

ふりがな	おくい たかふみ
氏名	奥井隆文
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第127号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Characterization of CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ T-cell clones established from chronic inflammatory lesions (慢性炎症性病変部より樹立した CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ T 細胞クローンの性状解析)
論文審査委員	主査 教授 山崎和久 副査 教授 吉江弘正 教授 星野悦郎

博士論文の要旨

【目的】

歯周炎の病態形成において、免疫応答を促進するエフェクターT細胞と、それを制御する制御性T細胞のバランスは非常に重要であると考えられる。我々はこれまでの研究でマウスにおける CD4⁺ CD25⁺ 制御性T細胞に特徴的な遺伝子である *FOXP3* 遺伝子の発現が歯肉炎組織よりも歯周炎組織で高いことを示した。さらに歯周炎患者の歯肉組織から樹立した(歯周炎組織由来)CD4⁺T細胞クローンの大部分が *FOXP3* 遺伝子を発現していることを報告した。このように歯周炎の病態形成には制御性T細胞と疑われる FOXP3⁺T細胞が関与していると考えられるが、詳細な役割は十分に明らかになっていない。今回我々は、歯周炎組織中に浸潤している FOXP3⁺T細胞および歯周炎組織由来 CD4⁺FOXP3⁺T細胞クローンに注目して解析を行い、ヒトの歯周炎組織においても FOXP3⁺T細胞が制御性T細胞として機能しているのかを検討した。

【方法】

1. 歯周炎組織に浸潤している FOXP3⁺T細胞のフェノタイプを免疫組織学的に解析した。
2. インフォームドコンセントの得られた3名の重度歯周炎患者の歯肉組織から樹立した CD4⁺T細胞クローンより計7つのクローンを実験に供した。また、末梢血より比重遠心法と磁気分離システムを用いて CD4⁺ CD25⁺T細胞(制御性T細胞)と CD4⁺ CD25⁻T細胞を分離して、同様に実験で使用した。遺伝子発現解析を RT-PCR 法にて、フェノタイプ解析をフローサイトメトリー法にて行った。
3. 歯周炎組織由来 CD4⁺FOXP3⁺T細胞クローンまたは末梢血由来 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺制御性T細胞を末梢血由来 CD4⁺CD25⁻T細胞と共培養し、CD4⁺CD25⁻T細胞の増殖活性を³[H]チミジン取り込み法にて測定した。刺激には抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を用いた。

【結果】

1. 歯周炎組織において FOXP3 陽性細胞は CD4 または CD25 陽性細胞中に限局して認められた。しかし、CD8 陽性細胞中には認められなかった。
2. *FOXP3* 遺伝子は大部分のクローンと末梢血由来 CD4⁺CD25⁺T細胞に発現していた。

CD25 遺伝子は全てのクローンで CD4⁺ CD25⁺ T 細胞と同様に強く発現していた。タンパク質発現においても遺伝子発現と同様の結果が得られたが、CD25 発現レベルはほとんどのクローンで低かった。

3. 末梢血由来 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ 制御性 T 細胞は CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の増殖を抑制したが、歯周炎組織由来 CD4⁺ FOXP3⁺ T 細胞クローンは増殖を著しく促進した。

【考察】

歯周炎組織には、CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞のフェノタイプを有する FOXP3⁺ T 細胞が浸潤していた。また、歯周炎組織由来 CD4⁺ FOXP3⁺ T 細胞クローンにおいても、CD25 のタンパク質発現レベルは低めであるものの、制御性 T 細胞様のフェノタイプを持っていると考えられる。しかし、これらのクローンは末梢血由来 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ 制御性 T 細胞が有するような制御的性質を示さないばかりでなく、むしろエフェクター T 細胞様に働いて CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の増殖を促進した。以上より、歯周炎組織に浸潤している FOXP3⁺ T 細胞のほとんどが、機能的には制御性 T 細胞ではなくエフェクター T 細胞に近いことが示された。歯周炎組織由来 CD4⁺ FOXP3⁺ T 細胞クローンが FOXP3 を発現しながらエフェクター T 細胞様であることは、CD25 のタンパク質発現レベルが低いことに起因しているかもしれず、さらなる解析が必要である。

(審査結果の要旨)

歯周炎は、歯周病原細菌の感染により発症する慢性炎症性疾患である。炎症反応の過程で炎症性サイトカインなどの炎症メディエーターや抗体の産生が上昇すると同時に歯周組織構成細胞に熱ショックタンパク 60 (HSP60) が発現することが知られている。ヒト HSP60 は歯周病原細菌の GroEL と相同性が高く、歯周炎組織にはヒト HSP60 と細菌性 GroEL の両者を認識する T 細胞の集積が認められる。さらに、互いに交叉反応性を持った抗ヒト HSP60 抗体、抗 GroEL 抗体の産生も認められる。これらのことは歯周炎の病態において分子相同性に基づく免疫応答が関与していることを強く示唆している。さらに歯周炎の臨床的病態においてプラークの付着量と疾患重症度にしばしば関連がみられないことから、患者の免疫応答の多様性が病態形成に大きく関わっていると考えられるが、その制御機構については十分に明らかになっていない。近年、免疫応答の制御、特に自己寛容に重要な T 細胞として CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞が注目されている。この T 細胞サブセットは、自然な状態で CD25 を強発現していて、CTLA-4 や GITR といった特定の膜分子の発現が高いことで知られている。また、少なくともマウスの CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞に特異的な遺伝子とされる FOXP3 の異常は、マウスおよびヒトにおいて重篤で様々な自己免疫疾患および炎症性疾患を引き起こすことが知られている。これまで、申請者の所属する研究グループは歯周炎組織において CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞の浸潤が亢進していること、FOXP3 遺伝子の発現が上昇していること報告した。さらに歯周炎組織から CD4⁺ T 細胞クローンを樹立して解析した結果、その 90%以上が FOXP3 遺伝子を発現していることを示した。そこで申請者は FOXP3 陽性細胞に注目して、歯周炎病態形成における役割を解析することを目的として以下の実験を行った。

全ての実験において、サンプル提供者から十分なインフォームドコンセントを得た。まず慢性歯周炎患者より歯周手術や抜歯の際に歯周組織を採取し、連続凍結切片を作成した。CD4、CD8、CD25、FOXP3 に対する抗体を用いて、免疫組織染色を行い、歯周炎組織における FOXP3 陽性細胞のフェノタイプを解析した。その結果、FOXP3 陽性細胞は CD4 または

CD25 陽性細胞中に限局して認められたが、CD8 陽性細胞中には全く認められなかった。次に、歯周炎組織由来 CD4⁺ T 細胞クローンの遺伝子発現解析およびフェノタイプ解析を行った。解析した 7 種の歯周炎組織由来 CD4⁺ T 細胞クローンは 3 名の慢性歯周炎患者より歯周組織を採取し、ディスペーゼ処理と比重遠心法により獲得した単核細胞を抗原提示細胞存在下で抗 CD3 抗体刺激により増殖させ、磁気分離法にて CD4 陽性細胞を分離し、限界希釈法にてクローン化して作製した。また、末梢血より比重遠心法と磁気分離法を用いて CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞と CD4⁺ CD25⁻ T 細胞を分離して同様に解析を行った。その結果、遺伝子レベルでは、FOXP3 は CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞と大部分のクローンに発現していた。一方 CD25 遺伝子は CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞と全てのクローンに発現していた。CTLA-4 および TGF-β1 遺伝子は、細胞間で明らかな違いが認められなかった。IL-10 遺伝子は、CD4⁺ CD25⁻ T 細胞と CD4⁺ CD25⁺ T 細胞でクローンよりも強く発現していた。タンパク質レベルでは、FOXP3 に関しては遺伝子レベルと同様の結果が得られたが、CD25 発現は CD4⁺ CD25⁺ T 細胞に比べると大部分のクローンで低かった。全ての細胞群に CTLA-4 の発現は認められなかったが、GITR は一部のクローンで発現していた。最後に、FOXP3 陽性である歯周炎組織由来 CD4⁺ T 細胞クローンの機能を末梢血由来 CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞と比較して解析した。その方法として、両者にγ線を照射して増殖能を奪った後、抗原提示細胞存在下で末梢血由来 CD4⁺ CD25⁺ T 細胞（レスポンドーT細胞）と共培養し、その増殖活性を³[H] チミジン取り込み法にて測定した。刺激には抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を用いた。結果、CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞はレスポンドーT細胞の増殖を抑制したが、逆に CD4⁺ T 細胞クローンはレスポンドーT細胞の増殖を著しく促進した。

以上のことより、歯周炎組織には CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞のフェノタイプを有する FOXP3⁺ T 細胞が浸潤していたと考えられる。歯周炎組織由来 CD4⁺ T 細胞クローンに注目すると、CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞のように FOXP3 を発現しているにも関わらず、レスポンドーT細胞の増殖を促進したことからエフェクターT細胞様の機能を持つことが考えられる。この理由としては、FOXP3 が *in vitro* での T 細胞の刺激によって発現上昇し、それに制御能の獲得は伴わないという報告があることより、今回使用したクローンを樹立する過程での非特異的な刺激が影響していることも考えられる。つまり、マウスと異なり、ヒトでは FOXP3 が CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞だけに必ずしも特異的なマーカーとはなり得ないことを示している。また、CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞とクローンでは、CD25 遺伝子の発現は同レベルであるのにも関わらず膜上の CD25 タンパクの発現はクローンで低い傾向にあるということが機能的な違いに影響している可能性もあるが、詳細は不明である。

本研究は歯周炎組織における FOXP3 陽性細胞のフェノタイプを明らかにし、歯周炎組織由来 CD4⁺ CD25^{low} FOXP3⁺ T 細胞がエフェクターT細胞様に働くことを示した最初の論文である。歯周炎組織に浸潤している FOXP3⁺ T 細胞のほとんどが、エフェクターT細胞として機能しているのかもしれない、今後さらなる研究が必要である。これらの結果は歯周炎の病態形成メカニズムの解明に寄与するものであり、学位論文として十分な価値を認める。