

---

## 西野瑞穂歯科臨床医学奨励賞受賞講演

---

### 歯周炎におけるケモカインの発現および発現制御に関する研究

細川 義隆

キーワード：歯周炎，ケモカイン，炎症性細胞

### The study of Chemokines in Periodontal Diseases and Regulation of its Expression

Yoshitaka HOSOKAWA

**Abstract:** Periodontal disease, a chronic inflammatory disease of the attachment structures of the teeth, is one of the most significant causes of tooth loss in adults and the most prevalent form of bone pathology in humans, besides being a modifying factor of an individual's systemic health. The bacterial biofilm attached to the surface of the tooth, close to the periodontal tissues, is the etiologic factor for this disease. Inflammatory and immune responses, initiated by periodontopathogens, are thought to protect the host against infection; however, the persistence of a local chronic host response may alter the protective roles of inflammatory cells and produce deleterious effects in these tissues. In fact, the development of periodontal diseases seems to be related to the progression of the inflammatory cell infiltrate into the deeper periodontal tissues. In this situation, chemokines, found in both gingival tissue and crevicular fluid, are thought to play important roles in the immunopathogenesis of periodontal diseases. Recently, we have reported that an intense expression of chemokines, including fractalkine, CCL20 and CXCL16, in periodontal diseased tissues can be observed. In periodontal connective tissues, fractalkine can drive the migration of NK cells. CCL20 is a chemoattractant of memory-type T cells and immature dendritic cells, and CXCL16 can attract Th1-type lymphocytes and NKT cells. These chemokines might be involved in the initiation and progression of periodontal disease.

#### 1. はじめに

歯周炎はデンタルプラーク，とりわけ歯肉縁下プラーク（主にグラム陰性細菌からなる細菌塊）により惹起される慢性炎症性疾患であり，その発症および進行には宿主の免疫応答が関与し，付着上皮の歯面からの剥離や歯周ポケットの形成および歯槽骨吸収などを特徴とした歯周炎の病態を形成していると考えられている<sup>1,2)</sup>。歯周炎病変局所には好中球，マクロファージ，T細胞，B細胞，形質細胞などさまざまな炎症性細胞浸潤が認められており<sup>3,4)</sup>，これらの細胞から産生されるサイトカインなどの液性因子が歯周組織破壊に関与している可能性が示唆されている<sup>5-7)</sup>。

近年，炎症性細胞浸潤を調節している因子としてケモカインが注目されており，その受容体であるケモカインレセプターとの相互作用により，生体内の白血球の遊走・集積に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた<sup>8)</sup>。歯周炎においても，ここ数年の研究成果によってケモカインがその病態形成に深く関与している可能性が示されている。本稿では，我々の報告を中心に歯周炎の病態形成における種々のケモカインの役割について述べたい。

#### 2. CC chemokine ligand 20 (CCL20)

CCL20はメモリーT細胞や未成熟樹状細胞の炎症部

表1 歯周炎に発現しているケモカインとその産生細胞

ケモカイン	産生細胞	対応するレセプター
CCL20	線維芽細胞、血管内皮細胞 上皮細胞	CCR6
Fractalkine	血管内皮細胞	CX3CR1
CXCL16	線維芽細胞、炎症性細胞	CXCR6
IL-8	上皮細胞、マクロファージ 線維芽細胞	CXCR1, CXCR2
CCL2	血管内皮細胞、線維芽細胞 上皮細胞、マクロファージ	CCR2
CCL3	上皮細胞、炎症性細胞	CCR1, CCR5
CXCL12	線維芽細胞	CXCR4

位への集積に関与するケモカインである。歯周炎の進行に伴いメモリーT細胞の浸潤が顕著になることは報告されていたが<sup>9)</sup>、そのメカニズムは不明であった。そこで我々はCCL20がメモリーT細胞の歯周炎局所への集積へ関与しているのではないかと考え検討した。免疫組織化学的解析ならびにRT-PCR解析により正常歯肉組織ではCCL20はほとんど発現していなかったが、炎症歯肉組織ではその発現は亢進しており、歯肉線維芽細胞、歯肉上皮細胞、血管内皮細胞にCCL20が発現していることが明らかとなった。また、CCL20のレセプターであるCC chemokine receptor 6 (CCR6)陽性CD4陽性リンパ球は末梢血と比較し歯周炎病変局所で高い割合で存在した。また、CCR6陽性CD4陽性リンパ球の多くはメモリーT細胞(CD45RO陽性細胞)であることも明らかとなった<sup>10)</sup>。さらに、歯肉線維芽細胞をproinflammatory cytokineであるtumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、interleukin (IL)-1 $\beta$ あるいは*Escherichia coli* lipopolysaccharide (*E.coli* LPS)で刺激するとCCL20産生が亢進され、シグナル伝達阻害物質を用いた実験により、その産生にはp38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、extracellular signal-regulated kinases (ERK)ならびにnuclear factor (NF)- $\kappa$ Bを介したシグナル伝達経路が関与していることが明らかとなった<sup>11)</sup>。

### 3. Fractalkine

Fractalkineは膜タンパク質として細胞表面に発現し、プロテアーゼで切断されて分泌型となるケモカインである。膜結合型fractalkineは細胞接着分子として、分泌

型fractalkineは細胞遊走因子として機能するが、いずれの場合もCX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1)をレセプターとしている<sup>12)</sup>。CX3CR1はnatural killer (NK)細胞に多く発現していることが報告されており<sup>13)</sup>、歯周炎においてはNK細胞浸潤が認められ歯周組織破壊に関与している事が示唆されているが<sup>14)</sup>、その浸潤機構に関しては明らかとなっていない。そこで、我々はNK細胞浸潤に関与しているfractalkine-CX3CR1 systemに着目し検討を加えた。Fractalkineは正常歯肉ではほとんど認められなかったが、炎症歯肉において血管内皮細胞にその発現が認められた。また、炎症歯肉組織においてfractalkine発現血管内皮細胞周囲にCX3CR1陽性炎症性細胞浸潤が認められ、fractalkine-CX3CR1が歯周炎病変局所への炎症性細胞浸潤、特にNK細胞浸潤を調節している可能性が示唆された。さらにhuman umbilical vein endothelial cells (HUVEC)を用い、細菌関連因子が血管内皮細胞のfractalkine産生に関与するか否かを検討した。その結果、*E.coli* LPSだけではなく歯周病関連細菌の一つである*Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*)のLPSがHUVECのfractalkine産生を誘導することが明らかとなった<sup>15)</sup>。

### 4. CX3C chemokine ligand 16 (CXCL16)

CXCL16は当初脾臓、リンパ節、バイエル板などのリンパ組織内にその発現が認められているのみであったが<sup>16)</sup>、近年関節リウマチなどの炎症局所でもその発現が認められ<sup>17)</sup>、末梢組織への炎症性細胞浸潤にも関与していることが明らかとなってきた。また、CXCL16

は fractalkine に続く第二の膜結合型ケモカインとして注目されており a disintegrin and metalloproteinase domain (ADAM)10 あるいは ADAM17 で切断され可溶性ケモカインとなることが報告されている<sup>18, 19)</sup>。そのレセプターである CXCR6 は主に Th1 細胞や NKT 細胞に発現していることが明らかとなっている<sup>20, 21)</sup>。近年, Th1 細胞が歯周炎において歯槽骨吸収に大きく関与している事が報告されている<sup>22)</sup>。Kawai らはラットモデルにおいて *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) 表層膜抗原特異的ラット Th1 細胞を Aa 表層膜抗原と同時に歯肉に注入すると Th2 細胞と比較し著しい骨吸収が認められた事を報告している。しかしながら, Th1 細胞の歯周炎病変局所への浸潤メカニズムに関しては明らかとなっていない。そこで我々は Th1 ケモカインの一つである CXCL16 に着目し検討を加えた。正常歯肉組織では CXCL16 発現はほとんど認められなかったが, 炎症歯肉組織において歯肉線維芽細胞で強く CXCL16 発現が認められた。また, CXCL16 発現が認められる部位において CXCR6 陽性炎症性細胞浸潤が認められた。さらに歯肉線維芽細胞における CXCL16 産生調節機構に関して検討を加えた。CXCL16 産生は proinflammatory cytokine である IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ならびに Th1 サイトカインである interferon (IFN)- $\gamma$  により増強された。増強された CXCL16 産生は Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 により抑制された。また, シグナル伝達阻害物質を用いた実験により, CXCL16 産生は p38 MAPK, ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), phosphoinositol-3-kinases (PI3K) ならびに NF- $\kappa$ B を介したシグナル伝達経路を介し調節されていることが明らかとなった。さらに, 膜結合型 CXCL16 を切断する ADAM10 ならびに ADAM17 の発現が歯肉線維芽細胞において認められ, ADAM10 ならびに ADAM17 の阻害剤を作用させると分泌型 CXCL16 発現が減少した<sup>23)</sup>。これらの結果, 歯肉線維芽細胞は様々なサイトカイン刺激により CXCL16, ADAM10, ADAM17 を産生することにより歯周炎病変局所への Th1 細胞浸潤を調節している可能性が考えられた。

### 5. その他のケモカイン

その他, 歯周炎病変局所におけるケモカイン発現ならびに発現制御に関する研究報告もある。好中球に対する強力な遊走因子の CXC ケモカインの一つである IL-8 は歯周病患者の歯肉溝浸出液中で高濃度に検出され, さらには炎症歯肉上皮層で強くその発現が認められることも報告されている<sup>24)</sup>。また, 歯周病関連細菌が歯肉上皮細胞に付着あるいは侵入すると IL-8 産生が上昇することも示されている<sup>25)</sup>。そのレセプターである CXCR2 の歯肉組織中での発現も報告されている<sup>26)</sup>。

単球, マクロファージの遊走因子である CC ケモカインの一種である CCL2 は炎症歯肉組織中の歯肉線維芽細胞, 血管内皮細胞, マクロファージなどでその発現が認

められている<sup>27)</sup>。また, 歯周炎患者の歯肉溝浸出液中の CCL2 濃度も健常人と比較し上昇していることも報告されている<sup>28)</sup>。さらに, 歯肉線維芽細胞, 血管内皮細胞を proinflammatory cytokine や *P. gingivalis* LPS で刺激すると CCL2 産生が誘導されることも明らかとなっている<sup>29)</sup>。

さらには, Th1 細胞浸潤に関与する CCL3 に関する報告もある。Gemmell らは炎症歯肉組織において CCL3 を発現している細胞が多く存在し, この発現は歯肉上皮細胞でもっとも顕著であり, 炎症の拡大に伴い CCL3 発現細胞数も増加することを示している<sup>30)</sup>。その他, ヒト末梢血単核細胞を歯周病原性細菌で刺激すると著しい CCL3 産生が認められるという報告もある<sup>31)</sup>。また, そのレセプターである CCR5 陽性細胞が歯周炎病変局所で認められることも報告されている<sup>32)</sup>。

さらに, 我々は CXC ケモカインの一つである CXCL12 の歯周炎での発現に関して報告した<sup>33)</sup>。CXCL12 はその受容体 CXCR4 との相互作用を通じて生体内現象に関与している事が報告されている。また, CXCR4 は HIV 感染の co-receptor であることが知られている<sup>34)</sup>。他, がん細胞の転移<sup>35)</sup>, 関節リウマチの増悪<sup>36)</sup> など様々な疾患に関与している事が報告されている。しかしながら, 歯周炎におけるその発現および発現制御の関する報告はされてなかった。我々は, 炎症歯肉組織において CXCL12 および CXCR4 発現炎症性細胞が認められることを明らかとし, さらに歯肉線維芽細胞からの CXCL12 産生は TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ならびに TGF- $\beta$ 1 刺激により増強される事を報告した。これらのことより CXCL12 は歯周炎への炎症性細胞浸潤に調節し, 歯周炎の病態形成に関与している事が示唆された。

### 6. おわりに

歯周炎におけるケモカインならびにケモカインレセプターの発現や役割について我々の研究結果を中心にまとめてみた。歯周炎は早期病変である歯肉炎にはじまり,

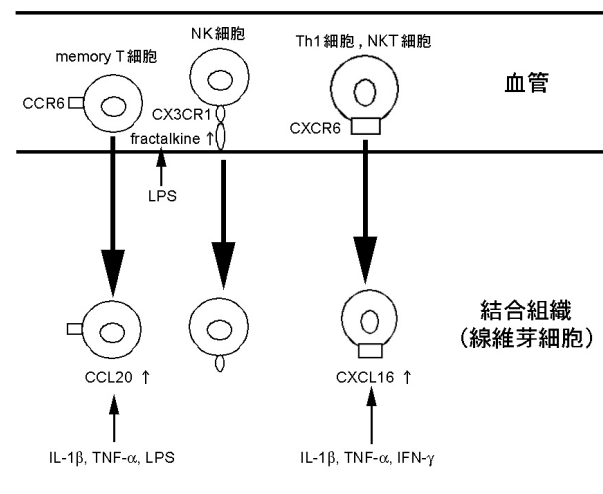


図1 血管内から結合組織内へのリンパ球浸潤とケモカイン

炎症性の組織破壊が進行するに従って軽度歯周炎から重度歯周炎へとその病状が進展することが知られているが、その病態変化のメカニズムについては未だ不明瞭な点が多い。いろいろなケモカインがいつどのような刺激で誘導され、どのような種類の炎症性細胞浸潤を調節し、どのように歯周組織破壊に関与しているかを明らかにすることは、歯周炎の病態解明に直接繋がるものとしておおいに期待されることである。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導・御高閲を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯科保存学分野の松尾敬志教授に厚く御礼申し上げます。また、数々のご支援を頂いた歯科保存学分野の関係諸先生方、教室員の方々に感謝致します。

### 文 献

- 1) Socransky SS: Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* 49, 203-222 (1970)
- 2) Slots J: Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 6, 351-382 (1979)
- 3) Cole KL, Seymour GJ and Powell RN: Phenotypic and functional analysis of T cells extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. *J Periodontol* 58, 569-573 (1987)
- 4) Okada H, Shimabukuro Y, Kassai Y, Ito H, Matsuo T, Ebisu S and Harada Y: The function of gingival lymphocytes on the establishment of human periodontitis. *Adv Dent Res* 2, 364-367 (1988)
- 5) Fujihashi K, Yamamoto M, Hiroi T, Bamberg TV, McGhee JR and Kiyono H: Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4(+) T cells isolated from inflamed human gingival tissues. *Clin Exp Immunol* 103, 422-428 (1996)
- 6) Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I and Taubman MA: Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res* 79, 1548-1555 (2000)
- 7) Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ and Hara K: Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 12, 281-287 (1997)
- 8) Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L and Briskin M: Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72, 209-253 (1999)
- 9) Yamazaki K, Nakajima T, Aoyagi T and Hara K: Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *J Periodontal Res* 28, 324-334 (1993)
- 10) Hosokawa Y, Nakanishi T, Yamaguchi D, Takahashi K, Yumoto H, Ozaki K and Matsuo T: Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$ -CC chemokine receptor 6 interactions play an important role in CD4+ T-cell accumulation in periodontal diseased tissue. *Clin Exp Immunol* 128, 548-554 (2002)
- 11) Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H and Matsuo T: Increase of CCL20 expression by human gingival fibroblasts upon stimulation with cytokines and bacterial endotoxin. *Clin Exp Immunol* 142, 285-291 (2005)
- 12) Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ and Yoshie O: Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91, 521-530 (1997)
- 13) Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP and Reinecker HC: Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol* 164, 3368-3376 (2000)
- 14) Fujita S, Takahashi H, Okabe H, Ozaki Y, Hara Y and Kato I: Distribution of natural killer cells in periodontal diseases: an immunohistochemical study. *J Periodontol* 63, 686-689 (1992)
- 15) Hosokawa Y, Nakanishi T, Yamaguchi D, Nakae H and Matsuo T: Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in periodontal diseased tissue. *Clin Exp Immunol* 139, 506-512 (2005)
- 16) Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE and Cyster JG: A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 1, 298-304 (2000)
- 17) Nanki T, Shimaoka T, Hayashida K, Taniguchi K, Yonehara S, Miyasaka N: Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 3004-3014 (2005)
- 18) Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S and Ludwig A: The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol* 172, 6362-6372 (2004)
- 19) Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA and Becherer JD: Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8,

- 161-171 (2005)
- 20) Motsinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S and Unutmaz D: CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* 195, 869-879 (2002)
  - 21) Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, Greenberg HB and Butcher EC: Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest* 107, 595-601 (2001)
  - 22) Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW and Wilson ME, Taubman MA: Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Immunol* 164, 2102-2109 (2000)
  - 23) Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H and Matsuo T: CXC chemokine ligand 16 in periodontal diseases: expression in diseased tissues and production by cytokine-stimulated human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 149, 146-154 (2007)
  - 24) Murray PA and Patters MR: Gingival crevice neutrophil function in periodontal lesions. *J Periodontal Res* 15, 463-469 (1980)
  - 25) Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Takemoto T, Sakata M, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M and Kurihara H: Expression of IL-1 $\beta$  and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine* 14, 152-161 (2001)
  - 26) Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ and Silva JS: The dual role of p55 tumour necrosis factor- $\alpha$  receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* 147, 128-138 (2007)
  - 27) Yu X, Antoniades HN and Graves DT: Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. *Infect Immun* 61, 4622-4628 (1993)
  - 28) Hanazawa S, Kawata Y, Takeshita A, Kumada H, Okithu M, Tanaka S, Yamamoto Y, Masuda T, Umemoto T and Kitano S: Expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in adult periodontal disease: increased monocyte chemotactic activity in crevicular fluids and induction of MCP-1 expression in gingival tissues. *Infect Immun* 61, 5219-5224 (1993)
  - 29) Ozaki K, Hanazawa S, Takeshita A, Chen Y, Watanabe A, Nishida K, Miyata Y and Kitano S: Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulate synergistically the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in fibroblastic cells derived from human periodontal ligament. *Oral Microbiol Immunol* 11, 109-114 (1996)
  - 30) Gemmell E, Carter CL and Seymour GJ: Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol* 2001, 125, 134-141
  - 31) Jiang Y and Graves DT: Periodontal pathogens stimulate CC-chemokine production by mononuclear and bone-derived cells. *J Periodontol* 70, 1472-1478 (1999)
  - 32) Taubman MA and Kawai T: Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 12, 125-135 (2001)
  - 33) Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Murakami K, Miyake Y and Matsuo T: CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 141, 467-474 (2005)
  - 34) Feng Y, Broder C C, Kennedy P E and Berger E A: HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877 (1996).
  - 35) Uchida D, Begum NM, Almofti A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y, Hamakawa H, Yoshida H and Sato M: Possible role of stromal-cell derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 290, 289-302 (2003)
  - 36) Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, Yavus S and Lipsky PE: Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 165, 6590-6598 (2000).