

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
森田 学 印	研究の総括, 総合的指導
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 予防歯科学	身分 大学院生	氏名 福原 大樹
<p>論 文 題 名</p> <p>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)</p>		
<p>論文内容の要旨 (2000字程度)</p> <p>〈緒言〉</p> <p>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。</p> <p>〈方法〉</p> <p>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 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 由来LPS (10<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l) を口蓋側歯肉溝に5<math>\mu</math>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-<math>\alpha</math> (Tnf-<math>\alpha</math>), 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。</p> <p>〈結果〉</p> <p>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。</p>		

## 論文内容の要旨（2000字程度）

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示した．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-α*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．