

顎顔面領域の疾患病態における 自然・獲得免疫系を介した慢性炎症：メカニズムの解析

四釜 洋介

国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部

Molecular mechanisms for oral and maxillofacial diseases in chronic inflammation by innate and adaptive immunity

Yosuke Shikama

Department of Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology

Abstract

Commensal microbes, airborne antigens/allergens, and food are all initially encountered in the oral cavity before entering into the gastrointestinal and often respiratory tracts. Similar to other mucosal sites, the local immune system is important for host defense in the oral mucosa. As an undergraduate, we reported the involvement of Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)1 in the augmenting effect of endotoxin shock by Muramyl Dipeptide (MDP), the minimal active structure of peptidoglycan. Furthermore, we studied the effects of bisphosphonates (bone resorption inhibitors) on pro-inflammatory and anti-inflammatory responses via macrophages. My post-graduate research interests include studying the mechanism by which saturated fatty acids, particularly palmitic acid, induce chronic inflammation in salivary glands and periodontal tissues through the innate immune system. In a recent study, we reported that proteins produced by salivary and lacrimal gland epithelial cells and senescence-associated CD4-positive T cells play crucial roles in the pathogenesis of dry mouth and dry eye. In this review, I summarize the research I have conducted until now.

Endotoxin and Innate Immunity 24 : 19 ~ 23, 2024

Key words : 歯周病, 顎骨壊死, シェーグレン症候群, ドライマウス, ドライアイ, 飽和脂肪酸

はじめに

口腔は消化器系・呼吸器系のゲートウェイとして機能し、空気や食物等を介した病原性微生物・抗原・アレルギーの侵入、排出経路となっている。口腔粘膜はそれら異物に対する物理的・化学的バリアとして機能しており、このバリア機能に重要な役割を担っているのが唾液である。唾液には、pH緩衝作用や抗菌作用をもつ無機物・有機物が含まれており、その分泌量や質はう蝕や歯周病、カンジダ症等の口腔に関連した疾患発症・予防に関わっている。筆者らはこれまで口腔・顎顔面領域疾患の自然・獲得免疫系を介した病態形成・予防、治療法に関する基礎研究を一貫して行ってきた。本総説では、歯周病をは

じめとする細菌感染症、ビスフォスフォネート関連顎骨壊死、飽和脂肪酸の口腔疾患病態への関与、加齢・自己免疫疾患に起因する唾液・涙液分泌障害に関する研究成果を、自然免疫、獲得免疫学的解析に分類し、紹介したい。

1. 自然免疫学的解析

1-1. ムラミルジペプチド (MDP) によるエンドトキシンショック増強のメカニズム解析

口腔内細菌は病原性が比較的に弱いいため、単独で疾患を起こすのではなく混合感染の様式をとる。本研究によりグラム陽性菌と陰性菌の菌体成分が炎症反応を増強するメカニズムを明らかにした。In vivoにおいて細菌細

胞壁の骨格構造であるペプチドグリカンの生物活性中心 (MDP) が、リポポリサッカライド (LPS) によるエンドトキシンショックを増強することが知られていたが、その増強メカニズムは不明であった。筆者らはまず、interleukin (IL)-1 ノックアウト (KO) マウス、tumor-necrosis factor (TNF)- α KOマウスを用いMDPのエンドトキシンショック増強効果を解析した結果、両KOマウスでショック症状が減弱した。また野生型 (WT) マウスにMDPを投与すると、肝臓、肺、脾臓、脳、小腸でpro-IL-1 β (IL-1 β 前駆体) タンパク発現が上昇するが、血清中IL-1 β は変化しないことを見出した。このMDPにより組織に蓄積されたIL-1 β 前駆体が、LPSによるcaspase-1活性化を介したIL-1 β 産生を著しく上昇させ、これがエンドトキシンショックを誘導するメカニズムの一端であると考えられた。さらに、この血清におけるIL-1 β レベル上昇は、クロドロネート含有リボソーム前投与により著しく減少したため、エンドトキシンショック増強にはマクロファージが関与することが示唆された。一方でTNF- α KOマウスでMDPの増強作用が減弱するメカニズムは、サイトカインシグナル伝達の主要な経路であるJak-Statシグナル伝達経路を抑制する分子 (SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling-1) がMDP投与により発現減少することに起因すると考えられた(図1)¹⁾。

1-2. マクロファージにおける Alendronate による IL-1 β 前駆体産生誘導と Clodronate によるその抑制

ビスフォスフォネート (BPs: bisphosphonates) は骨転移しやすい悪性腫瘍、骨粗しょう症、多発性骨髄腫など、骨吸収亢進がその病態形成に関与する疾患に対する治療薬として用いられてきた。BPsには窒素(N)を含むBPs(NBPs)と含まないBPs(non-NBPs)があり、NBPsは骨吸収抑制作用が強いが、一方で炎症・壊死作用も強い。BPsの副作用として顎骨壊死(BP-related osteonecrosis of the jaw; BRONJ)が2003年に報告され、これはほぼNBPs投与によるものであり²⁾、現在では他の骨関連事象の治療薬でも顎骨壊死が報告されているため、薬剤関連顎骨壊死 (medication-related osteonecrosis of the jaws: MRONJ) として知られている。顎骨壊死のトリガーとして、抜歯などの歯科治療が考えられており、口腔内細菌の関与が示唆されていた。筆者らはWTマウスにAlendronate (NBPs) を投与すると、肝臓や脾臓、肺でIL-1 β 前駆体タンパク発現が上昇し、この上昇にはマクロファージが関与することを見出した。ここに抜歯などによりLPS刺激が介在することでIL-1 β 産生が増強され、発熱や顎骨壊死などの原因になると考えられた。さらにこのAlendronateによるIL-1 β 前駆体発現上昇は、non-NBPsであるClodronateにより抑制された(図2)。これらの結果は、non-NBPsがNBPsの代用薬・併用薬として有効である可能性を示唆しており^{2,3)}、臨床においても期待した結果が得られている⁴⁾。

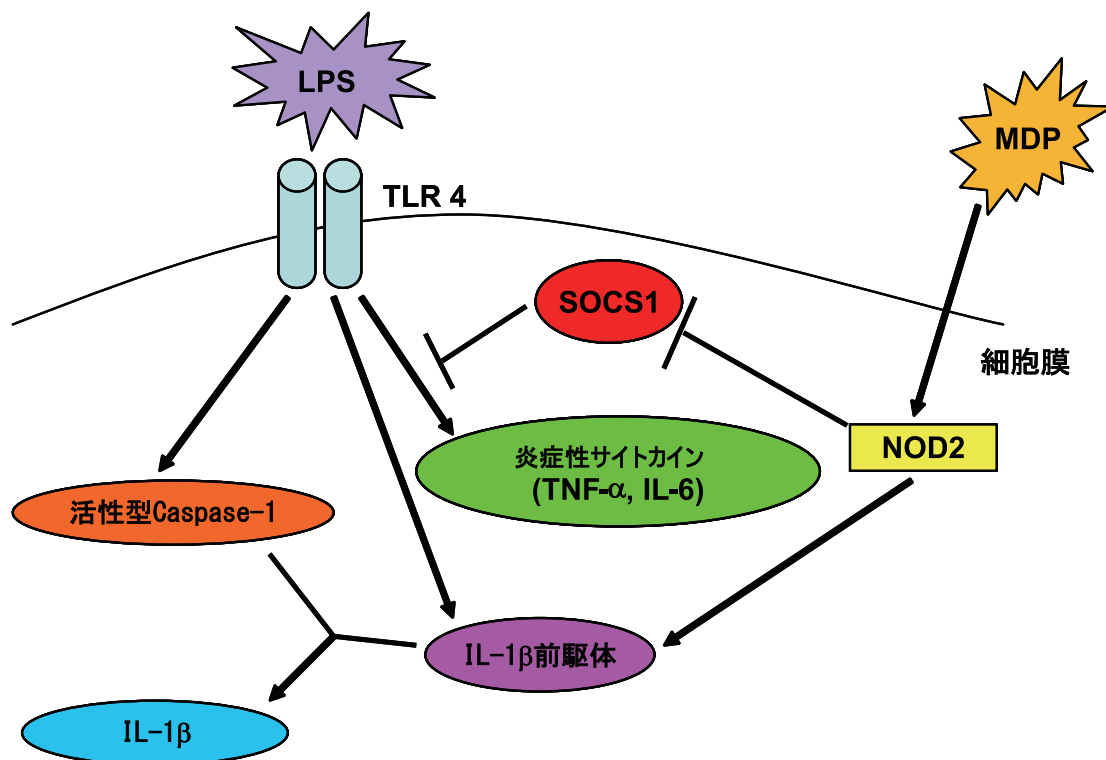


図1 MDPのエンドトキシンショック増強作用のメカニズム

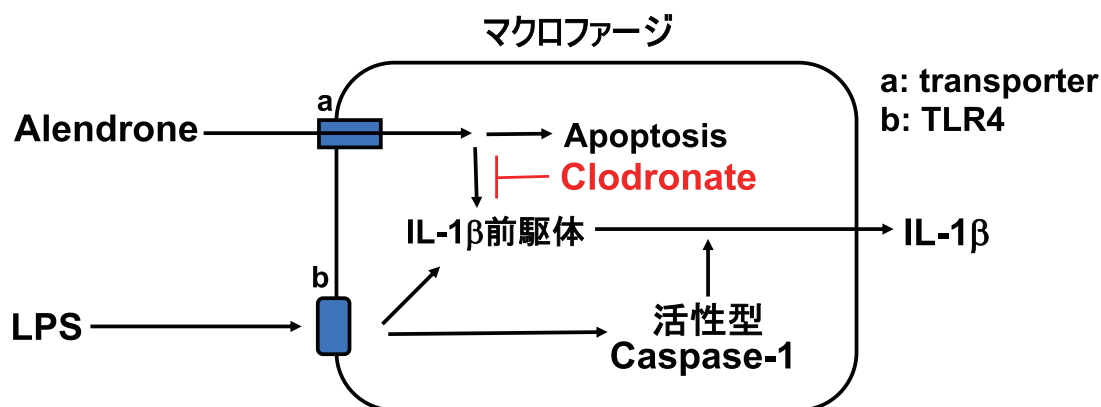


図2 マクロファージにおける Alendronate による IL-1 β 前駆体産生誘導と Clodronate によるその抑制メカニズム

1-3. 飽和脂肪酸が唾液腺疾患・歯周疾患病態に及ぼす影響

近年、食生活の欧米化、過食、運動不足等生活習慣の乱れから肥満による内臓脂肪の増大や脂質異常を認める日本人が多くなってきている。肥満によるこの様な変化は、脂肪組織からの過剰な遊離脂肪酸の放出やアディポカインとして称される多様な生理活性タンパク質の分泌異常により、全身的な代謝異常や無菌性炎症反応を引き起こすと考えられている。この遊離脂肪酸、特にパルミチン酸等の飽和脂肪酸は、内因性リガンドとして Toll 様受容体 (toll-like receptor; TLR) 4 を刺激し、遠隔組織で炎症シグナルを活性化することが明らかになっている。TLRs は自然免疫における病原体の認識に重要な受容体であり、免疫担当細胞のみならず、上皮細胞や線維芽細胞にも発現しており、臨床研究では脂質代謝異常とシェーグレン症候群 (慢性炎症により唾液腺腺組織が破壊され、外分泌障害をきたす中年女性に好発する自己免疫疾患) や歯周炎の関連性を示す報告もあることから、その分子基盤を解明すべく、研究を行った。ヒト唾液腺上皮細胞株をパルミチン酸刺激すると、濃度・時間依存的に炎症性サイトカインである IL-6 産生が誘導されたが、ヒト表皮角化細胞株では誘導されなかった。この IL-6 産生は、他の飽和脂肪酸であるステアリン酸刺激でも確認されたが、オレイン酸やリノール酸等の不飽和脂肪酸では確認されなかった。さらにパルミチン酸によりヒト唾液腺上皮細胞はアポトーシスし、自己抗原となる断片化 α -fodrin が誘導された⁵⁾。歯周組織においては、歯肉線維芽細胞に脂肪酸取り込みに関与する CD36 が発現しており、高脂肪食負荷によりその発現レベルが上昇することを見出した。ヒト歯肉線維芽細胞においてパルミチン酸は CD36 を介し IL-6、IL-8、CXCL1 等の炎症性サイトカイン・ケモカイン産生を誘導し、多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) との共刺激によりそれら産生が有意に抑制された。さらに歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* LPS またはそ

の死菌体とパルミチン酸との共刺激により、IL-8、CXCL1 産生が増強した⁶⁾。これらメカニズムにより飽和脂肪酸は唾液腺疾患・歯周疾患病態形成に関与していると推察され、これら知見を筆者らは総説としてまとめている^{7,8)}。

2. 獲得免疫学的解析

2-1. 加齢及び自己免疫疾患に起因する唾液分泌障害の病態モデルマウスによる共通基盤病態の探索

我が国は超高齢社会に突入したことから、健康と若さを可能な限り保ちながら年を重ねることを可能にする医学、即ち抗加齢医学の発展が求められている。近年、加齢関連疾患の病態形成に老化細胞の蓄積、および非感染性かつ低活動性の慢性炎症 (Inflammaging) が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。唾液腺の加齢変化として、腺房細胞の減少、線維化、リンパ球浸潤が知られており、これに伴い唾液分泌量が減少する。またシェーグレン症候群患者唾液腺の病理組織学的所見としても、線維化およびリンパ球浸潤が知られている。程度の違いこそあれ、加齢及びシェーグレン症候群に起因する唾液分泌障害を有する患者には、共通した病理学的所見、即ち線維化やリンパ球浸潤が認められることから、本研究では両者に共通した病態基盤があるのではないかという作業仮説を立て、研究を行った。自然老化 (老齢) マウス唾液腺に浸潤する免疫細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、加齢に伴い自然免疫を担うマクロファージや樹状細胞の集積は確認されず、B 細胞や CD4、CD8 陽性 T 細胞集積が顕著であった。このリンパ球集積メカニズムを明らかにするため、老齢マウス唾液腺上皮細胞を Magnetic cell sorting 法により単離し、その遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、若齢マウスと比較し、自然免疫やリンパ球集積に関与するケモカイン遺伝子発現が老齢マウスで上昇していたが、その中でも筆者らは CXCL13 というケモカインに着目した。CXCL13 は B 細

胞誘引ケモカインとしても知られており、その受容体はCXCR5である。CXCR5は加齢に伴い増加し、CD44^{high}CD62L^{low} CD4 陽性細胞である老化関連T(SA-T)細胞にも発現しており、老齢マウス唾液腺においてSA-T細胞の集積が確認された。興味深いことに、シェーグレン症候群モデルマウス唾液腺では上皮細胞老化が亢進しており、SA-T細胞集積も確認された。このモデルマウス唾液腺上皮細胞ではCXCL12ケモカイン発現が亢進していることが報告されていたため、SA-T細胞のCXCR4(CXCL12受容体)発現を解析したところ、老齢マウスSA-T細胞とともにその発現が確認された⁹⁾(図3)。

2-2. ヒトとマウスの加齢に伴う涙液分泌変化の相違とアディポネクチンの関連性

ドライアイは多因子による疾患であり、その原因の1つに加齢性涙液分泌の低下がある。筆者らはシェーグレン症候群の病態解析を動物モデルで行う中で、唾液腺とは異なった病態変化が涙腺で確認されたため、本研究を開始した。マウスなど齧歯類では加齢変化として、涙腺ではリンパ球浸潤を伴う組織破壊が起こるが、涙液分泌量はむしろ増加することが知られていたが、そのメカニズムは十分理解されていなかった。まず筆者らは老齢マウスや高脂肪食負荷マウスを用い、この涙液分泌量増加は、加齢に伴う体重増加や、糖代謝・脂質代謝異常に起因しないことを明らかにした。また、老齢マウス涙腺に集積するリンパ球の特徴として、SA-T細胞が特にメスマウス涙腺に集積することを明らかにした。若齢・老

齢マウス涙腺から上皮細胞を単離し、その遺伝子発現を比較すると、老齢マウス涙腺において転写因子の1つであるperoxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR γ)発現が顕著に上昇していた。また、善玉アディポカインとしても知られているアディポネクチン受容体の1つであるAdipoR2発現が老齢マウス涙腺で上昇しており、この変化は高脂肪食負荷マウス涙腺では確認されなかった。以上の結果より、PPAR γ 及びAdipoR2を介したシグナルが老齢マウスにおける涙液分泌増加に関与している可能性があり、これらがヒトにおけるドライアイ治療のターゲット分子になる可能性が示唆された¹⁰⁾。

おわりに

歯科医師という背景から、これまで顎顔面領域の疾患病態形成メカニズム・全身状態の関連性に関する基礎研究を行ってきた。今後は臨床応用も見据え、ヒトサンプルを用いた研究・臨床研究を積極的に行っていきたいと考えている。

謝辞

第27回日本エンドトキシン・自然免疫研究会において日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞を受賞するにあたり、受賞対象となった自然免疫・獲得免疫に関する一連の研究は多くの研究機関との共同研究により実施されたものであり、東北大学大学院歯学研究科(口腔分子制御学分野、歯内歯周治療学分野)、徳島大学(糖尿病対策センター、口腔分子病態学分野、歯周

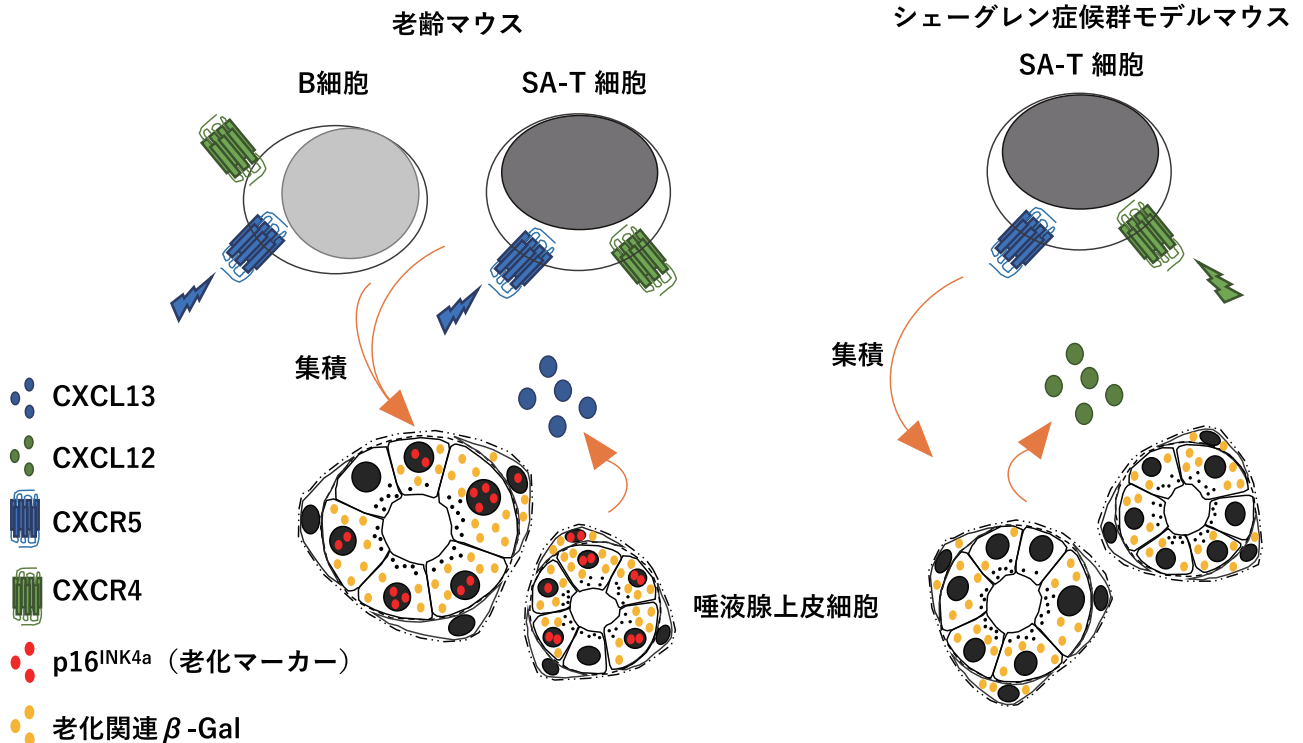


図3 加齢及び自己免疫疾患による唾液腺リンパ球浸潤メカニズム

菌内治療学分野), 国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部など, 多くの共同研究者の先生方に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Shikama Y, Kuroishi T, Nagai Y, et al. : Muramyl dipeptide augments the actions of lipopolysaccharide in mice by stimulating macrophages to produce pro-IL-1 β and by down-regulation of the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *Innate Immun* 17 : 3-15, 2011.
- 2) 遠藤康男, 船山ひろみ, 山口 晃史, 他 : 骨吸収抑制薬 bisphosphonates による顎骨壊死の機序・予防・治療に関する基礎研究. *Yakugaku Zasshi* 140 : 63-79, 2020.
- 3) Shikama Y, Nagai Y, Okada S, et al. : Pro-IL-1 β accumulation in macrophages by alendronate and its prevention by clodronate. *Toxicol Lett* 199 : 123-128, 2010.
- 4) Oizumi T, Yamaguchi K, Sato K, et al. : A Strategy against the Osteonecrosis of the Jaw Associated with Nitrogen-Containing Bisphosphonates (N-BPs): Attempts to Replace N-BPs with the Non-N-BP Etidronate. *Biol Pharm Bull* 39 : 1549-1554, 2016.
- 5) Shikama Y, Ishimaru N, Kudo Y, et al. : Effects of free fatty acids on human salivary gland epithelial cells. *J Dent Res* 92 : 540-546, 2013.
- 6) Shikama Y, Kudo Y, Ishimaru N, et al. : Possible Involvement of Palmitate in Pathogenesis of Periodontitis. *J Cell Physiol* 230 : 2981-2989, 2015.
- 7) Shikama Y : Free fatty acids may be involved in the pathogenesis of oral-related and cardiovascular diseases. *Journal of Oral Biosciences* 60 : 65-69, 2018.
- 8) Shikama Y, Kudo Y, Ishimaru N, et al. : Potential Role of Free Fatty Acids in the Pathogenesis of Periodontitis and Primary Sjögren's Syndrome. *Int J Mol Sci* 18 : 836, 2017.
- 9) Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M, et al. : Chemokines Up-Regulated in Epithelial Cells Control Senescence-Associated T Cell Accumulation in Salivary Glands of Aged and Sjögren's Syndrome Model Mice. *Int J Mol Sci* 22 : 2302, 2021.
- 10) Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, et al. : Involvement of adiponectin in age-related increases in tear production in mice. *Aging (Albany NY)* 11 : 8329-8346, 2019.