は得られていない⁶⁶。近年の大規模な臨床研究の報告では、関節リウマチと歯周病の有病率及び口腔細菌叢の変化には有意な関連がある一方で、Pg.菌の有無と関節リウマチの発症には相関がないことが報告されており^{174,175}、未知の口腔細菌が未知のメカニズムで関節リウマチの発症や増悪に影響を与える可能性が示唆されている。

これまでの口腔細菌学は、P.g.菌など培養が容易かつ歯科疾患に関与すると考えられている少数の菌種のみが集中して研究され、その他多くの常在菌の性質や、全身の健康及び疾患における役割については殆んど検討されてこなかった。口腔細菌は他のバリア部位に生息する常在菌とは異なり、微細な刺激によって容易に血流に侵入するという特徴を有する。歯の萌出や日常の歯口清掃に伴う生理的な口腔細菌の流入や、歯周炎に伴う病的な口腔細菌の流入の持続が、宿主にどのような影響を及ぼすのかは未だ不明である。今後、口腔というユニークなバリア部位を舞台に、口腔細菌の宿主恒常性及び疾患における新たな役割を解明していくことが、生命体における宿主菌叢相互関係の理解を進める新しい知見をもたらすことが期待される。

第五章 結論

本研究を通じて私は、口腔細菌感染に応答して骨破壊性T細胞が歯周粘膜に集積し、抗菌免疫を惹起すると同時に破骨細胞による歯の支持骨吸収を誘導することで、口腔細菌感染の制御を司ることを見出した。本研究は、歯周炎に伴う骨破壊の新規制御法確立に向けた分子基盤を提供するのみならず、これまで単に病的現象として捉えられてきた炎症性骨破壊の感染防御における本来の役割を提唱し、関節リウマチや癌の骨転移を含む他の炎症性骨疾患のメカニズムの理解にも繋がる新しい知見を提供すると期待される。

引用文献

1. Suda, T. *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* **20**, 345-357 (1999).
2. Takayanagi, H. New developments in osteoimmunology. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 684-689 (2012).
3. Okamoto, K. *et al.* Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol Rev* **97**, 1295-1349 (2017).
4. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* **7**, 292-304 (2007).
5. Horton, J.E., Raisz, L.G., Simmons, H.A., Oppenheim, J.J. & Mergenhagen, S.E. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science* **177**, 793-795 (1972).
6. Dewhirst, F.E., Stashenko, P.P., Mole, J.E. & Tsurumachi, T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol* **135**, 2562-2568 (1985).
7. Takahashi, N. *et al.* Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123**, 2600-2602 (1988).
8. Yasuda, H. *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3597-3602 (1998).
9. Lacey, D.L. *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-176 (1998).
10. Wong, B.R. *et al.* TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* **272**, 25190-25194 (1997).
11. Anderson, D.M. *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175-179 (1997).
12. Kong, Y.Y. *et al.* OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-323 (1999).
13. Li, J. *et al.* RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls

- osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1566-1571 (2000).
14. Dougall, W.C. *et al.* RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* **13**, 2412-2424 (1999).
 15. Sobacchi, C. *et al.* Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat Genet* **39**, 960-962 (2007).
 16. Guerrini, M.M. *et al.* Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. *Am J Hum Genet* **83**, 64-76 (2008).
 17. 塚崎 雅之 高柳 広 RANKL-RANK-OPG システムによる破骨細胞分化と制御. *O.l.i.v.e.—骨代謝と生活習慣病の連関—* **4**, 70-72 (2014)
 18. Takayanagi, H. *et al.* A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 279-286 (1997).
 19. Takayanagi, H. *et al.* Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 259-269 (2000).
 20. Pettit, A.R. *et al.* TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* **159**, 1689-1699 (2001).
 21. Redlich, K. *et al.* Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest* **110**, 1419-1427 (2002).
 22. Nakashima, T., Hayashi, M. & Takayanagi, H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* **23**, 582-590 (2012).
 23. Tanaka, S. RANKL-Independent Osteoclastogenesis: A Long-Standing Controversy. *J Bone Miner Res* **32**, 431-433 (2017).
 24. Tsukasaki, M. *et al.* LOX Fails to Substitute for RANKL in Osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* **32**, 434-439 (2017).
 25. Kong, Y.Y. *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402**, 304-309 (1999).
 26. Takayanagi, H. *et al.* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* **408**, 600-605 (2000).

27. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-2357 (1986).
28. Harrington, L.E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-1132 (2005).
29. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-1141 (2005).
30. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
31. Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-336 (2003).
32. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A. & Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* **4**, 337-342 (2003).
33. Sato, K. *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* **203**, 2673-2682 (2006).
34. Kotake, S. *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* **103**, 1345-1352 (1999).
35. Zaiss, M.M. *et al.* Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum* **56**, 4104-4112 (2007).
36. Bozec, A. *et al.* T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Sci Transl Med* **6**, 235ra260 (2014).
37. Zaiss, M.M. *et al.* Increased bone density and resistance to ovariectomy-induced bone loss in FoxP3-transgenic mice based on impaired osteoclast differentiation. *Arthritis Rheum* **62**, 2328-2338 (2010).
38. DuPage, M. & Bluestone, J.A. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol* **16**, 149-163 (2016).
39. Hirota, K. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* **12**, 255-263 (2011).

40. Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221-225 (2015).
41. Bailey-Bucktrout, S.L. *et al.* Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response. *Immunity* **39**, 949-962 (2013).
42. Zhou, X. *et al.* Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* **10**, 1000-1007 (2009).
43. Massoud, A.H. *et al.* An asthma-associated IL4R variant exacerbates airway inflammation by promoting conversion of regulatory T cells to TH17-like cells. *Nat Med* **22**, 1013-1022 (2016).
44. Downs-Canner, S. *et al.* Suppressive IL-17A(+)Foxp3(+) and ex-Th17 IL-17A(neg)Foxp3(+) Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nat Commun* **8**, 14649 (2017).
45. Pelly, V.S. *et al.* Interleukin 4 promotes the development of ex-Foxp3 Th2 cells during immunity to intestinal helminths. *J Exp Med* **214**, 1809-1826 (2017).
46. Komatsu, N. *et al.* Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* **20**, 62-68 (2014).
47. Danks, L. *et al.* RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis* **75**, 1187-1195 (2016).
48. Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakae, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* **34**, 149-162 (2011).
49. Ishigame, H. *et al.* Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoc epithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* **30**, 108-119 (2009).
50. Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 799-809 (2009).
51. Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K. & Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220-230 (2012).
52. Round, J.L. & Mazmanian, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 313-323 (2009).
53. Ivanov, I.I. *et al.* Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper

- cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* **4**, 337-349 (2008).
54. Ivanov, I.I. *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-498 (2009).
 55. Wu, H.J. *et al.* Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* **32**, 815-827 (2010).
 56. Lee, Y.K., Menezes, J.S., Umesaki, Y. & Mazmanian, S.K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**, 4615-4622 (2011).
 57. Naik, S. *et al.* Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* **520**, 104-108 (2015).
 58. Reyes, N.J. & Saban, D.R. A Commencement for Eye Commensals. *Immunity* **47**, 6-8 (2017).
 59. Dutzan, N. *et al.* On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity* **46**, 133-147 (2017).
 60. Cardoso, C.R. *et al.* Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* **24**, 1-6 (2009).
 61. Dutzan, N., Konkel, J.E., Greenwell-Wild, T. & Moutsopoulos, N.M. Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunol* **9**, 1163-1172 (2016).
 62. Ohshima, H. *et al.* The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res* **88**, 633-638 (2009).
 63. Okui, T., Aoki, Y., Ito, H., Honda, T. & Yamazaki, K. The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. *J Dent Res* **91**, 574-579 (2012).
 64. Vernal, R. *et al.* Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **32**, 383-389 (2005).
 65. Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S. & Johnson, N.W. Periodontal diseases. *Lancet* **366**, 1809-1820 (2005).
 66. Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic

- inflammation. *Nat Rev Immunol* **15**, 30-44 (2015).
67. Rosier, B.T., De Jager, M., Zaura, E. & Krom, B.P. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 92 (2014).
 68. Wade, W.G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* **69**, 137-143 (2013).
 69. Consortium, H.M.P. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207-214 (2012).
 70. Abusleme, L. *et al.* The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* **7**, 1016-1025 (2013).
 71. Griffen, A.L. *et al.* Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J* **6**, 1176-1185 (2012).
 72. Squier, C.A. & Kremer, M.J. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 7-15 (2001).
 73. Bosshardt, D.D. & Lang, N.P. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res* **84**, 9-20 (2005).
 74. Eke, P.I. *et al.* Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* **86**, 611-622 (2015).
 75. Eke, P.I. *et al.* Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* **91**, 914-920 (2012).
 76. Han, Y.W. & Wang, X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res* **92**, 485-491 (2013).
 77. Olsen, I. Update on bacteraemia related to dental procedures. *Transfus Apher Sci* **39**, 173-178 (2008).
 78. Parahitiyawa, N.B., Jin, L.J., Leung, W.K., Yam, W.C. & Samaranayake, L.P. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev* **22**, 46-64, Table of Contents (2009).
 79. Forner, L., Larsen, T., Kilian, M. & Holmstrup, P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* **33**, 401-407 (2006).

80. Lockhart, P.B. *et al.* Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation* **117**, 3118-3125 (2008).
81. Carroll, G.C. & Sebor, R.J. Dental flossing and its relationship to transient bacteremia. *J Periodontol* **51**, 691-692 (1980).
82. Crasta, K. *et al.* Bacteraemia due to flossing: a cohort study. *Ann R Australas Coll Dent Surg* **19**, 175 (2008).
83. Crasta, K. *et al.* Bacteraemia due to dental flossing. *J Clin Periodontol* **36**, 323-332 (2009).
84. Kinane, D.F., Riggio, M.P., Walker, K.F., MacKenzie, D. & Shearer, B. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol* **32**, 708-713 (2005).
85. Gold, S.I. Periodontics. The past. Part (I). Early sources. *J Clin Periodontol* **12**, 79-97 (1985).
86. O'Reilly, P.G. & Claffey, N.M. A history of oral sepsis as a cause of disease. *Periodontol 2000* **23**, 13-18 (2000).
87. Kumar, P.S. From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. *J Physiol* **595**, 465-476 (2017).
88. Charles, M.H. Focal infection of dental origin. *Dental Cosmos*; pp. 1206-1208. (1922).
89. Benjamin, R. An account of the cure of several diseases by the extraction of decayed teeth. (1818).
90. Miller, W.D. *The Micro-Organisms of the Human Mouth.* (1890).
91. Miller, W.D. The human mouth as a focus of infection. *The Lancet* **138**, 340-342 (1891).
92. Pizzo, G., Guiglia, R., Lo Russo, L. & Campisi, G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *Eur J Intern Med* **21**, 496-502 (2010).
93. Hunter, W. Oral sepsis as a cause of disease. *Br Med J* **2**, 215-216 (1900).
94. Hunter, W. An address on the role of sepsis and antisepsis in medicine. *The Lancet* **177**, 79-86 (1910).
95. Billings, F. Chronic focal infections and their etiologic relations to arthritis and nephritis.

Arch Intern Med **4**, 484–498 (1912)

96. Cecil, R.L. Clinical and experimental observations on focal infection, with an analysis of 200 cases of rheumatoid arthritis *Ann Intern Med* 577-584 (1938).
97. Vaizey, J.M. Dental sepsis in relation to anaemia, dyspepsia, and rheumatism with particular reference to treatment *Br Med J* 1269-1283 (1939).
98. Editorial. Focal infection. *J Am Med Assoc.* pp. 490-491 (1952).
99. Mattila, K.J. *et al.* Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ* **298**, 779-781 (1989).
100. Tonetti, M.S. *et al.* Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* **356**, 911-920 (2007).
101. Genco, R.J. & Van Dyke, T.E. Prevention: Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nat Rev Cardiol* **7**, 479-480 (2010).
102. Mylonakis, E. & Calderwood, S.B. Infective endocarditis in adults. *N Engl J Med* **345**, 1318-1330 (2001).
103. Wilson, W. *et al.* Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation* **116**, 1736-1754 (2007).
104. Dayer, M.J. *et al.* Incidence of infective endocarditis in England, 2000-13: a secular trend, interrupted time-series analysis. *Lancet* **385**, 1219-1228 (2015).
105. Thornhill, M.H. *et al.* A change in the NICE guidelines on antibiotic prophylaxis. *Br Dent J* **221**, 112-114 (2016).
106. Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. & Kent, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**, 134-144 (1998).
107. Page, R.C. & Schroeder, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* **34**, 235-249 (1976).
108. Kawai, T. *et al.* B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone

- resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* **169**, 987-998 (2006).
109. Harada, Y. *et al.* Effect of adoptive transfer of antigen-specific B cells on periodontal bone resorption. *J Periodontal Res* **41**, 101-107 (2006).
 110. Han, X., Kawai, T., Eastcott, J.W. & Taubman, M.A. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol* **176**, 625-631 (2006).
 111. Oliver-Bell, J. *et al.* Periodontitis in the absence of B cells and specific anti-bacterial antibody. *Mol Oral Microbiol* **30**, 160-169 (2015).
 112. Abe, T. *et al.* The B Cell-Stimulatory Cytokines BLyS and APRIL Are Elevated in Human Periodontitis and Are Required for B Cell-Dependent Bone Loss in Experimental Murine Periodontitis. *J Immunol* **195**, 1427-1435 (2015).
 113. Zhu, M. *et al.* B cells promote obesity-associated periodontitis and oral pathogen-associated inflammation. *J Leukoc Biol* **96**, 349-357 (2014).
 114. Graves, D.T., Fine, D., Teng, Y.T., Van Dyke, T.E. & Hajishengallis, G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **35**, 89-105 (2008).
 115. Hajishengallis, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol* **35**, 3-11 (2014).
 116. Hajishengallis, G. & Korostoff, J.M. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40+ years later. *Periodontol 2000* **75**, 116-151 (2017).
 117. Ukai, T., Hara, Y. & Kato, I. Effects of T cell adoptive transfer into nude mice on alveolar bone resorption induced by endotoxin. *J Periodontal Res* **31**, 414-422 (1996).
 118. Baker, P.J. *et al.* CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* **67**, 2804-2809 (1999).
 119. Teng, Y.T. *et al.* Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* **106**, R59-67 (2000).
 120. Baker, P.J., Howe, L., Garneau, J. & Roopenian, D.C. T cell knockout mice have diminished alveolar bone loss after oral infection with *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **34**, 45-50 (2002).

121. Yamaguchi, M. *et al.* T cells are able to promote lipopolysaccharide-induced bone resorption in mice in the absence of B cells. *J Periodontal Res* **43**, 549-555 (2008).
122. Eskan, M.A. *et al.* The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol* **13**, 465-473 (2012).
123. Yu, J.J. *et al.* An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* **109**, 3794-3802 (2007).
124. Zenobia, C. & Hajishengallis, G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000* **69**, 142-159 (2015).
125. Nakashima, T. *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* **17**, 1231-1234 (2011).
126. Nagashima, K. *et al.* Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat Immunol* (2017).
127. Miyao, T. *et al.* Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* **36**, 262-275 (2012).
128. Hobeika, E. *et al.* Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13789-13794 (2006).
129. Takimoto, A. *et al.* Scleraxis and osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. *Development* **142**, 787-796 (2015).
130. Sugimoto, Y., Takimoto, A., Hiraki, Y. & Shukunami, C. Generation and characterization of ScxCre transgenic mice. *Genesis* **51**, 275-283 (2013).
131. Lee, P.P. *et al.* A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* **15**, 763-774 (2001).
132. Tomura, M. *et al.* Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci Rep* **4**, 6030 (2014).
133. Mombaerts, P. *et al.* Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* **360**, 225-231 (1992).

134. Terashima, A. *et al.* Sepsis-Induced Osteoblast Ablation Causes Immunodeficiency. *Immunity* **44**, 1434-1443 (2016).
135. Ono, T. *et al.* IL-17-producing CD4⁺ T cells enhance bone regeneration. *Nat Commun* **7**, 10928 (2016).
136. Hajishengallis, G. *et al.* Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* **10**, 497-506 (2011).
137. Hajishengallis, G., Darveau, R.P. & Curtis, M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* **10**, 717-725 (2012).
138. Rovin, S., Costich, E.R. & Gordon, H.A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res* **1**, 193-204 (1966).
139. Abe, T. & Hajishengallis, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods* **394**, 49-54 (2013).
140. Mizraji, G., Segev, H., Wilensky, A. & Hovav, A.H. Isolation, processing and analysis of murine gingival cells. *J Vis Exp*, e50388 (2013).
141. Sawa, S. *et al.* RORC⁺ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol* **12**, 320-326 (2011).
142. Sano, T. *et al.* An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses. *Cell* **164**, 324 (2016).
143. Hu, Y. *et al.* IL-17RC is required for IL-17A- and IL-17F-dependent signaling and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **184**, 4307-4316 (2010).
144. Chen, B. *et al.* RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? *Biomed Res Int* **2014**, 731039 (2014).
145. Kanzaki, H. *et al.* Soluble RANKL Cleaved from Activated Lymphocytes by TNF- α -Converting Enzyme Contributes to Osteoclastogenesis in Periodontitis. *J Immunol* **197**, 3871-3883 (2016).
146. Hikita, A. *et al.* Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of

- receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* **281**, 36846-36855 (2006).
147. Xiong, J. *et al.* Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* **17**, 1235-1241 (2011).
 148. Lin, D. *et al.* IL-17 regulates the expressions of RANKL and OPG in human periodontal ligament cells via TRAF6/TBK1-JNK/NF- κ B pathways. *Immunology* (2014).
 149. Yamaji, Y. *et al.* Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun* **63**, 3576-3581 (1995).
 150. Sun, Y., Shu, R., Li, C.L. & Zhang, M.Z. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* **81**, 1488-1496 (2010).
 151. Andrukhov, O. *et al.* Response of human periodontal ligament stem cells to IFN- α and TLR-agonists. *Sci Rep* **7**, 12856 (2017).
 152. Jeon, D.I. *et al.* NOD1 and NOD2 stimulation triggers innate immune responses of human periodontal ligament cells. *Int J Mol Med* **29**, 699-703 (2012).
 153. Jian, C. *et al.* Hypoxia augments lipopolysaccharide-induced cytokine expression in periodontal ligament cells. *Inflammation* **37**, 1413-1423 (2014).
 154. Tanaka, S., Tanaka, Y., Ishiguro, N., Yamanaka, H. & Takeuchi, T. RANKL: A therapeutic target for bone destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*, 1-8 (2017).
 155. Yoneda, T. *et al.* Antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw: Position Paper 2017 of the Japanese Allied Committee on Osteonecrosis of the Jaw. *J Bone Miner Metab* **35**, 6-19 (2017).
 156. Aghaloo, T.L. *et al.* Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res* **26**, 1871-1882 (2011).
 157. Aguirre, J.I. *et al.* Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res* **27**, 2130-2143 (2012).
 158. Otto, S. *et al.* Tooth extraction in patients receiving oral or intravenous bisphosphonate administration: A trigger for BRONJ development? *J Craniomaxillofac Surg* **43**, 847-854 (2015).

159. Oğütçen-Toller, M. *et al.* Intractable bimaxillary osteomyelitis in osteopetrosis: review of the literature and current therapy. *J Oral Maxillofac Surg* **68**, 167-175 (2010).
160. McCracken, H. Periodontal disease in lizards - A review of numerous cases. Proceedings American Association of Zoo Veterinarians. 108-115 (1994).
161. Reisz, R.R., Scott, D.M., Pynn, B.R. & Modesto, S.P. Osteomyelitis in a Paleozoic reptile: ancient evidence for bacterial infection and its evolutionary significance. *Naturwissenschaften* **98**, 551-555 (2011).
162. Vivier, E., van de Pavert, S.A., Cooper, M.D. & Belz, G.T. The evolution of innate lymphoid cells. *Nat Immunol* **17**, 790-794 (2016).
163. Croft, D.P., Brent, L.J., Franks, D.W. & Cant, M.A. The evolution of prolonged life after reproduction. *Trends Ecol Evol* **30**, 407-416 (2015).
164. Lahdenperä, M., Lummaa, V., Helle, S., Tremblay, M. & Russell, A.F. Fitness benefits of prolonged post-reproductive lifespan in women. *Nature* **428**, 178-181 (2004).
165. Foster, E.A. *et al.* Adaptive prolonged postreproductive life span in killer whales. *Science* **337**, 1313 (2012).
166. Easlick, K.A. An evaluation of the effect of dental foci of infection on health. *J Am Dent Assoc* **42**, 615-697 (1951).
167. Kobayashi, T. *et al.* Assessment of interleukin-6 receptor inhibition therapy on periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol* **85**, 57-67 (2014).
168. Moutsopoulos, N.M. *et al.* Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. *Sci Transl Med* **6**, 229ra240 (2014).
169. Moutsopoulos, N.M. *et al.* Interleukin-12 and Interleukin-23 Blockade in Leukocyte Adhesion Deficiency Type 1. *N Engl J Med* **376**, 1141-1146 (2017).
170. Veldhoen, M. Th17 Cells Require You to Chew before You Swallow. *Immunity* **46**, 8-10 (2017).
171. Bird, L. T cells: Something to chew on. *Nat Rev Immunol* **17**, 81 (2017).

172. T√©moin, S. *et al.* Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints. *J Clin Rheumatol* **18**, 117-121 (2012).
173. Martinez-Martinez, R.E. *et al.* Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol* **36**, 1004-1010 (2009).
174. Hashimoto, M. *et al.* Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in preclinical stage of arthritis patients. *PLoS One* **10**, e0122121 (2015).
175. Zhang, X. *et al.* The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med* **21**, 895-905 (2015).

謝辞

本研究を遂行し、学位論文を執筆するにあたり、終始適切なお助言ご指導を賜りました高柳 広 教授に心より感謝申し上げます。また、研究遂行にあたり、*Tnfrsf11^{fllox/fllox}* マウスをご供与頂きました東京医科歯科大学の中島 友紀先生、*Tnfrsf11^{ΔS/ΔS}* マウスを作成頂きました国立国際医療研究センターの岡村 匡史先生と当研究室の新田 剛先生、*Foxp3^{hCD2}* ノックインマウスをご供与頂きました東京大学大学院薬学系研究科の堀 昌平先生、*Foxp3-GFP-Cre* マウスをご供与頂きました University of California, San Francisco の Jeffrey A Bluestone 博士、*Scx-Cre* マウスをご供与頂きました広島大学の宿南 知佐先生、*Il17a⁺* マウス及び *Il17f⁺* マウスをご供与頂きました東京理科大学の岩倉 洋一郎先生、*ROSA-CAG-lox-stop-lox-hKikGR* マウスをご供与頂きました大阪大谷大学の戸村道夫先生に厚く御礼申し上げます。本研究はこれらのマウス無しには遂行できなかつたと存じます。当研究室の小松 紀子先生には、実験の初歩的な手技から基礎研究における論理的な思考法を丁寧にご指導頂き、実際の研究遂行の際にも研究計画の立案から個々の実験に至るまで適切なお助言を頂きました。Stanford University の永島 一樹先生には、細菌叢の解析をはじめ様々な実験についてご指導・ご助言を頂くと同時に、当研究室の Warunee Pluemsakunthai 先生と共に実際の実験もお手伝い頂きました。岡本 一男先生をはじめ当研究室のスタッフ・研究員の先生方には、研究方針や実験方法について様々なご助言を頂きました。技術補佐員の皆様、秘書の皆様には、実験技術のご指導、実験環境の維持、様々な事務手続きを通して多大な援助をして頂きました。高柳研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

塚崎 雅之