

論文の内容の要旨

論文題目 骨破壊性 T 細胞による口腔細菌感染制御

氏名 塚崎 雅之

要旨

あらゆる生命体の最外層にはバリアが存在し、自己と外部環境との境界を規定している。脊椎動物の最外層を構成する皮膚と粘膜は、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。

消化管の入り口である口腔は、胃酸や消化酵素による選択を受けた細菌のみが生着する腸管とは異なり、多種多様な細菌に暴露する機会を持つ臓器である。また、歯が口腔粘膜を貫通し顎骨に植立しているため、歯周組織はタイトジャンクションによる上皮バリア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。歯の表面に形成されるバイオフィルム（プラーク）には、1 グラムあたり約 1000 億個という、糞便と同等かそれ以上の高密度で口腔細菌が存在する。この結果、歯と粘膜との境界では細菌感染による炎症が頻発し、歯周病は有史以来最も罹患者数の多い感染症として知られている。歯周病患者の歯周組織には多数の潰瘍形成が認められ、口腔細菌は直接血流に乗って全身循環に侵入し、感染性心内膜炎や動脈硬化、関節リウマチなど、様々な全身疾患に悪影響を及ぼすと考えられている。しかしながら、口腔細菌に対する免疫応答メカニズムや生体防御機構に関しては不明な点が多い。

歯周炎が進行すると、活性化した免疫系が破骨細胞による骨吸収を亢進し、歯の支持骨である歯槽骨は「炎症性骨破壊」を起こす。炎症性骨破壊のメカニズムは、これまで関節リウマチ領域を中心に多くの研究がなされており、活性化した Th17 細胞が IL-17 産生を介して破骨細胞分化のマスター分子である RANKL の局所濃度を高めることで、関節破壊を引き起こすと考えられている。しかしながら、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、なぜ破骨細胞を増やし、骨吸収を誘導する機能も有するのかに関しては、これまで議論されてこなかった。

歯槽骨の吸収が進行すると、最終的に感染源である歯は脱落し、口腔粘膜の感染及び炎症は終息する。一方で、先天的な破骨細胞機能障害を持つ大理石骨病の患者では、歯周炎に伴い重篤な顎骨骨髓炎を発症することが報告されている。骨吸収の実行役である破骨細胞の機能が障害されているため、重篤な炎症下においても歯槽骨は吸収されず、歯は顎骨に残存する。感染源である歯の除去と抗生剤の投与により、時間と共に正常な口腔粘膜が抜歯窩を被覆し、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ことが報告されている。

以上の知見から私は、口腔細菌感染に伴う炎症性骨破壊は、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。歯周炎で歯が脱落することの意義を検討するため、歯周炎を持続させたマウスと、骨吸収のピークで患歯を脱落させたマウスとを比較解析した。歯周炎を持続させたマウスでは、肝臓及び脾臓から口腔細菌が検出されたが、感染歯を除去したマウスでは、遠隔臓器への口腔細菌の波及が抑制されることが明らかとなった。歯周炎を持続させたマウスの口腔粘膜では、IL-17 や IL-6 といった炎症性サイトカインの遺伝子発現が上昇していたが、感染歯を除去したマウスではそれらの遺伝子発現は低下していた。以上の結果から、炎症性骨破壊による感染歯の排除は、遠隔臓器への口腔細菌の波及と、歯周粘膜の Th17 型の炎症を終息させる役割を持つことが示唆された。

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役割を持つことが報告されていることから、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検証した。その結果、歯周炎を誘導したマウスの歯周組織及び所属リンパ節では、CD4 陽性 T 細胞の中で Th17 細胞が特異的に集積していることが明らかとなった。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ことから、歯周炎組織への Th17 細胞の集積は口腔細菌依存的であることが示された。歯周炎における Th17 細胞の働きを検討するため、*IL17a⁺ IL17f⁻* マウスに歯周炎を誘導し解析したところ、*IL17a⁺ IL17f⁻* マウスでは歯周炎における骨破壊が抑制される一方で、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。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。

近年、Foxp3 陽性 T 細胞由来の Th17 細胞(exFoxp3Th17 細胞)が、関節破壊において重要な役割を持つことが示唆されている。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 細胞が含まれているかを、細胞系譜解析により検討した。その結果、歯周炎を誘導したマウスの歯周組織及び頸部リンパ節では、exFoxp3Th17 細胞の頻度及び細胞数が顕著に増加しており、歯周炎組織において Foxp3 陽性 T 細胞は exFoxp3Th17 細胞へと分化転換することが明らかとなった。

次に、歯槽骨破壊の詳細なメカニズムを検討するため、歯周炎組織を構成する様々な細胞種特異的な RANKL 欠損マウスを作成し、歯周炎における主要な RANKL 産生細胞を探索した。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ことが明らかとなった。骨芽細胞や歯根膜線維芽細胞は IL-17 刺激により RANKL 発現が誘導されることから、Th17 細胞及び exFoxp3Th17 細胞は IL-17 の産生を介して骨芽細胞と歯根膜線維芽細胞の RANKL 発現誘導を介し、骨破壊に寄与すると考えられた。

過去の報告から、Foxp3 陽性 T 細胞から exFoxp3Th17 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、私は次に歯周炎における IL-6 の機能について解析を行った。抗 IL-6 抗体を投与した歯周炎マウスでは、exFoxp3Th17 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。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。*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。

最後に、exFoxp3Th17 細胞の歯周炎における役割を検討するため、*Il6ra^{fl/fl}Foxp3-Cre* マウス（炎症下でも Foxp3 陽性細胞が exFoxp3Th17 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^{fl/fl}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し組成も変化していた。*Il6ra^{fl/fl}Foxp3-Cre* マウスの歯周炎組織では、IL-17A や RANKL の発現に加え、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*)の発現が低下していた。以上から、exFoxp3Th17 細胞は IL-17 を産生し、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・質的に制御すると同時に、骨芽細胞や歯根膜線維芽細胞上に RANKL を誘導し破骨細胞による骨破壊を促進することで、感染源である歯の脱落を促し、口腔細菌感染及び局所炎症を終息させる役割を持つことが示唆された。

本研究を通じて、私は関節リウマチの病態において悪玉とされてきた骨破壊性 T 細胞が、抗菌免疫の惹起と破骨細胞による骨吸収誘導を介して、口腔細菌に対する生体防御機構を司ることを見出した。細菌感染における骨破壊性 T 細胞の誘導メカニズムとその役割の解明は、新たな歯周炎制御法の確立や、他の炎症性骨疾患の病態理解に繋がる可能性がある。