

博士(歯学) 佐伯 歩

学位論文題名

Modulation of growth and functions of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>  
Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by oral streptococci

(制御性T細胞の増殖ならびに免疫抑制活性に及ぼす口腔連鎖球菌の影響)

学位論文内容の要旨

【緒言】

ヒトの口腔には、約700種もの細菌が常在しており、これら口腔常在菌は、生体にとって異物であるにもかかわらず、健康なヒトにおいては強い免疫応答を引き起こすことはない。一方で、口腔常在菌はう蝕、歯周疾患の原因菌であり、さらには感染性心内膜炎等の全身感染症の原因菌となることも知られている。しかしながら、なぜこれらの常在菌は口腔に常在できるのかは明らかではない。近年、自己免疫疾患や癌における免疫応答を抑制する制御性T細胞 (Treg) の病因的役割が注目されており、一部の病原微生物は宿主防御機構から逃れるための感染戦略としてTregの免疫抑制能を利用しているという報告がある。我々は口腔に細菌が常在できる理由として、口腔細菌が何か免疫抑制状態を惹起する活性を有し、また、その活性にTregが関与しているのではないかと考えている。Tregの生物活性はTLR2で制御されていることが明らかにされている。最近、我々は、リポタンパク質 (LP) を欠損した*Streptococcus mutans*ならびに*S. gordonii*を作成し、野生株はTLR2で認識されるが、LP欠損株は認識されないことを明らかにした。本研究では、口腔連鎖球菌がTLR2を介してTregの生物活性を制御しているかどうかを明らかにすることを目的とし、まず、野生株とLP欠損株のTregの生物活性に及ぼす影響を *in vitro* で検証した。

【材料と方法】

1. 菌株

LPの合成に必須なprolipoprotein diacylglyceryl transferaseを欠失した*S. mutans* (Sm-dLP) ならびに*S. gordonii* (Sg-dLP) と、それらの野生型菌株 (Sm-WTならびにSg-WT) を用いた。

## 2. マウス

C57BL/6マウス ( $TLR2^{+/+}$ ) ならびにToll-like receptor2ノックアウトマウス( $TLR2^{KO}$ ) を用いた。

## 3. 菌体刺激による脾臓細胞中のTreg割合の変化

$TLR2^{+/+}$ あるいは $TLR2^{KO}$ マウス由来脾臓細胞を各種口腔連鎖球菌ならびに、マイコプラズマ由来合成リポタンパク質であるFSL-1 ( $TLR2$ のポジティブコントロール) で刺激した。48時間の培養後、APC-anti-CD4抗体、PE-anti-CD25抗体、Alexa Fluor® 488-anti-Foxp3抗体 (BioLegend) で染色し、フローサイトメトリーで脾臓細胞中のTregポピュレーションの割合を調べた。

## 4. Sg-wtあるいはSg-dLP刺激による分離したTregならびにヘルパーT細胞 (Th) の増殖活性

Treg, Thならびに抗原提示細胞 (APC) は、マウス脾臓細胞から Treg isolation kit (Miltenyi Biotec) を用いてマグネットセルソーターで分離した。分離したTregならびにThをSg-WTあるいはSg-dLPで48時間刺激後、TregならびにThの増殖活性を $^3H$ -thymidine の取り込みにより調べた。

## 5. Tregの免疫抑制活性

Treg の免疫抑制機能に及ぼす口腔連鎖球菌ならびに各種 TLR リガンド (FSL-1, *E. coli* LPS, CpG DNA, PolyI:C) の影響は、 $\alpha$ -CD3ε抗体を反応させることにより惹起される Th の増殖抑制活性で評価した。Treg の免疫抑制機能調節に及ぼす IL-6 の影響を調べるため、 $\alpha$ -IL-6 (10 µg/ml) を培地に添加し、Treg の免疫抑制活性を評価した。Treg の免疫抑制機能調節に及ぼす NF-κB の影響を調べるため、NF-κB 阻害剤である Bay11-7082 (10 µg/ml) で Treg, APC, Th をそれぞれ 1 時間前処理し、Treg の免疫抑制活性を評価した。

## 【結果】

### 1. 菌体刺激による脾臓細胞中のTreg割合の変化

菌体刺激により、 $TLR2^{+/+}$ ならびに $TLR2^{KO}$ マウス由来脾臓細胞中の Treg の割合が増加した。その程度は、 $TLR2^{+/+}$ の方が  $TLR2^{KO}$ よりも有意に大きかったが、WT 株と dLP 株の活性に差は見られなかった。

### 2. Sg-wtあるいはSg-dLP刺激による分離したTregならびにThの増殖活性

WT 株と dLP 株は共に単離した Treg の増殖を促進した。しかし、WT 株と dLP 株の活性に差は見られなかった。 $TLR2^{+/+}$ と  $TLR2^{KO}$ マウス間でも有意な差はみられなかった。また、炎症性サイトカイン IL-2 は Treg の増殖因子であることから、これら菌体の有する増殖促進活性は IL-2 による可能性が考えられた。そこで IL-2 のブロッキング抗体 ( $\alpha$ -IL-2) の存在下で増殖促進活性を調べたが、本活性は減弱せず、IL-2 による Treg の増殖促進活性ではないことが推測された。WT 株と dLP 株は共に単離した Th の増殖を促進したが、 $\alpha$ -IL-2 の存在下でこの増殖は減弱した。

### 3. Tregの免疫抑制活性

Treg の免疫抑制活性はいずれの菌株刺激においても増強されることではなく、逆に有意に弱められた。また、TLR2 リガンドである FSL-1、TLR9 リガンドである CpG DNA、TLR4 リガンドである LPS で、菌体刺激時と同様に Treg の免疫抑制活性は減弱したが、TLR3 リガンドである PolyI:C では減弱しなかった。菌体刺激による Treg の抑制活性の減弱は IL-6 のブロックキング抗体により部分的に阻害された。また、Treg を NF-κB の阻害剤 (BAY11-7082) で処理することで Treg の抑制活性はほぼ消失したが、抗原提示細胞 (APC) を処理したところ、Treg の抑制活性は顕著に増強した。

#### 【考察】

口腔連鎖球菌は TLR2 依存的、LP 非依存的に脾臓細胞中の Treg の割合を増加させた。このことは、これら菌体の peptidoglycan、lipoteichoic acid など LP 以外の菌体構成成分が Treg あるいは脾臓細胞中の TLR2 発現細胞で認識されたことを示している。また、*S. gordonii* は TLR2 非依存的、LP 非依存的、IL-2 非依存的に分離した Treg の増殖を促進したが、菌体構成成分のうち何が分離した Treg の増殖を促進したのかは明らかではない。口腔連鎖球菌は予想に反して Treg の免疫抑制活性を減弱させた。急性感染時に產生される炎症性サイトカインのうち、IL-2 は Treg の増殖を促進し、IL-6 は Treg の免疫抑制活性を阻害することが知られている。これらの炎症性サイトカインが減弱する感染後期あるいは慢性感染では、増殖していた Treg が免疫抑制活性を回復し、過剰な免疫応答を抑制することで恒常性を維持するという報告がある。したがって、本研究で観察された、菌体刺激による Treg の増殖促進ならびに免疫抑制活性の減弱は、感染後期あるいは慢性感染につながる準備段階であると考えることができた。そこで、IL-6 ならびに NF-κB の関与を調べたところ、菌体刺激による Treg の免疫抑制活性の減弱には、APC の產生する IL-6 を含む NF-κB で制御されている何らかの物質が関与していることが示唆された。

#### 【結論】

本研究により、口腔連鎖球菌は TLR2 依存的、あるいは非依存的に Treg の増殖と機能を調節できることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主　査　教　授　横　山　敦　郎  
副　査　教　授　柴　田　健一郎  
副　査　教　授　田　村　正　人

## 学位論文題名

### Modulation of growth and functions of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by oral streptococci

(制御性T細胞の増殖ならびに免疫抑制活性に及ぼす口腔連鎖球菌の影響)

審査は、主査、副査が一堂に会し、論文提出者が論文内容の要旨を説明しながら、その内容について審査担当者が口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

## 論文要旨

近年、自己免疫疾患や癌における免疫応答を抑制する制御性T細胞 (Treg) の病的役割が注目されている。一部の病原微生物は宿主防御機構から逃れるための感染戦略としてTregの免疫抑制能を利用しているという報告がある。また、最近、Tregが腸管の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、経口免疫寛容に関与していることが報告されている。学位申請者らは唾液と共に毎日数千億の口腔細菌を嚥下していることから、口腔常在細菌に対しても経口免疫寛容が成立し、このことにはTregが関与しているのではないかと考えた。Tregの生物活性はTLR2で制御されていることが明らかにされており、学位申請者らは、リポタンパク質 (LP) を欠損した *Streptococcus mutans*ならびに *S. gordonii*を作成し、野生株はTLR2で認識されるが、LP欠損株は認識されないことを明らかにした。本研究においては、口腔連鎖球菌がTLR2を介してTregの生物活性を制御しているかどうかを明らかにすることを目的とし、まず、野生株とLP欠損株のTregの生物活性に及ぼす影響を *in vitro*で検証した。LPの合成に必須な prolipoprotein diacylglycerol transferaseを欠失した *S. mutans* (Sm-dLP) ならびに *S. gordonii* (Sg-dLP) とそれらの野生型菌株 (Sm-WTならびに Sg-WT) を用いた。C57BL/6 (TLR2<sup>+/+</sup>) ならびにTLR2ノックアウト (TLR2<sup>KO</sup>) マウス由来脾臓細胞中のTregの割合は、APC-anti-CD4抗体、PE-anti-CD25抗体、Alexa Fluor® 488-anti-Foxp3抗体で染色し、フローサイトメーターで調べた。TregはTreg isolation kitで分離し、増殖活性は<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みで、また、抑制活性はα-CD3ε刺激で惹

起されるヘルパーT細胞増殖の抑制で評価した。菌体刺激により、TLR2<sup>++</sup>ならびにTLR2<sup>KO</sup>マウス由来脾臓細胞中のTregの割合が増加した。その程度は、TLR2<sup>++</sup>の方がTLR2<sup>KO</sup>よりも有意に大きかったが、WT株とdLP株の活性に差は見られなかった。WT株とdLP株は共に単離したTregの増殖を促進したが、WT株とdLP株の活性に差は認められず、TLR2<sup>++</sup>とTLR2<sup>KO</sup>マウス間においても有意な差はみられなかった。Tregの免疫抑制活性はいずれの菌株刺激においても有意に減弱された。また、TLR2リガンドであるFSL-1、TLR9リガンドであるCpG DNA、TLR4リガンドであるLPSで、菌体刺激時と同様にTregの免疫抑制活性は減弱したが、TLR3リガンドであるPolyI:Cでは減弱しなかった。菌体刺激によるTregの抑制活性の減弱はIL-6のブロックキング抗体により部分的に阻害された。また、NF-κBの阻害剤 (BAY11-7082) で抗原提示細胞(APC) を処理したところ、Tregの抑制活性は顕著に増強した。以上より、口腔連鎖球菌はTLR2依存的に脾臓細胞中のTregの増殖を促進するが、Tregの免疫抑制活性は減弱させることが明らかとなった。また、口腔連鎖球菌によるTregの抑制活性の減弱にはAPCの産生するNF-κBで制御されている何らかの物質、おそらくIL-6が関与していることが示唆された。本研究の結果から、口腔連鎖球菌はTLR2依存的、あるいは非依存的にTregの増殖と機能を調節できることが示唆された。

#### 審査の内容

1. 経口免疫寛容の成立機構について
2. dLP欠損株の増殖について
3. CD4(+)細胞中のTregの比について
4. IL-2のブロックキング抗体を使用する理由について
5. TLR2非依存的にTrgを口腔細菌が認識する理由について

などについて審査担当者から質問があり、申請者は適切に回答した。

本研究により、口腔常在細菌が Treg の増殖と機能を調節している可能性が示された。これらの結果は、自己免疫疾患や癌に対する新たな治療法の開発につながるものと期待され、将来性の点においても高く評価されるものであった。よって学位申請者は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。