

T細胞応答性から捉えた歯周病に対する疾患感受性の 個体差に関する免疫遺伝学的研究

大山秀樹

兵庫医科大学 医学部 病理学講座／機能病理部門

Immunogenetic studies on diversities of T-cell responsiveness regulating individual susceptibility to periodontal disease.

Hideki Ohyama

Department of Pathology, Hyogo College of Medicine

はじめに

侵襲性歯周炎(AgP)は家族性に発症することが多い。この点についての患者に対する説明に、“体質”とか“家系”といった言葉が使われる。これらの言葉を科学的に考えれば、歯周病原細菌のある抗原に対する免疫応答の個体差と解釈することができる。また、“家系”という言葉についても、歯周病に対する感受性が遺伝的拘束を受けて家族間で似通っていることを説明するために用いる。難治性の歯周炎患者にその病態を説明する際において、我々はこれら“体質”とか“家系”などの言葉を「逃げ口上」として用いてきた感がある。しかし、この“歯周病にかかりやすい体質”とはいったい何なのか。このことは、私にとって研修医時代からの疑問であり、またライフワークとする研究の根幹をなす命題となった。

私が岡山大学歯学部歯科保存学第2講座(主宰：村山洋二教授、現：岡山大学大学院医歯薬学研究科病態

機構学講座歯周病態学分野)に入局した当時は、様々な疾患に関する病態およびそれら疾患に対する感受性の個体差を遺伝性素因、特に遺伝子のレベルで説明する遺伝子診断の現実性が見え始めた時代であった。PCR法による遺伝子増幅を各研究室レベルで行えるようになったことがその追い風となった。歯周病に関する研究においても、感受性の違いを様々な遺伝的側面から捉えようとする試みが数多く行われた。なかでも、二卵性双生児に比較して一卵性双生児の方が歯周炎発症の一致率が高いという疫学的研究¹⁾は、今においても歯周病の発症に遺伝性素因とりわけ遺伝子が関わっていることの正当性を示す根拠となることが多い。これらの研究は、分子生物学的技術の向上とともに、様々な遺伝子の多型性と歯周病に対する感受性との相関を探る疫学的研究へと発展することになる。

これら研究の潮流において、私は、歯周病細菌に対するT細胞応答性の個体差に着目した免疫遺伝学のおよび分子病理学的観点から研究を進めてきた。私がその研究の対象として着目した遺伝性素因は、ヒト白

連絡先 大山秀樹

〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町1-1

兵庫医科大学 医学部 病理学講座／機能病理部門

Hideki Ohyama

Department of Pathology, Hyogo College of Medicine

1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya 663-8501, Japan

E-mail : ohyama@hyo-med.ac.jp

血球型抗原 (human leukocyte antigen ; HLA) の多型性およびサイトカイン受容体の発現である。私は、これらに関する論理を展開する上で、ハンセン病を歯周病の疾患モデルとして位置づけ、両疾患間において双方向的な研究を行ってきた。

本稿では、歯周病に対する疾患感受性の個体差を T 細胞応答性の違いから捉えようとした免疫遺伝学的研究について、私が行ってきた研究の経緯とその背景を加えて紹介する。

1. クラス II HLA 分子多型から捉えた歯周病に対する疾患感受性

1) HLA との出会い

私が歯科保存学第 2 講座に入局した当時、同講座には複数の研究グループが存在し、新入医局員は各グループに配属された。私が配属されたのは、大学院を修了されたばかりの高柴正悟先生(現：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授)が率いるグループであった。先生は、大学院時代に AgP 患者における HLA の多型解析を研究テーマとされていた。その継続として、AgP 患者の HLA タイプの同定を検査レベルで行えるようになることが、私に課せられた最初の課題であった。これが、私と HLA との出会いであるが、この配属が私の一生を左右する出来事になることを、当時の私には全く予想することができなかった。

HLA 分子は抗原提示細胞膜上に発現し、抗原ペプチドと複合体(HLA-ペプチド複合体)を形成する。T 細胞は抗原分子と T 細胞レセプター (TCR) を直接結合して抗原認識することはなく、プロテアーゼによって分解されたオリゴペプチド抗原と HLA 分子の結合によって形成された複合体と結合することによって抗原を認識する。HLA 分子は、クラス I 分子 (HLA-I) とクラス II 分子 (HLA-II) に大きく分けることができる。現在では、クロスプレゼンテーション(樹状細胞においてみられる HLA-I 分子による外来抗原ペプチドの提示)といった例外的な事象が存在することが明らかとなっているが、当時、内在性の抗原ペプチドは HLA-I 分子によって CD8 陽性の T 細胞に、また外来性の抗原ペプチドは HLA-II 分子によって CD4 陽性の T 細胞に認識されるとされていた。そのために、歯周病などの感染症においては、外来性の抗原タンパクがその免疫応答に深く関与することから、HLA-II 分子の拘束を受けた Th 細胞応答性の病態への関わりが論じられた。HLA-II 分子は、HLA-DR, DQ, DP のサブクラスに分類され、さらにそれぞれのサブクラスごとに数種類のタイプが存在する。これら HLA 分子のタイプを特定する作業は、その当時、被験者の末梢血単核球から B 細胞を採取し、各タイプに対して特

異的な抗血清を用いた血清学的タイピングが主流であった。この血清学的タイピング法を用いて特定された HLA-II のタイプと種々の病型の歯周病患者との相関を示す報告は数多く存在したが、その結果は様々であった²⁾。高柴先生はその学位論文において、1) AgP 患者の HLA-II 分子のタイプを血清学的タイピングで特定した結果、そのタイプに偏りは見られなかったこと、2) HLA-II 遺伝子の多型に着目した結果、侵襲性歯周炎患者数名において、HLA DQβ鎖遺伝子 (*HLA-DQB1*) の第 3 エクソンの 5'側上流のイントロン部に制限酵素 *Bam*HI によって消化される部位を有する特徴的な遺伝子型を検出したことを示された³⁾。私がある一連の研究に始めて携わったのは、AgP 患者集団においてこの *HLA-DQB1* における *Bam*HI 認識部位を有する遺伝子型の検出頻度を調べる疫学的研究であった。その結果、*HLA-DQB1* 第 3 エクソンの 5'側上流のイントロン部にみられる *Bam*HI 認識部位は、AgP 患者において、有意に多く検出された。その反面、健常者および慢性歯周炎患者においてその検出頻度に有意な差はみられなかった。以上のことから、HLA の多型を遺伝子レベルで捉えることによって、あるタイプの AgP 患者集団を規定できるかもしれないという可能性が示された⁴⁾。なお近年には、11 歳から 16 歳の日本人限局型侵襲性歯周炎患者を対象として AgP と相関することが既に報告されている様々な遺伝子多型を調べた結果、*HLA-DQB1* の *Bam*HI 認識部位においてのみ有意な相関が検出されたとの報告もある⁵⁾。

2) AgP 患者における HLA 遺伝子型の検索

我々が *HLA-DQB1* に関する研究を行っていた当時は、HLA タイプを血清学的分類によって表記することが中心であった時代から、遺伝子型で捉えられる時代へと変遷する移行期にあった。私は、遺伝子のレベルで評価することの必要性を感じたため、東海大学医学部分子生命科学(主宰:猪子英俊教授)の門を叩いた。当時、世界レベルにあった PCR-RFLP 法による HLA-II 遺伝子型の DNA タイピング技術を習得することによって、日本人 AgP 患者の HLA-II 遺伝子型を調べることができた⁶⁾。その結果、1) AgP 患者において、DRB1*1501, DRB1*1401, DQB1*0602 および DQB1*0503 の各遺伝子型が高頻度に検出され、逆に DRB1*0405 および DQB1*0401 の検出頻度が低いこと、2) *HLA-DQB1* 遺伝子の第 3 エクソンの 5'側上流のイントロン部にみられる *Bam*HI 認識部位は、AgP 患者において高頻度に検出された DRB1*1501-DQB1*0602 ハプロタイプと連鎖不平衡の関係にあることが、それぞれ明らかとなった。なお、

日本人集団において、DRB1*1501 と DQB1*0602、DRB1*1401 と DQB1*0503 および DRB1*0405 と DQB1*0401 の各対立遺伝子の組み合わせは、連鎖不平衡の関係にあるため、同一染色体上に存在する頻度が極めて高く、ハプロタイプを形成する。そのため DRB1*1501 を有する個体は DQB1*0602 を、DRB1*1401 を有する個体は DQB1*0503 を、また DRB1*0405 を有する個体は DQB1*0401 を有する場合が極めて多く、我々が対象とした被験集団においても例外ではなかった。その後、複数の研究者によって歯周病患者における HLA 遺伝子型が調べられている⁷⁻¹¹⁾が、その結果は人種によって異なる。しかし、我々の報告の後、漢民族において DRB1*1501 が AgP 患者および重度 CP 患者に高頻度に検出されたことが複数報告されている^{10,11)}ことから、黄色人種においてその相関がみられるとも考えられる。さらに、歯周病原細菌感染の関与がその病態に指摘される Burger 病患者において DRB1*1501 が高頻度に検出されること¹²⁾についても興味深い。

3) AgP 患者の T 細胞応答性を規定する抗原ペプチドの検索

疫学的研究によって示された HLA 分子と疾患感受性との相関は、それに関わる機序が分子レベルで示されることによって、創薬開発などの様々な領域での応用性が広がる。このことを考える上で、HLA-ペプチド-T 細胞レセプター (TcR) の相互作用の理解が必要となる。HLA はその分子の先端部分に溝状の構造を有しており、その中に抗原ペプチド断片が収容される。ホットドッグに例えると、HLA 分子がパンで、ペプチドがソーセージのような構造になっている。ここで重要な点は HLA の多型性は溝の内部に集中している点である。すなわち、異なる型の HLA 分子は溝の物理化学的性質(電荷の位置、疎水性、表面の形など)が異なる。このために異なる型の HLA は異なる抗原ペプチドを結合して T 細胞に提示する。これによって、「T 細胞に抗原提示されやすいペプチドの種類」に個体差が生じることになり、HLA の違いによる免疫応答性の個体差が生じる。その結果、病気に対する感受性が遺伝的に拘束を受けることになる。例えば、多発性硬化症と DR2¹³⁾、慢性関節性リウマチと HLA-DR4^{14,15)}などは良い例であり、それら病態に深く関わる免疫応答を誘導するであろうと考えられる抗原ペプチドがアミノ酸レベルで特定されている。これらの疾患と同様に、歯周炎の病態を免疫遺伝学的観点から明らかにするためには、歯周病患者、特に AgP 患者の免疫応答に共通して関わる抗原ペプチドをアミノ酸レベルで捉えることが急務であった。私はこの命

題解決のために必要となる技術および学識を得るために、その当時、HLA 拘束性の T 細胞応答の解析による疾患の病態研究において世界的に著名であった熊本大学医学部免疫識別学講座(現:熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野、主宰:西村泰治教授)の門を叩き、松下祥先生(現:埼玉医科大学免疫学講座教授)に師事を仰いだ。抗原特異的に応答する T 細胞株およびクローンを末梢血単核球から樹立することに始まり、その応答性の解析方法、さらには命題解決に対する様々な戦略を学んだ。歯周病患者を対象とした T 細胞応答性に関する免疫遺伝学的研究を展開しようとした場合、歯周病が雑多な菌感染による疾患であることは最大の問題となる。我々は、Ag53 と呼ばれる *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 菌の抗原蛋白に対する応答性を一つのモデルとして取り上げた。この蛋白は 450 のアミノ酸から構成されており、歯周病患者の大半は、この Ag53 に対して多量の抗体を産生することが知られている¹⁶⁾。この抗原蛋白に対する歯周病患者の免疫において、どの領域が HLA 分子によって提示されて T 細胞に認識されるかを調べた。AgP 患者(6名)および健常者(16名)から Ag53 に対して特異的に応答する末梢血単核球由来 T 細胞株を樹立してその応答性を比較した¹⁷⁾。その結果、141 番目から 161 番目の 20 アミノ酸からなる限られた領域が AgP 患者の T 細胞によって高頻度に認識されることが明らかとなった。また、患者の血清 IgG 抗体においても、同じ領域が認識されやすいことが明らかとなったことから¹⁸⁾、同領域に含まれるアミノ酸配列によって構成されるペプチド(Ag53p141-161)が、AgP 患者の Pg に対する免疫応答性を規定する共通抗原であるという可能性が高まった(図 1)。さらに、Ag53p141-161 に対する T 細胞応答性において HLA-II 拘束がどのように関与するかを調べた結果、1) AgP 患者に高頻度に検出される DRB1*1501-DQB1*0602 を有する個体は、この抗原ペプチドに対する T 細胞応答が誘導されやすいこと、また 2) DRB1*1501-DQB1*0602 を有さない患者は、治療による抗原量の大幅な減少に伴って Ag53p141-161 に対する T 細胞応答を示さなくなるにもかかわらず、DRB1*1501-DQB1*0602 を有する患者は、Ag53p141-161 に対する T 細胞応答が誘導され続けることについても明らかとなった。これらの結果から、Ag53p141-161 に対する T 細胞応答性が、1) 歯周病患者の活動性を知る上でのマーカーとなること、さらに 2) Agp 患者集団に DRB1*1501-DQB1*0602 を有するヒトが有意に多く検出される疫学的結果を免疫遺伝学的観点から説明する上において鍵となるかもしれないことが示された。

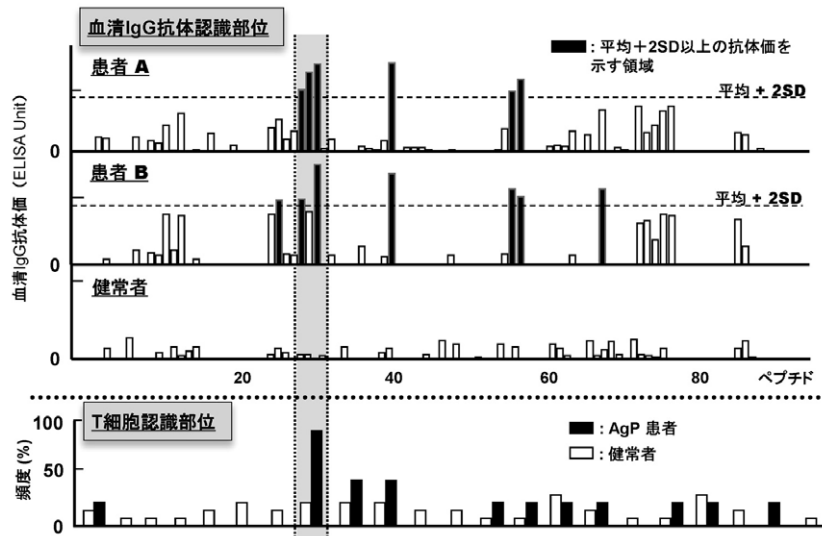


図1 Ag53における歯周病患者由来 T細胞および血清 IgG 抗体による認識部位。

Ag53の全アミノ酸配列に基づいて合成したペプチドを用いて AgP 患者の血清 IgG 抗体および T 細胞によって認識される部位を同定・比較した。血清 IgG 抗体による認識部位は ELISA 法を用いることによって、また T 細胞認識部位は被験者末梢血単核球から樹立した T 細胞株の増殖活性を評価することによって特定した。AgP 患者 T 細胞株によって高頻度に認識される 141 番目から 161 番目の領域(灰色部分)は、患者由来の血清 IgG 抗体によっても高頻度に認識された。

2. ハンセン病を疾患モデルとして捉えた歯周病に対する疾患感受性

1) ハンセン病との出会い

私は、8年間に亘って国立ハンセン病療養所においてハンセン病患者の歯科治療を行う機会を得た。このことがきっかけとなり、日米医学協力研究会らい専門部会(現：結核・ハンセン病部会)に研究員として参加し、ハンセン病に対する疾患感受性の個体差を免疫遺伝学的観点から明らかにしてきた。

ハンセン病は、抗酸菌である *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) 感染によって引き起こされる感染症である。*M. leprae* は、未だに人工培地において培養することが不可能であり、生体における増殖も非常に緩慢である。2001年、Coleらによって *M. leprae* のゲノム解析が行われた結果、*M. leprae* の全遺伝子の中で、約半数の遺伝子が偽遺伝子で占められており、発現していないことが明らかとなった¹⁹⁾。この非常に退行性の進化を遂げた *M. leprae* は、病原性に関わる毒素を有しておらず、ハンセン病患者に見られる症状の多くは、菌自体の毒素によるものでなく、菌に対する免疫応答によって引き起こされる。ハンセン病が「免疫病」と言われる所以はここにある。ハンセン病における最大の特徴は、単一細菌によるものとは思えない幅広い病型スペクトルを呈するという点にある。

表1 ハンセン病の免疫反応に基づく病型分類。

特徴	病型		
	L型 (らい腫型)	B型 (境界型)	T型 (類結核型)
<i>M. leprae</i> (病巣)	++++	++	±
細胞性免疫応答 (レプロミン反応)	-	-~±	+++
体液性免疫応答 (抗 <i>M. leprae</i> 抗体)	++++	++	+~±

すなわち、らい腫型(L型)のハンセン病は *M. leprae* に対する細胞性免疫応答の欠落による *M. leprae* 易感染性を、また類結核型(T型)のハンセン病では強い細胞性免疫応答による *M. leprae* 感染に対して抵抗性を示すと捉えられている(表1)。これらの分類は、感染に対して各患者が示す免疫応答性に着目した Ridley&Jopling の分類²⁰⁾として現在広く用いられている。これら各患者における病型の違いは、*M. leprae* が抗酸菌(細胞内寄生菌)であることから、*M. leprae* に由来する様々なコンポーネントに対する細胞性免疫応答性の個体差に起因すると考えられており、典型的なヒト型の Th1 / Th2 disease のモデルとして捉えることが可能である。一方、ハンセン病患者の約半数は家族性に発症する。インド人を対象にした双生

児における発症一致率さらには病型一致率を調べた疫学的研究において、1卵生双生児における一致率は、2卵生双生児におけるそれに比べて有意に高いこと(1卵生双生児:52%, 2卵生双生児:22%)が報告されている²¹⁾。この結果が示すように、ハンセン病患者の病型および感受性の違いには遺伝的要因が大いに関与することが知られている。

2) ハンセン病の病態に関わる遺伝性素因

ハンセン病に対する疾患感受性あるいは病型の成立を規定する遺伝性素因として、1) HLA, 2) PARK2/PACRG (Parkin and the Parkin co-regulated gene), 3) SLC11A1 (solute carrier protein 11A1, iron transporter), 4) NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1), 5) HSPA1A (heat shock protein 70 kDa protein 1A), 6) TAP (transporter associated with antigen processing), 7) Toll 様受容体, 8) ビタミン D レセプター, 9) TNF- α , IFN- γ , IL-10 および IL-12 等の細胞性免疫に関わる各種サイトカインおよびそれら受容体などの遺伝子多型が取り上げられている²²⁾。人種間においてそれら報告は様々であるが、ここでは、ハンセン病患者における a) HLA-II 分子の多型性, b) 細胞性免疫に関わるサイトカインおよびサイトカイン受容体遺伝子の多型性に関する研究について、我々の研究結果と合わせて紹介する。

(a) HLA-II 分子

HLA-II 分子の多型とハンセン病に対する感受性あるいは病型との相関については数多く報告されており、DR2 および DQw1 が複数人種の L 型および T 型患者集団において、また DR3 が欧米人種を中心とした T 型患者集団において有意に多く検出されている²³⁾。DR2 および DQw1 は血清学的方法で分類されるタイプであり、DRB1*1501 および DQB1*0602 がそれぞれの亜型として含まれる。この DR2-DQw1 ハプロタイプを有する個体がハンセン病に対する感受性が高い理由は、L 型患者においては *M. leprae* に由来する分子量 65kDa の HSP (HSP65) を認識するサブレッサー T 細胞による免疫抑制の観点から^{24,25)}、また T 型患者においては *M. leprae* に由来するヒト GroES hsp10 様 10kDa 蛋白に対する T 細胞の高応答性²⁶⁾ から、それぞれ説明されている。

Joko らは、日本人のハンセン病患者集団を対象として、DRB1*1501 および DQB1*0602 がすべての病型において有意に多く検出されたことを報告している²⁷⁾。我々も、ハンセン病患者を対象として、前述の AgP 患者に多く見られる *HLA-DQB1* 遺伝子の

*Bam*HI 認識部位の保有頻度について調べた結果、すべての病型(特に T 型)のハンセン病患者集団において、有意に多く同遺伝子多型が検出された²⁸⁾。この遺伝子多型が前述の通り DRB1*1501-DQB1*0602 と連鎖不平衡の関係にあることを考慮すると、我々も *HLA-DQB1* 遺伝子に存在する *Bam*HI 認識部位を検出マーカーとして、Joko らが示した結果と同様の結果を得ていたと解釈することができる。

(b) サイトカインおよびサイトカイン受容体

M. leprae に対する細胞性免疫応答の個体差を評価することは、ハンセン病の病態を明らかにする上で鍵となる。この観点から、Th1 細胞の応答性に関わるサイトカイン群を対象とした様々な免疫遺伝学的研究が展開された。なかでも、IL-12 / IFN- γ 経路は、*M. leprae* に対する免疫機構の中できわめて重要な役割を果たしていることから、それら研究の対象となってきた。主として単球/マクロファージなどの抗原提示細胞から産生される IL-12 は、Th1 応答を誘導する最も強力なサイトカインであり、T 細胞に IFN-g 産生を誘導する。産生された IFN- γ は、単球/マクロファージを活性化させる。ハンセン病患者において、この経路に関わるサイトカインおよびその受容体の発現量および蛋白構造が遺伝的拘束を受けることによって、疾患の感受性および病型の形成が規定されている可能性がある。また一方で、この経路の抑制性サイトカインである IL-10 を対象とした研究についても行われ、その遺伝子多型がハンセン病に対する感受性を規定する可能性も示されている。

我々は、ハンセン病患者が示す細胞性免疫応答の特異性を明らかにする過程において、IL-12 レセプター (IL-12R) に着目した免疫遺伝学的研究を進めてきた。IL-12R は、 β 1 鎖および β 2 鎖からなるヘテロダイマーである。ヒト IL-12 分子との結合において、 β 1 鎖および β 2 鎖は同等に関与するが、IL-12R β 2 鎖の発現量の違いが、Th1 / Th2 細胞の分化誘導において中心的な役割を果たしている²⁹⁾。Kim らは、この IL-12R β 2 分子の病巣局所における遺伝子発現量が、T 型ハンセン病患者に比べて L 型患者のほうが有意に低下していることを報告した³⁰⁾。我々は、日本人のハンセン病罹患既往歴を有する者を対象として、IL-12R β 2 鎖遺伝子 (*IL12RB2*) の転写制御領域の多型解析を行った。その結果、1) L 型患者 *IL12RB2* 遺伝子の -1035, -1023, -650 および -465 の 4 種類のポジションにおいて一塩基多型 (SNPs) が高頻度に検出されること、2) それらすべ

でのポジションが野生型の塩基配列からなるハプロタイプをハプロタイプ1とした場合、L型患者のハプロタイプ1保有頻度がT型患者および健常者に比べ有意に低いこと、また、3)それらのポジションの一つまたは複数のSNPsを含むハプロタイプは、ハプロタイプ1に比べて転写活性が低いことが明らかになった³¹⁾。これらの結果から、*IL12RB2*の転写制御領域の多型が、IL-12R β 2鎖の遺伝子発現に影響することによって、ハンセン病患者の病型成立機序に関わることが示唆された。さらに、ハプロタイプ1ホモ接合体である被験者から採取したT細胞は、他の被験者由来のT細胞に比べて、有意に高いIFN- γ 産生を示すことから³²⁾、同SNPsは、すべてのヒトにおいて、各個体の細胞性免疫応答性の強弱を規定する遺伝性素因の一つであると考えられる。

3) ハンセン病から学ぶ歯周病に対する疾患感受性
歯周病原細菌に対する防御およびその疾患感受性の個体差を評価するにおいて、T細胞が産生するサイトカイン・プロファイルの違いがその病態に如何に関わるかについては議論の分かれるところである。歯周病病巣局所における遺伝子発現の違いを網羅的に調べることは、その命題に対する答えを得る上で重要な手掛かりとなり得る。過去において、組織レベルおよび末梢血レベルでのTh2産生性サイトカインの優勢を示す報告が見られるが、逆に、Th1およびTh0の優勢を示す報告もあり、その研究結果は様々である³³⁾。さらに、これらの研究結果が示すTh1/Th2のアンバランスが、疾患形成の原因になっているのか、あるいは、疾患が形成された結果生じた生物反応を表現するものなのかについての答えを出すことは難しい。その一方で、喘息、アトピー性皮膚炎などのTh1/Th2バランスの異常が病態に関わる疾患に見られるSNPsについて、歯周病患者を対象とした遺伝子多型解析が世界各国で行われてきた。*IL2*、*IL4*、*IL6*および*IL10*の各遺伝子の転写制御領域の多型解析を行った研究がそれに相当する³⁴⁻³⁸⁾。

我々は、ハンセン病を歯周病の疾患モデルとして位置づけた。この研究戦略の合理性は、1)感受性および病型成立機序が遺伝的拘束を受けたTh1/Th2パラダイムによって説明されること、また、2)雑多な菌感染症である歯周病と異なり、ハンセン病が単一感染症であるのでモデルとして考えやすいことにある。さらに前述のJokoらの報告によると、日本人におけるすべての病型のハンセン病患者において、DRB1*1501、DQB1*0602の検出頻度が高く、逆にDRB1*0405、DQB1*0401の検出頻度が低い。この結果は、我々が

AgP患者集団を対象に行ったHLA-II遺伝子型の検索結果と全く一致しており、ハンセン病患者とAgP患者との間において、種々の抗原に対するT細胞の抗原認識パターンが類似する可能性についても考えられる。そこで、ハンセン病患者の遺伝子多型解析において発見した*IL12RB2*の転写制御領域に存在するSNPsについて、歯周病患者を対象にその保有頻度を調べた³⁹⁾。その結果、*IL12RB2*の転写制御領域に存在するSNPsは、慢性歯周炎(CP)患者および健常者に比較すると、AgP患者集団において有意に多く検出された。また、歯周炎患者をSNPs保有の有無によって2群に分類した場合、SNPsを保有する歯周炎患者群は、非保有患者群に比べて種々の臨床パラメーターにおいて重篤な症状を呈する傾向を示した。さらに、SNPs保有患者群の歯周病原細菌に対する血清IgG抗体価は、非保有患者群に比べて、複数の菌種にわたって有意に高いことが明らかとなった。このSNPsを有する個体に見られる高IgG産生性は、その遺伝的特徴である低細胞性免疫応答性によって、高い体液性免疫応答が誘導された結果であるとも解釈可能である。またさらに面白いことに、ハンセン病患者のL型患者におけるSNPsを含まないハプロタイプ1保有頻度に比較して、AgP患者集団におけるハプロタイプ1の保有頻度はさらに低い(図2)。以上のことから、*IL12RB2*制御領域の遺伝子多型は、AgPに対する感受性を知る上での遺伝マーカーになり得ること、また細胞性免疫応答が歯周炎の病態に関与する可能性が示された。

ハンセン病患者における歯周病の臨床状態を把握することを試みた疫学的研究も行われた⁴⁰⁾。その結果、非ハンセン病患者集団に比べてハンセン病患者集団のほうが、またT型患者集団に比べてL型患者集団における歯周病患者のほうが、有意に深い歯周ポケットを呈することが明らかとなった。これらのことに、L型ハンセン病患者の特徴である低細胞性免疫応答性が関与するのかも知れない。しかし、多くのハンセン病患者は、手指等に末梢神経障害による種々の程度の機能障害を有するため、プラークコントロール等の環境要因を統一することは難しい。そのため、ハンセン病患者において、遺伝性素因が歯周病に対する感受性に及ぼす影響を臨床所見のみから評価することは困難であると考えられる。

4) Th細胞研究におけるパラダイムシフトから捉えた歯周病に対する疾患感受性

Mosmannら⁴¹⁾によって、Th細胞がTh1細胞およびTh2細胞に亜群化されることが提唱されて以来、アレルギー疾患、自己免疫疾患、感染症等の様々な免

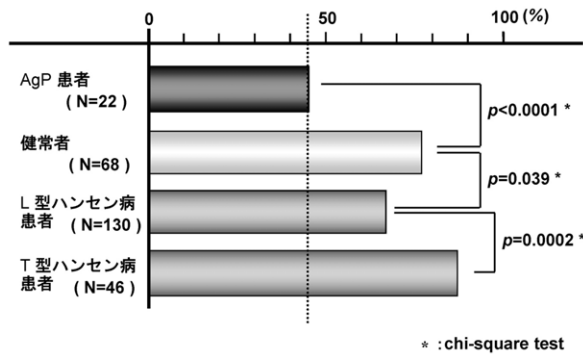


図2 AgP患者およびハンセン病患者における *IL12RB2* 転写制御領域ハプロタイプ1保有頻度の比較。

IL12RB2 転写制御領域の-1035, -1023, -650 および-465の4種類のポジションにおいてSNPsを含まないハプロタイプ1の保有頻度をAgP患者およびハンセン病患者で比較した。ハプロタイプ1保有頻度が低いL型ハンセン病患者に比べ、AgP患者ではさらに低い保有頻度を示す。

疫関連疾患の病態は、Th1 / Th2 パラダイムによって説明されてきた。しかし、近年、IL-17 産生性の新規 Th サブセット (Th17 細胞) の発見によって、Th 細胞研究はパラダイムシフトを迫られている⁴²⁾。従来、Th1 細胞が関与すると考えられてきた種々の自己免疫疾患の病態に、Th17 細胞が関与することが明らかとなってきた。また、Th17 細胞は、細胞外細菌および真菌に対する免疫応答を担い、炎症性骨破壊が引き起こされる過程においても中心的な役割を演じることが分かってきた⁴³⁾。IL-6 および TGF- β が naïve T 細胞に作用することによって、Th17 細胞は分化誘導されるが、その細胞増殖には IL-23 が関わる⁴⁴⁾。IL-23 は、マクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞によって産生される IL-12 ファミリーサイトカインである。IL-23 と IL-12 は p40 サブユニットを共通に有し、IL-23 は p19 サブユニットと、また IL-12 は p35 サブユニットとヘテロ 2 量体を形成する⁴⁵⁾。それらのリガンドとして、Th17 細胞は、IL-12R β 1 鎖と IL-23 レセプター (IL-23R) を、また Th1 細胞は前述の通り IL-12R β 1 鎖および IL-12R β 2 鎖を発現する。また一方、Th1 細胞から産生される IFN- γ が Th17 細胞の増殖誘導を阻止することから、前述の IL-12 / IFN- γ 経路と IL-23 / IL-17 経路とのバランスによって種々の疾患の病態が論じられるようになってきた。これらの観点に立つことによって、歯周病巣局所における IL-12 / IFN- γ 経路および IL-23 / IL-17 経路に関わる分子の発現プロファイルの検索を行った⁴⁶⁾。

その結果、歯周病患者の歯周外科処置時に採取した歯肉において、重度歯周病巣局所における IL-23 および IL-12 の発現が被験対照歯肉 (歯肉炎程度) に比べて有意に高いこと、また、被験対照歯肉に対する病巣局所での IL-23R の発現が IL-12R β 2 鎖の発現に比べて有意に高いことのそれぞれが明らかとなった。さらに、IL-17 の発現は、被験対照歯肉に比べて病巣歯肉 (特に病巣深部) において有意に高かった。その一方で、IFN- γ の発現については、両者間において有意な差は見られなかった。以上の結果から、IL-23 / IL-17 経路が歯周組織の破壊に関与することが示唆された。その一方で、IL-12 / IFN- γ 経路は、細菌感染に対する防御機構において重要な役割を演じているが、その活性が充分でない場合、IL-23 / IL-17 経路へのシフトが誘導され、歯周組織破壊へと繋がる可能性がある (図 3)。これらのことはすなわち、*IL12RB2* 制御領域の遺伝子多型を有する低細胞性免疫応答性宿主が、AgP に対する感受性が有意に高いことを支持する結果とも考えられる。

おわりに

私たちは、歯周病細菌に対する T 細胞応答性の個体差に着目することによって、“歯周病にかかりやすい体質”を科学的に解明する研究を行ってきた。その戦略において、「ヒト」を対象とした免疫遺伝学および分子病理学的研究を進めるために、ハンセン病を歯周病の疾患モデルとして位置付けた。ハンセン病患者が示す *M. leprae* に対する応答性のダイナミックさは、免疫学を志す者にとって大きな魅力であり、事実、私もその魅力に魅了された者の一人である。その現れとして、ハンセン病は制圧されつつある疾患であるにもかかわらず、決してその疾患を対象とした研究の数は少なくない。ハンセン病の病態研究が、免疫学、感染症学等の研究領域において、ヒト型の Th1/Th2 疾患モデルとして示唆に富むものとして考えられているからである。私たちはこれらの研究を通して、歯周病に対する感受性を考える上で細胞性免疫応答性の個体差が鍵となる可能性を示すに至った。この考え方は、IFN- γ が強力な破骨細胞誘導阻止因子であるという事実によっても後押しされているとも思われる⁴⁷⁾。今後、これら「ヒト」を対象として臨床に直結するトランスレーショナル・リサーチの実践が、歯周病に対する疾患感受性および活動性を評価するための診断ツール、ワクチン、さらにはペプチド・ゲノム創薬の開発に繋がるものと考えられる。

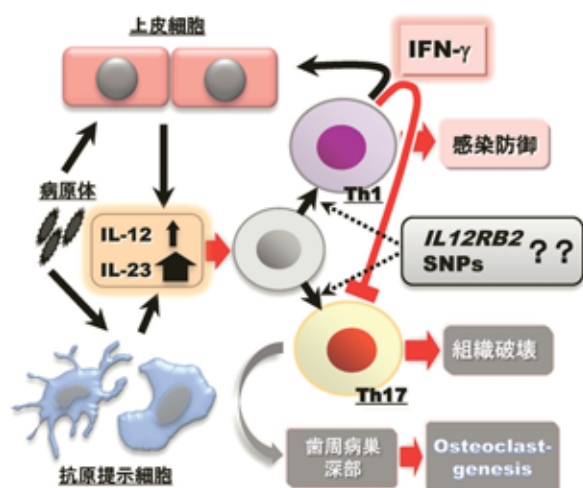


図3 歯周病巣における T 細胞の防御と破壊への関与(仮想図).

歯周病巣において IL-23p19 サブユニットの遺伝子は上皮内および炎症細胞浸潤部位に高発現する。組織破壊に関与する Th17 細胞は、IL-23 の存在によって増幅する。しかし Th17 細胞は、Th1 細胞によって産生される IFN- γ 存在下において、その誘導が阻止される。すなわち、IL-12-IFN- γ (Th1) 経路と IL-23-IL-17 (Th17) 経路とのバランスが歯周病に関与するものと思われる。そのバランスがどの方向に傾きやすいかを決定付ける遺伝性素因として、*IL12RB2* 転写制御領域に存在する SNPs 等が考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、一連の研究を遂行する機会を与えていただき、終始温かい激励と御指導をいただいた村山洋二名誉教授(岡山大学)に感謝いたします。また、免疫学的研究の基本からもの見方に至るまで研究者としての姿勢を御指導いただいた松下祥教授(埼玉医科大学)、現在の私の研究活動を温かく見守り御指導いただいている寺田信行教授(兵庫医科大学)に感謝いたします。さらに、私の研究のスタートに際し御指導いただいた高柴正悟教授(岡山大学)、どこかの馬の骨とも分からない研究者の申し出を快く受け入れて下さった猪子英俊教授・医学部長(東海大学)、ハンセン病研究の醍醐味を説きそのきっかけを作ってくださった永井淳准教授(福岡歯科大学)、現在に至るまで終始貴重な御指導、御鞭撻をいただいた西村英紀教授(広島大学)、栗原英見教授(広島大学)に感謝いたします。

最後に、これら一連の研究の遂行に協力していただいた小越菜保子博士、畑中加珠博士、目黒道生博士および小柳津功介博士をはじめとする諸先生方に心から感謝いたします。

本論文の要旨は、第 53 回春季日本歯周病学会学術大会(平

成 22 年 5 月 14 日)において発表した。

文 献

- 1) Corey LA, Nance WE, Hofstede P, Schenkein HA: Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol*, 64: 1205-1208, 1993.
- 2) Takashiba S, Ohshima H, Oyaizu K, Kogoe-Kato N, Murayama Y: HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. *J Periodontol Res*, 34: 374-378, 1999.
- 3) 高柴正悟: ヒト白血球抗原 (HLA) 遺伝子の制限断片長多型 (RFLP) 解析による歯周病病態の分子生物学的研究. *日本歯周病学会誌*, 32: 386-401, 1990.
- 4) 大山秀樹, 高柴正悟, 宮本学, 高橋慶壮, 河野隆幸, 永井淳, 栗原英見, 村山洋二: 歯周病患者における HLA-DQB1 遺伝子変異の検索. *日本歯周病学会誌*, 35: 536-542, 1993.
- 5) Shimomura-Kuroki J, Yamashita K, Shimooka S: *Tannerella forsythia* and the HLA-DQB1 allele are associated with susceptibility to periodontal disease in Japanese adolescents. *Odontology*, 97: 32-37, 2009.
- 6) Ohshima H, Takashiba S, Oyaizu K, Nagai A, Naruse T, Inoko H, Kurihara H, Murayama Y: HLA Class II genotypes associated with early-onset periodontitis: DQB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease. *J Periodontol*, 67: 888-894, 1996.
- 7) Bonfil JJ, Dillier FL, Mercier P, Revirion D, Foti B, Sambuc R, Brodeur JM, Sedarat C: A "case control" study on the rôle of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. Identification of types and subtypes using molecular biology (PCR-SSO). *J Clin Periodontol*, 26: 77-84, 1999.
- 8) Machulla HK, Stein J, Gautsch A, Langner J, Schaller HG, Reichert S: HLA-A, B, Cw, DRB1, DRB3/4/5, DQB1 in German patients suffering from rapidly progressive periodontitis (RPP) and adult periodontitis (AP). *J Clin Periodontol*, 29: 573-579, 2002.
- 9) Stein J, Reichert S, Gautsch A, Machulla HK: Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis? *J Periodontol Res*, 38: 508-517, 2003.
- 10) Zhang SJ, Yang AL, Zhang JC, Zhang YH, Tang Y: Association of HLA-DRB1*1501 polymorphism with the susceptibility to severe chronic periodontitis in Chinese Han nationality. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 13: 182-185, 2004.

- 11) Wang HY, Pan YP: Screening and analysis of multi-alleles in generalized aggressive periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 43: 406-409, 2008.
- 12) Chen Z, Takahashi M, Naruse T, Nakajima T, Chen YW, Inoue Y, Ishikawa I, Iwai T, Kimura A: Synergistic contribution of CD14 and HLA loci in the susceptibility to Buerger disease. *Hum Genet*, 122: 367-72, 2007.
- 13) Liblau R, Gautam AM: HLA, molecular mimicry and multiple sclerosis. *Rev Immunogenet*, 2: 95-104, 2000.
- 14) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ: The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 30: 1205-1213, 1987.
- 15) Dessen A, Lawrence CM, Cupo S, Zaller DM, Wiley DC: X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*, 7: 473-481, 1997.
- 16) Kurihara H, Nishimura F, Nakamura T, Nakagawa M, Tanimoto I, Nomura Y, Koikeguchi S, Kato K, Murayama Y: Humoral immune response to an antigen from *Porphyromonas gingivalis* 381 in periodontal disease. *Infect Immun* 59: 2758-2762, 1991.
- 17) Ohyama H, Matsushita S, Kato N, Nishimura F, Oyaizu K, Koikeguchi S, Kurihara H, Takashiba S, Nishimura Y, Murayama Y: T cell responses to 53-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* in humans with early-onset periodontitis. *Hum Immunol*, 59: 635-643, 1998.
- 18) Oyaizu K, Ohyama H, Nishimura F, Kurihara H, Matsushita S, Maeda H, Koikeguchi S, Hongyo H, Takashiba S, Murayama Y: Identification and characterization of B-cell epitopes of a 53-kDa outer membrane protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 16: 73-78, 2001.
- 19) Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, et al.: Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409: 1007-1011, 2001.
- 20) Ridley DS, Jopling WH: Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 34: 255-273, 1966.
- 21) Chakravarti, MR, Vogel F: A twin study on leprosy. In: Becker PE, editor. *Topics in human genetics*. Stuttgart: Georg Thieme; 1-123, 1973.
- 22) Goulart LR, Goulart IM: Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Arch Dermatol Res*, 301: 123-37, 2009.
- 23) Gorodezky C, Alaez C, Munguía A, Cruz R, Vazquez A, Camacho A, Flores O, Rodriguez M, Rodriguez O: Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis (Edinb)* 84: 82-92, 2004.
- 24) Ottenhoff TH, de Vries RR: HLA class II immune response and suppression genes in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 55: 521-34, 1987.
- 25) Van Schooten WC, Ottenhoff TH, Klatser PR, Thole J, De Vries RR, Kolk AH: T cell epitopes on the 36K and 65K *Mycobacterium leprae* antigens defined by human T cell clones. *Eur J Immunol*, 18: 849-854, 1988.
- 26) Kim J, Sette A, Rodda S, Southwood S, Sieling PA, Mehra V, Ohmen JD, Oliveros J, Appella E, Higashimoto Y, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL: Determinants of T cell reactivity to the *Mycobacterium leprae* GroES homologue. *J Immunol*, 159: 335-343, 1997.
- 27) Joko S, Numaga J, Kawashima H, Namisato M, Maeda H. Human leukocyte antigens in forms of leprosy among Japanese patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 68: 49-56, 2000.
- 28) Ohyama H, Nagai A, Takashiba S, Kurihara H, Sugiyama K, Inoue S, Mizushima M, Kohzuma A, Murayama Y: An atypical site in HLA-DQB1 detected in leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 62: 293-294, 1994.
- 29) Rogge L, Papi A, Presky DH, Biffi M, Minetti LJ, Miotto D, Agostini C, Semenzato G, Fabbri LM, Sinigaglia F: Antibodies to the IL-12 receptor $\beta 2$ chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo. *J Immunol*, 162: 3926-3932, 1999.
- 30) Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K, Modlin RL: A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J Immunol*, 167: 779-786, 2001.
- 31) Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, Naruishi H, Ohira T, Hashimoto K, Liu T, Suzuki M, Uemura Y, Matsushita S: Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor $\beta 2$ gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol*, 58: 740-743, 2005.
- 32) Ohyama H, Kato-Kogoe N, Nishimura F, Takeuchi-Hatanaka K, Matsushita S, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Nakasho K, Terada N: Differential effects of polymorphisms in the 5' flanking region of *IL12RB2* on NK- and T-cell

- activity. *J Interferon Cytokine Res*, 28: 563-569, 2008.
- 33) Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ: Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13: 17-34, 2002.
- 34) Scarel-Caminaga RM, Trevisatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR: Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29: 587-591, 2002.
- 35) Gonzales JR, Kobayashi T, Michel J, Mann M, Yoshie H, Meyle J: Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 31: 384-389, 2004.
- 36) Brett PM, Zygiogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, Tonetti M: Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res*, 84: 1149-1153, 2005.
- 37) Nibali L, D'Aiuto F, Donos N, Griffiths GS, Parkar M, Tonetti MS, Humphries SE, Brett PM: Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. *Cytokine*, 45: 50-54, 2009.
- 38) Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Seymour GJ, Middleton PG, Taylor JJ: Progression of periodontal disease and interleukin-10 gene polymorphism. *J Periodontol Res*, 43: 328-33, 2008.
- 39) Takeuchi-Hatanaka K, Ohyama H, Nishimura F, Kato-Kogoe N, Soga Y, Matsushita S, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Terada N, Takashiba S: Polymorphisms in the 5' flanking region of *IL12RB2* are associated with susceptibility to periodontal diseases in the Japanese population. *J Clin Periodontol*, 35: 317-323, 2008.
- 40) 大山秀樹, 本行 博, 清水尚子, 清水良和, 永井 淳, 野村慶雄, 西村英紀, 新井英雄, 高柴正悟, 村山洋二: ハンセン病患者の歯周病の臨床症状と歯周病関連細菌に対する体液性免疫応答に関する疫学的研究. *岡山歯学会誌*, 20: 193-200, 2001.
- 41) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136: 2348-2357, 1986.
- 42) Wynn TA: T(H)-17: a giant step from T(H)1 and T(H)2. *Nat Immunol*, 6: 1069-1070, 2005.
- 43) Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H: Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*, 203: 2673-2682, 2006.
- 44) Steinman L: A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 13: 139-145, 2007.
- 45) Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA: Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 13: 715-25, 2000.
- 46) Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N: The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res*, 88: 633-638, 2009.
- 47) Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T: T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature*, 408: 600-605, 2000.