

## 歯周病のオーダーメイド治療に向けた単球機能の分子生物学的研究

高柴正悟

岡山大学大学院医歯学総合研究科病態制御科学専攻  
病態機構学講座歯周病態学分野Molecular Biological Study of Monocyte Function  
for Custom-made Periodontal Therapy

Shogo Takashiba

Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Biopathological Science,  
Department of Pathophysiology/Periodontal Science

## 1. はじめに

歯周病は、歯周組織に口腔細菌が感染することで発症する感染症である。臨床症状を含めてその病態が患者間で多様であることを、歯科医師は経験的に認識していた。しかし、その治療に関する一連の流れは、『歯周治療のガイドライン』にあるようにおおむね画一的であり、マス（集団）を対象に形作られている。各個体間で多種多様な病態を示す歯周病に対して画一的なマス医療を展開しているという事実は、医学領域での昨今の変化を鑑みると少なからぬジレンマを覚えるものである。さらにこのことは、これまで歯科医師が“歯周病”の病態をどのように理解してどのように臨床の場で応用してきたか、という姿勢が問われることを示しているのかもしれない。

私は、歯周病治療の根幹は、集団を一様としたマス医療ではなく、各個体に対応したオーダーメイド治療であるべきだと考えている。すなわち歯周病患者の個体差のタイプを捉えるとともに、その患者の歯周病病態がどのようなステージにあるかを診断することが大切であり（図1）、その診断に基づいて細菌側や生体側に変化をもたらす治療が望ましいと考える。本総説では、私の“歯周病”研究を紹介し、未来の歯周病治療の方向性を示したい。

2. 細胞機能から分子細胞学的見地へ  
— 歯周病病態の解明 —

歯周病の病態は、宿主と細菌の相互作用によって成

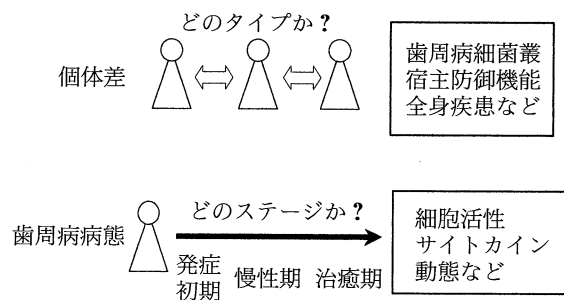


図1 歯周病のオーダーメイド治療

立する。したがって各個体間における歯周病の病態の違いは、歯周病細菌の抗原性の違いであり、免疫機能（力）の違いであると捉えられる。すなわち歯周病の“病態”を理解するためには、細菌あるいは宿主の両面から研究を進める必要がある。

我々は、各個体の免疫担当細胞の活力の差が歯周病の病態の差に現れていると考えた。とりわけ早期発症型歯周炎（EOP, 1999年にはアメリカ歯周病学会が Aggressive Periodontitis に分類）は、罹患患者の免疫細胞に何らかの機能不全が存在するため、あるいは発生したため、急速に病状が進行するという機序が成立することから、各個体の免疫担当細胞の活力の差の存在を示す著明な例である。我々は、早期発症型歯周炎患者の症例研究を持続的にを行い<sup>1,2)</sup>、100名以上の歯周炎患者において免疫細胞の機能を好中球機能、リンパ球機能など多方面からの検査を試み、統計学的に歯周病の発症と進行のリスク因子を調べた<sup>3)</sup>。その結果からは、患者間で歯周病憎悪因子の“共通項”を見出すことは難しかったが、患者個々では細胞機能の一

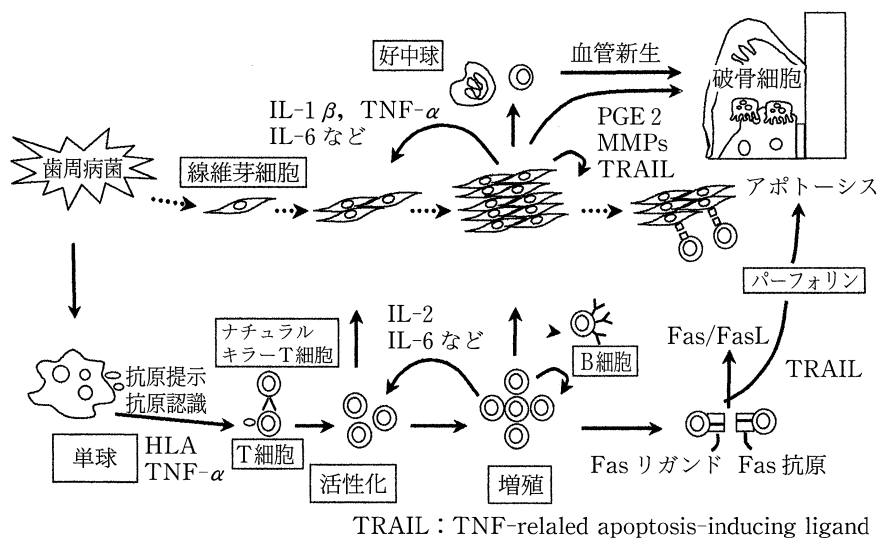


図 2 単球を基点とした歯周組織破壊メカニズム

部に健常値から離れた検査結果が散見されることが分かった。この結果は、①細胞機能の低下は歯周病のリスク因子になる、②患者個々の免疫機能は多様であり、歯周病の病態は個体間で異なる、という2点を我々に理解させるものである。

歯周病の病態に、免疫細胞の機能が深く関わっていることは明らかである。しかし各々の種類の細胞の機能といういわゆる“OUT PUT”の部分を検査しても、特筆すべき因子を見つけることは困難であることが分かった。そこで我々は、サイトカインなど細胞機能を制御する因子において患者間で差があるのではないかと考えた。これを解明するためには、歯周組織の破壊に関わる、すなわち病因に関わる、一連のサイトカインネットワークを理解する必要がある(図2)。1990年以降、サイトカインに関する研究が世界的に行われ、その分子細胞生物学的な理解は飛躍的に発展してきた。以下に紹介する我々の研究も、その発展に大きく貢献している。

### 3. 歯周病発症の基点細胞としての単球

#### —抗原の提示とサイトカインの産生源—

歯周病の発症を考えると、口腔細菌そのものが抗原となって炎症反応が開始すると考えられがちであるが、実際は口腔細菌の外膜蛋白、線毛、リポポリサッカライド(LPS)などの構成物質それぞれが多様な抗原性を有する。さらに、生体細胞の各種受容体を介して、生体細胞を活性化する。口腔細菌が歯周組織に侵入してくると、非特異的に好中球が口腔細菌を貪食して生体を防御するが、それだけでは不十分な場合、

本格的な免疫反応がおこる。その免疫反応は、主に単球・マクロファージが抗原を貪食した後、リンパ球に提示して開始する(抗原提示反応)。したがって、単球は免疫反応の基点となる細胞として位置付けられる。

我々は、EOP患者群に多く見受けられるヒト白血球抗原の遺伝子型を追求し<sup>4)</sup>、一部の患者にはHLA-DR\*1501が高頻度に検出されることを明らかにした<sup>5)</sup>。さらに、このタイプのHLA-DR分子が、歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) の外膜に存在する分子量53 kDaの蛋白を抗原として認識して、T細胞を活性化する様態を研究してきた<sup>6)</sup>。この一連の研究は、EOP患者の中から特定の免疫応答を起こす群を遺伝子診断する可能性を示し、そして *Pg* の抗原を用いた歯周病ワクチンの開発を期待させるものとして注目されている<sup>7)</sup>。

一方、グラム陰性菌のLPSは単球を活性化する作用が強く、グラム陰性菌の感染と炎症に関わる歯周病の病態を探る上で重要である。抗原認識の際だけでなくLPSの刺激時にも、活性化された単球は腫瘍壊死因子アルファ(tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ )やインターロイキン(IL)-1を産生する<sup>8)</sup>。LPSの刺激時のこれらのサイトカインの産生には、プロテインキナーゼCやチロシンキナーゼが関与していることを明らかにしたが<sup>9)</sup>、その後には、刺激伝達にはトール様受容体(Toll-like receptor: TLR)が関与することがわかってきた。そのため、今まで治療の標的とされてきたLPS結合タンパク(LBP)やCD14といった既知の分子だけではなく、TLRも新たに治療の標的とされるであろう。これら炎症性サイトカイン

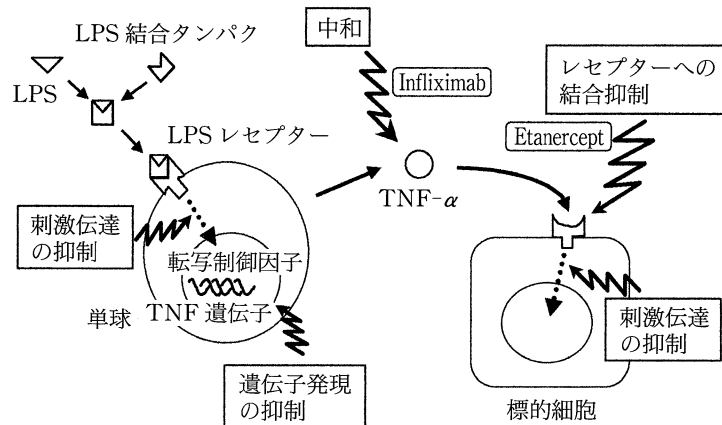


図3 TNF- $\alpha$  を標的とした炎症制御

は、単球周囲のリンパ球などの免疫担当細胞のみならず、線維芽細胞や上皮細胞などの組織を構築する細胞にも作用している。そのため、慢性関節リウマチなどの炎症性疾患においては、このうちの TNF が炎症治療の標的分子となっている (図3)。

これらのことから、歯周病発症時の免疫や炎症反応の基点細胞として、単球を捉えることができる (図2)。そこで、単球の機能を解析して、個人間や病勢のステージでの単球機能の違いに対応することで、オーダーメイド治療の一翼を担うことが可能となると考えた。

#### 4. 単球周囲で歯周組織の環境を制御する歯肉線維芽細胞

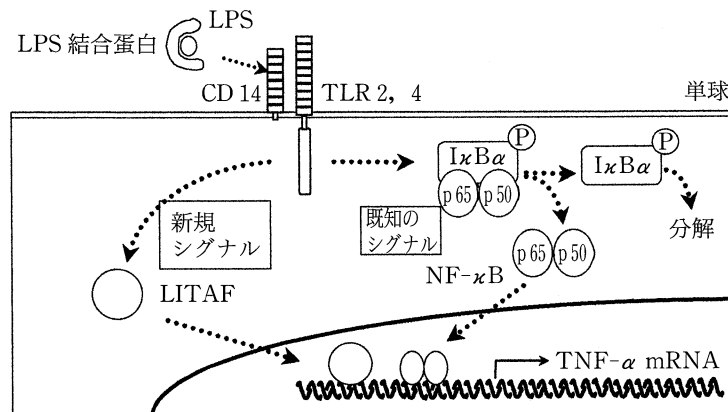
歯肉線維芽細胞は、歯周結合組織を構築する宿主細胞である。したがって健康な歯周組織では、細胞外基質を産生すると同時に、コラゲナーゼなどの基質分解酵素を産生しながら、細胞外基質の合成と分解を自ら調節して歯肉組織の恒常的な再構築を担っている。しかし、結合組織に起炎物質が波及して歯周病が発症すると、歯肉線維芽細胞は単球などの免疫担当細胞が産生する様々なサイトカインの標的細胞となってしまう。さらに、自らも様々なサイトカインを産生して、これらサイトカインのネットワークの一部を担う役割も果たしている<sup>10-12)</sup>。このように歯肉線維芽細胞は、結合組織の炎症の場で、滞りなく炎症の本態としての免疫反応が成立するように、歯周組織の環境を制御・調節している。

#### 5. 歯周病の病態を形成する炎症性サイトカイン

サイトカインは、各細胞間の相互作用を構築する液性の生理活性物質の総称である。その分類および機能の詳細について掌握することは大変な作業である。ここでは、単球を基点として、その周囲に存在する歯肉線維芽細胞も関わる代表的な炎症性サイトカイン的を絞って、歯周病の病態を考察する。

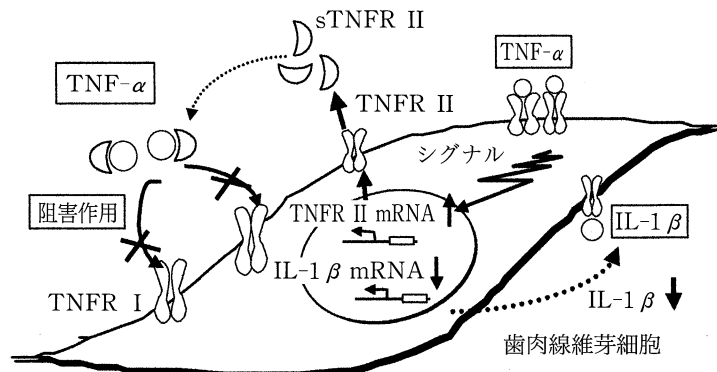
##### 1) Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  は、炎症初期において多彩な役割を果たすことが知られ、単球などによって産生される。とりわけ LPS は、単球に作用して TNF- $\alpha$  の産生を誘導することが知られている。すなわち LPS の刺激を受けた単球は、TNF- $\alpha$  の主な転写制御因子 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) を介する刺激伝達系が活性化して、最終的に TNF- $\alpha$  が産生されることになる。この刺激伝達系は単球以外の細胞でも解明されているが、ヒトの TNF- $\alpha$  遺伝子のプロモーター領域を詳細に解析すると、その転写には NF- $\kappa$ B 以外の転写制御因子の関与を示唆する領域 (約 60 bp) が存在することが判明した<sup>13,14)</sup>。我々は、このプロモーター領域に結合する転写制御因子の同定を試み、23.9 kDa の大きさが推定される約 1.8 kb の mRNA を有する遺伝子 LPS-induced TNF- $\alpha$  factor (LITAF) を得た<sup>15)</sup>。また、この遺伝子のアンチセンス mRNA を発現させることで、LPS で刺激した単球での TNF- $\alpha$  遺伝子の転写を抑制することができた。すなわち、この研究結果は LITAF 遺伝子の転写を制御することで TNF- $\alpha$  の産生を制御し得る可能性を示唆するものとして重要である (図4)。現在、LITAF の活性化や細



(Myokai F et al., PNAS, 1999)

図 4 LPS 誘導シグナルによる TNF-α 遺伝子発現



(Chou HH et al., J Dent Res, 2000 ; Ohe et al., J Interferon Cytokine Res, 2000)

図 5 歯周炎における IL-1β および TNF-α の役割—歯肉線維芽細胞への作用—

胞内の局在などを調べて、LITAF の性格を明らかにしようとしている。

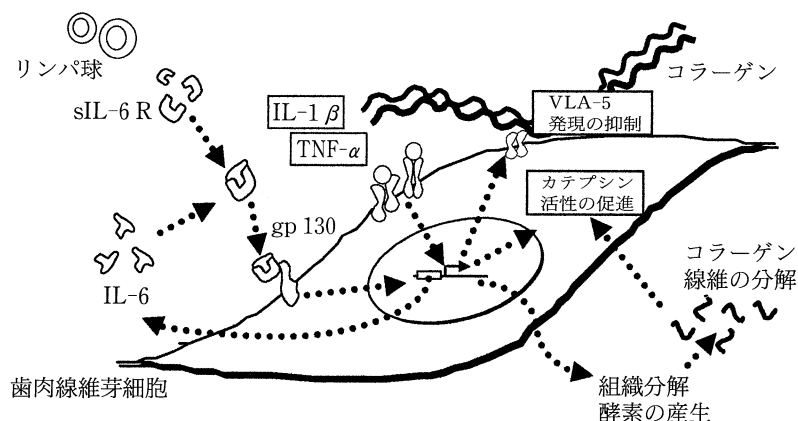
また炎症初期に TNF-α が歯周組織に産生されると、組織の構築細胞である歯肉線維芽細胞に作用することになる。我々は、この病態のモデルを培養系に反映して調べ、TNF-α の作用を受けた歯肉線維芽細胞が、可溶性の II 型 TNF レセプター (sTNFR II) の産生を促進することを明らかにした<sup>16)</sup>。この sTNFR II の産生は、TNF-α と同じく炎症初期に組織に現れる IL-1β との競合作用によって、さらに促進された。すなわち、炎症の初期において、歯肉線維芽細胞は sTNFR II を産生して、TNF-α の作用を抑制する方向に働くことが示唆される。また、sTNFR I の産生は TNF-α の刺激の有無によって制御されず、むしろ恒常的に産生されていることも明らかにした。これらの結果から、歯肉線維芽細胞は、① 健常時にすでに sTNFR I を産生して TNF-α の作用を抑制する準備をしていること、② 炎症のステージが進行して

TNF-α の産生量が増加すると、その作用を受けて sTNFR II を産生し、TNF-α を基点とした炎症の進行を抑制する、ことが示唆される (図 5)。

## 2) IL-1β

IL-1β は、TNF-α と同じく主に炎症の初期に現れるサイトカインである。我々は IL-1β が歯肉線維芽細胞の IL-6 産生を促進することを明らかにした<sup>12)</sup>。このことは、歯肉線維芽細胞が単なる組織構築細胞ではなく、サイトカインネットワークの一部を構成する細胞であることを意味する。

また、IL-1β の標的細胞に存在するレセプターには、刺激伝達能を有する I 型 IL-1 レセプター (IL-1 R I) とデコイとして働くことでアンタゴニスト作用を有する II 型 IL-1 レセプター (IL-1 R II) が存在する。我々は、歯肉線維芽細胞において IL-1 R II は IL-1β の刺激伝達能を有するのではないかと仮説をたてた。そこで IL-1 R II を過剰発現させた歯肉線維芽細胞を IL-1β で刺激した後に、細胞内刺激伝達系



(Naruishi K et al., J Dent Res, 2001)

図 6 歯周炎における IL-6 の役割—歯肉線維芽細胞への作用—

の変化および様々なサイトカインの mRNA の産生動態を調べた。その結果は、歯肉線維芽細胞では IL-1 R II を介した刺激伝達系によって、IL-1 $\beta$  mRNA 発現が抑制される可能性を示唆するものであった<sup>17)</sup> (図 5)。

### 3) IL-6

IL-6 は、炎症の初期から中期にかけて現れるサイトカインである。IL-6 の刺激伝達は、IL-6 が標的細胞の膜上に存在する分子量 80 kDa のレセプターである IL-6 R と結合した後、刺激伝達能を有する分子量 130 kDa のシグナルトランスデューサーである gp 130 と会合し、gp 130 の細胞内ドメインの一部がリン酸化することで始まる。歯肉線維芽細胞は IL-6 R を発現しないので、IL-6 の標的細胞にはなり得ないと考えられていた。しかし我々は、研究当初から歯肉線維芽細胞は mRNA レベルではあるが gp 130 を発現することを突き止めていた。この gp 130 が発現する意義は、リンパ球などが産生する可溶性の IL-6 R (sIL-6 R) の存在によって説明できる。すなわち我々は、IL-6 は sIL-6 R と複合体を形成した後に gp 130 と会合して、歯肉線維芽細胞内の刺激伝達系が活性化されることを明らかにした<sup>18)</sup>。また、その刺激が伝達された後には、歯肉線維芽細胞の接着分子の一つである VLA-5 および構築分子であるアクチンの発現が抑制されるという結果も得た<sup>19)</sup>。すなわち IL-6 は、リンパ球などが炎症巣に浸潤するような慢性炎症期において、sIL-6 R を介して歯肉線維芽細胞にダメージを与えることが示唆される (図 6)。この結果を歯周病の病態にあてはめると、IL-6 は歯周組織の破壊を促進する作用を有すると考えられる。

## 6. 歯周病の病態を考慮した歯周治療

—生体反応の積極的な応用に向けて—

歯周病の病態を考慮すると、その治療の方向性は、1) 口腔細菌の感染を抑制し、2) 炎症の基点を抑えながら、3) 歯周組織の破壊を防ぐ、ということになる。この観点から、感染から生体を防御する機能を保ちながら炎症をいかに人為的にコントロールしていくかが将来の課題として見えてくる。実際、他の医学分野において、感染症が直接的に関与しない慢性関節リウマチやクローン病の患者に対しては、TNF- $\alpha$  の作用を様々なレベルで抑制あるいは制御するサイトカイン療法 (抗 TNF- $\alpha$  抗体である Infliximab や TNF レセプターのアンタゴニストとして作用する sTNFR II 組換体である Etanercept などの薬剤を使用) が臨床応用されて、効果を挙げている (図 3)。こうした応用を見ると、歯周病治療の分野では抗菌剤や抗生剤を用いた化学的な感染抑制を行いながらの抗炎症のためのサイトカイン療法という図式が見えてくる。

感染制御に関してみると、現時点では生体由来の抗菌物質であるヒト 2 型  $\beta$ -デフェンシン (hBD-2) の産生を亢進させて口腔内の細菌数を減少させるという研究を進行させている。化学的な感染防御に用いる薬剤を長期間にわたって使用することは、耐性菌の出現を促してしまうという危険性を孕んでいる。そこで、耐性菌が出現しにくい作用機序を持ち、生体細胞への為害性が少ないと思われる生体由来の抗菌物質に期待が集まるのである。さらに、必要時に産生が亢進し、不必要時には産生が止まるように制御されていることが望まれる。

視点を変えて先端的な臨床医学研究をみると、大腸

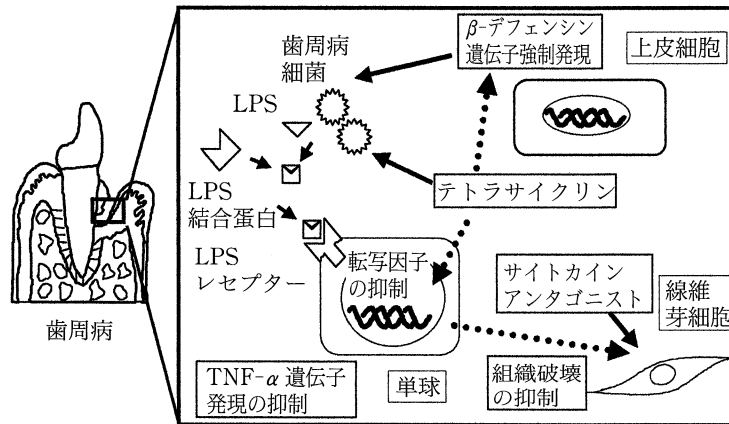


図 7 歯周炎局所への遺伝子治療の応用—歯周病のオーダーメイド治療—

癌や前立腺癌などの癌患者に対しては癌抑制遺伝子 p53 などを応用した遺伝子治療法が確立しつつある。さらに、動脈硬化症などの生活習慣病や骨折などの急性の疾患にまで、遺伝子治療研究が拡大されている。このことは、これらの疾患の病態が分子および遺伝子のレベルで解明されたことで実を結んだ成果である。そして、この治療を応用する際には、患者毎の病態を診断して、どの遺伝子を用いるか、いつ適用するか、といった部分が決定されなければならない。まさに、オーダーメイド治療を実現しようとしているのである。もちろん、歯周病の病態も分子・遺伝子のレベルで解明されつつあるので、近い将来にはサイトカイン療法や遺伝子療法が臨床の場で応用され、生体反応を人為的にコントロールしながら治療するという手法の確立が期待される。そのモデルを歯周病の発症時や進行時に細菌感染が増加して TNF- $\alpha$  の産生が亢進したものに設定して、感染抑制のために用いた抗生剤等をトリガーとして、前述した hBD-2 の産生を亢進させながら TNF- $\alpha$  遺伝子の転写を抑制したりする局所遺伝子治療が考えられるのではないだろうか (図 7)。

## 7. おわりに

我々は、歯周病の病態を、単球を基点として歯肉線維芽細胞を巻き込んだ炎症性サイトカインネットワークの面から捉えてきた。この一連の研究の成果を日常臨床に応用するには、さらなる研究が必要であるが、本総説では将来を見据えた歯周治療のあり方を考えてみた。従来の歯周治療の概は、プラークなどの細菌性の原因を除去し、その後は生体の治癒能力にゆだねるという治療概念で組み立てられている (最近では組

織の再生も概念に組み込まれたが)。治療概念上、この姿勢は正しい。しかしこの概念は、宿主と細菌の相互作用が働く歯周病は、個体によって異なる病態を示す感染症であるということを理解したところでとどまっているように感ずる。生体の反応を理解して、それを応用する治療が望ましいのではないであろうか<sup>20)</sup>。また、一個体に限ったとしても、その炎症のステージによって主に産生されているサイトカインの種類が異なることも考慮しなければならない。したがって、歯周治療は本来その病態に応じた“オーダーメイド医療”を展開する必要があると考える。このような歯周治療の概念が広がるのに伴い、日常の歯科医療体系そのものが変わっていくことを望むものである。

## 謝 辞

本稿の作成には、岡山大学大学院医歯学総合研究科歯周病態学分野の皆様にお世話になりました。深謝いたします。

## 文 献

- 1) Nishimura F, Nagai A, Kurimoto K, Isoshima O, Takashiba S, Kobayashi M, Akutsu I, Kurihara H, Nomura Y, Murayama Y, Hiroyuki Ohta, Keijiro Kato : A family study of a mother and daughter with increased susceptibility to early-onset periodontitis : microbiological, immunological, host defensive, and genetic analyses. J Periodontol, 61(12) : 755-762, 1990.
- 2) Katsuragi K, Takashiba S, Kurihara H, Murayama Y : Molecular basis of leukocyte adhesion molecules in early-onset periodontitis patients with decreased CD 11/CD 18 expression on leukocytes. J Periodontol, 65(10) : 949-57, 1994.

- 3) Takahashi K, Ohyama H, Kitanaka M, Sawa T, Mineshiba J, Nishimura F, Arai H, Takashiba S, Murayama Y : Heterogeneity of host immunological risk factors in patients with aggressive periodontitis. J Periodontol, 72(4) : 425-437, 2001.
- 4) Takashiba S, Noji S, Nishimura F, Ohyama H, Kurihara H, Nomura Y, Taniguchi S, Murayama Y : Unique intronic variations of HLA-DQ beta gene in early-onset periodontitis. J Periodontol, 65(5) : 379-386, 1994.
- 5) Ohyama H, Takashiba S, Oyaizu K, Nagai A, Naruse T, Inoko H, Kurihara H, Murayama Y : HLA Class II genotypes associated with early-onset periodontitis : DQB 1 molecule primarily confers susceptibility to the disease. J Periodontol, 67(9) : 888-894, 1996.
- 6) Ohyama H, Matsushita S, Kato N, Nishimura F, Oyaizu K, Koeguchi 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(10) : 635-643, 1998.
- 7) Takashiba S, Ohyama H, Oyaizu K, Kogoe-Kato N, Murayama Y : HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. J Periodontal Res, 34(7) : 374-378, 1999.
- 8) Shapira L, Takashiba S, Amar S, Van Dyke TE : *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulation of human monocytes : dependence on serum and CD 14 receptor. Oral Microbiol Immunol, 9(2) : 112-117, 1994.
- 9) Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, Van Dyke TE : Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. J Immunol, 153(4) : 1818-1824, 1994.
- 10) Takashiba S, Takigawa M, Takahashi K, Myokai F, Nishimura F, Chihara T, Kurihara H, Nomura Y, Murayama Y : Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor derived from cultured human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 beta or tumor necrosis factor alpha. Infect Immun, 60(12) : 5253-5258, 1992.
- 11) Takigawa M, Takashiba S, Myokai F, Takahashi K, Arai H, Kurihara H, Murayama Y : Cytokine-dependent synergistic regulation of interleukin-8 production from human gingival fibroblasts. J Periodontol, 65(11) : 1002-1007, 1994.
- 12) Takigawa M, Takashiba S, Takahashi K, Arai H, Kurihara H, Murayama Y : Prostaglandin E 2 inhibits interleukin-6 release but not its transcription in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha. J Periodontol, 65(12) : 1122-1127, 1994.
- 13) Takashiba S, Shapira L, Amar S, Van Dyke TE : Cloning and characterization of human TNF alpha promoter region. Gene, 131(2) : 307-308, 1993.
- 14) Takashiba S, Van Dyke TE, Shapira L, Amar S : Lipopolysaccharide-inducible and salicylate-sensitive nuclear factor (s) on human tumor necrosis factor alpha promoter. Infect Immun, 63(4) : 1529-1534, 1995.
- 15) Myokai F, Takashiba S, Lebo R, Amar S : A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene expression : molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. Proc Natl Acad Sci USA, 96(8) : 4518-4523, 1999.
- 16) Ohe H, Takashiba S, Naruishi K, Chou HH, Yamada H, Nishimura F, Arai H, Murayama Y : Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) - induced and interleukin-1 beta (IL-1 beta) - induced shedding of TNF receptors from gingival fibroblasts. J Interferon Cytokine Res, 20(12) : 1077-1082, 2000.
- 17) Chou HH, Takashiba S, Maeda H, Naruishi K, Nishimura F, Arai H, Lu H, Murayama Y : Induction of intracellular interleukin-1 beta signals via type II interleukin-1 receptor in human gingival fibroblasts. J Dent Res, 79(9) : 1683-1688, 2000.
- 18) Naruishi K, Takashiba S, Chou HH, Arai H, Nishimura F, Murayama Y : Role of soluble interleukin-6 receptor in inflamed gingiva for binding of interleukin-6 to gingival fibroblasts. J Periodontal Res, 34(6) : 296-300, 1999.
- 19) Naruishi K, Takashiba S, Nishimura F, Chou HH, Arai H, Yamada H, Murayama Y : Impairment of gingival fibroblast adherence by IL-6/sIL-6 R. J Dent Res, 80(5) : 1421-1424, 2001.
- 20) Takashiba S, Myokai F, Ohyama H, Koeguchi S, Arai H, Nishimura F, Murayama Y : Chapter 5 : Concepts for the biological treatment of periodontal diseases. In : Bartold, PM, Ishikawa, I, Sirirat, M eds, Progress of Periodontal Research and Practice in Asian Pacific Countries, Asian Pacific Society of Periodontology, Brisbane, Australia, 2000, 42-52.