

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11402

研究課題名(和文) クロフィブラートのIL-1Ra産生と実験的歯周炎抑制効果に関する研究

研究課題名(英文) Clofibrate produce IL-1Ra and inhibit the experimental periodontitis

研究代表者

石原 裕一 (Ishihara, Yuichi)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50261011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病の発症と進行に炎症性サイトカインが深く関与している。そこで、間接的に抗炎症性サイトカインの一つであるIL-1Ra産生に働くことが報告されている高脂血症治療薬クロフィブラートのIL-1Ra産生について、マウスマクロファージ細胞を用いて検討した。IL-1 とTNF- は有意に発現の亢進が観察され、SOCS3については多少発現に増加傾向が観察されたが、IL-1Ra、IL-6、IL-1、IL-1レセプター(IL-1R1)の発現はコントロールと同程度であった。以上より、クロフィブラート単独では歯周組織構成細胞では炎症の亢進に作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory cytokines are deeply involved in the onset and progression of periodontal disease. It has been reported that hyperlipidemic drug of clofibrate produce high levels of IL-1Ra from brain macrophage, therefore we investigated the IL-1Ra production from mouse macrophage stimulated with lipopolysaccharide of periodontal pathogenic bacteria. Expression of IL-1 and TNF- from mouse macrophage was significantly increased. Expression of IL-1Ra, IL-6, IL-1 and IL-1 receptor (IL-1R1) was same levels as that of the control, although the expression trend of SOCS3 was somewhat increased. These findings suggested that clofibrate alone may act to increase a periodontal tissues inflammation.

研究分野：歯学

キーワード：クロフィブラート IL-1Ra IL-1 実験的歯周炎

## 1. 研究開始当初の背景

近年、IL-1Ra をはじめとする抗炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカイン抗体などは、生物学的製剤として、関節リウマチの治療に利用されている。関節リウマチは歯周病と病因は異なるものの、関節局所において歯周炎と類似した炎症性骨吸収が引き起こされる疾患である。しかし、局所の病態が類似した歯周病では、生物学的製剤の利用は、ほとんどされていない。一方、抗炎症性に働く IL-1Ra 遺伝子欠損マウスは IL-1Ra による抗炎症作用が欠損しているために高度に進行した関節炎を起こすことが報告されていた。一方、高脂血症治療薬クロフィブラートの長期投与は心臓血管疾患、糖尿病、リウマチ性関節炎、実験的脳脊髄炎など多くの慢性炎症性疾患における炎症性イベントリスクを下げることが臨床ならびに基礎的研究で明らかとなっている。近年、アルツハイマー病の進行にも炎症の関与が示唆され、クロフィブラートはマウス神経細胞からの IL-1Ra 産生を増加させることが報告されている。

## 2. 研究の目的

前述の背景とこれまでの研究成果を踏まえ、本研究では、IL-1Ra 遺伝子欠損マウスマウスを利用して、IL-1Ra の歯周組織破壊における働きを詳細に調べることと、生物製剤としての IL-1Ra に比べ、非常に安価で、高脂血症治療薬として、長年利用されているクロフィブラートの IL-1Ra 産生に着目し、

1. 腹腔 M からの炎症性サイトカイン産生に対する影響
2. 骨芽細胞からの骨関連因子発現に対する影響
3. 歯周病関連細菌単独感染による実験的歯周炎の形態学的(免疫組織学的)解析
4. IL-1Ra のヒト上皮細胞からの接着分子発現に与える影響
5. 歯周組織構成細胞(上皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞)と単球・マクロファージをクロフィブラート刺激した際の IL-1Ra 発現

を実施することにより、新たな歯周病治療薬としての可能性を探ることを目的とし研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 腹腔 M からの炎症性サイトカイン産生に対する影響

13 週齢の IL-1RaKO および野生型マウスにチオグリコレート培養液 2ml (ニッスイ) を腹腔内注射し、3 日後、腹腔マクロファージ(M) を腹腔内洗浄により回収する。得られた

腹腔 M  $1.0 \times 10^6$  cell/well は *A. actinomycetemcomitans* ATCC29524 株 LPS 200  $\mu$ g/well で刺激後に細胞と培養上清を回収し、培養上清中のサイトカイン量は ELISA(R&D)にて測定し、細胞中のサイトカイン mRNA 発現は RT-PCR または qPCR 法にて測定する。

### (2) 骨芽細胞からの骨関連因子発現に対する影響

5 日齢マウス頭蓋骨よりコラゲナーゼ 1 mg/ml (Wako #034-10533) 処理にて骨芽細胞を採取し、増殖の安定した細胞株を保存し、経代数 3 代の株を実験に使用する。細胞数を  $3.3 \times 10^5$  cell/well に調整後、*A. actinomycetemcomitans* ATCC29524 株生菌 (MOI=100) および LPS で 12 時間刺激後、RNA を抽出には TRIzol (invitrogen) を用い、骨吸収関連因子として RANKL、M-CSF、骨芽細胞の分化に関しては RUNX2、ALP、OCN/BGP、および BSP を qPCR 法にて測定する。骨芽細胞の石灰化は培養 20 日目の骨芽細胞をアリザリンレッド S (sigma) にて染色し、比色により石灰化の程度を判定する。

### (3) 歯周病関連細菌単独感染による実験的歯周炎の形態学的(免疫組織学的)解析

IL-1RaKO および野生型マウスに *A. actinomycetemcomitans* 菌体浮遊液 ( $1 \times 10^{10}$  cells/ml) 300  $\mu$ l を合計 5 回投与後 6 週で屠殺する。屠殺したマウスは通常に従って頭部のみ 10% 中性ホルマリン溶液で固定後、10% EDTA・2NA 溶液で脱灰を行った。次に上下顎骨をパラフィンにて包埋して、ミクロトームにて厚さ 4  $\mu$ m の近遠心方向の連続切片を作成する。組織切片は H-E 染色と TRAP 染色後、光学顕微鏡で主に上顎第 1 臼歯と第 2 臼歯の歯周組織を検索する。また 10% 中性ホルマリン溶液で固定後には、Micro-focused Computed Tomography ( $\mu$ -CT TRI/3D-BON) (所属機関保有設備) にて撮影を行い、画像構築用ソフトを使用し、3D 画像での観察と残存骨量を計測・数値化する。

### (4) IL-1Ra のヒト上皮細胞からの接着分子発現に与える影響について

ヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22) に対し、Lipofectamine® RNAiMAX により IL-1Ra の mRNA をノックダウンし、その後 qPCR 法とウエスタンブロット法にて、IL-1Ra ノックダウンを検証したのち、PCR アレイにて、細胞外マトリックスと接着分子に関する半網羅的な遺伝子検索を行った。

### (5) マウス株化上皮細胞、マウス株化マクロファージをクロフィブラート刺激した際

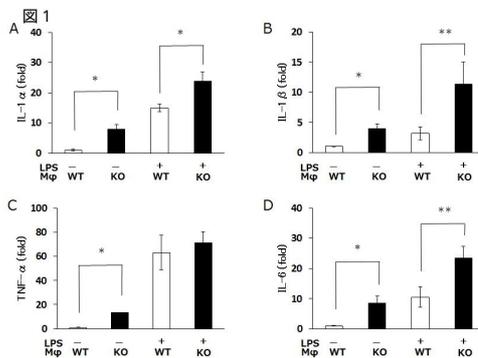
## の炎症性サイトカインと IL-1Ra 発現

C57BL/6 マウス由来株化歯肉上皮細胞である GE1 細胞またはマウスマクロファージ用細胞である RAW264.7 細胞を細胞数を約  $1.0 \times 10^5$  cell/well に調整後、5 %FCS 含有 SFM または DMEM 培地にて 24 時間前培養後、クロファイブレート 5, 25, 100  $\mu$ M および *P.gingivalis* LPS (SIGMA) 50 ng/ml にて刺激した後、で 2, 16 時間刺激後、RNA を抽出した。抽出には TRIzol (invitrogen) を用い、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1Ra、IL-1R1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、SOCS2、SOCS3 遺伝子発現を qPCR 法にて測定する。

### 4. 研究成果

#### (1) 腹腔Mからの炎症性サイトカイン産生

*A.actinomycescomitans* LPS 刺激した IL-1Ra KO マウスは野生型マウス腹腔マクロファージに比べて IL-1 $\alpha$  mRNA は約 1.6 倍 (図 1A), IL-1 $\beta$  mRNA は約 3.5 倍 (図 1B), IL-6 mRNA は約 2.2 倍 (図 1D) と有意に高い発現を認めた。

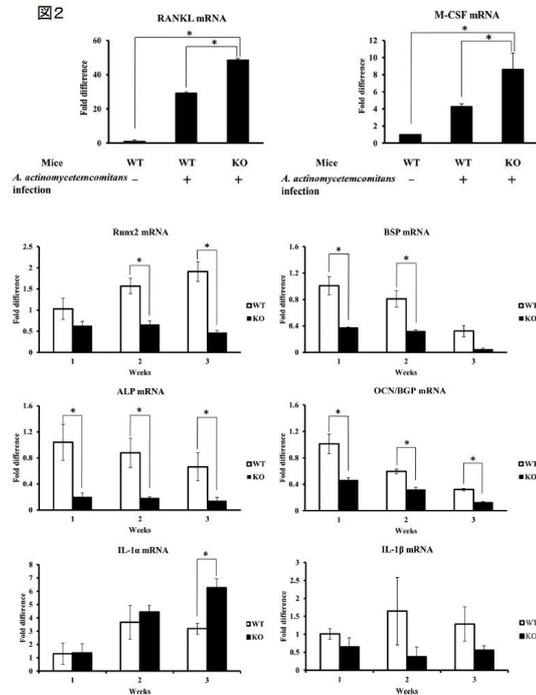


IL-1Ra KO マウスの肝細胞は未刺激でも高い NF- $\kappa$ B の転写活性を有していたことが報告されている。これらのことから、LPS あるいは IL-1、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン刺激が細胞内の NF- $\kappa$ B 活性化を介して IL-1、TNF- $\alpha$ 、および IL-6 mRNA の転写を互いに活性化し、これを IL-1Ra が制御しているのではないかと考えられた。したがって、IL-1Ra は IL-1 に特異的なインヒビターであるものの、間接的に TNF- $\alpha$  や IL-6 を顕著におさえる抗炎症性サイトカインであると考えられる。

#### (2) 骨芽細胞からの骨関連因子発現

それぞれのマウスから採取した骨芽細胞を *A.actinomycescomitans* 菌刺激したところ、骨吸収に働く RANKL、M-CSF の発現は IL-1RaKO マウスで増加しており、骨形成に働く、RUNX2、ALP、OCN/BGP、および BSP 発現は低下していた (図 2)。

図 2



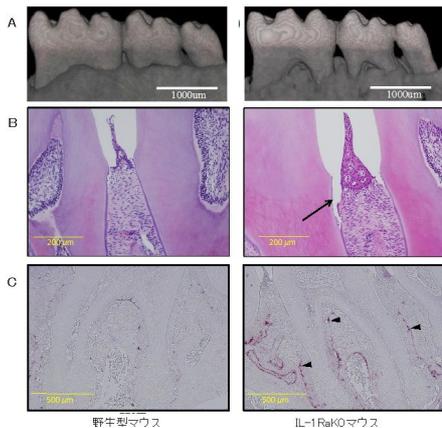
#### (3) 歯周病関連細菌単独感染による実験的歯周炎の形態学的 (免疫組織学的) 解析

13 週齢 IL-1Ra KO マウスと野生型マウスの口腔内にカルボキシメチルセルロース溶液にて調製した *A.actinomycescomitans* (ATCC29524 株) 菌体浮遊液を 1 日おきに 5 回経口投与した。菌体浮遊液投与終了 45 日後に屠殺し、下顎骨を採取した。その後、歯槽骨破壊の程度を  $\mu$ CT にて確認した後、組織切片を作製し H-E 染色と TRAP 染色を行った。*A.actinomycescomitans* 血清抗体価は IL-1Ra KO マウスにおいて有意に増加しており、このことは局所型侵襲性歯周炎患者末梢血単球を Pokeweed mitogen で刺激した時 IgG 2 産生が IL-1Ra によって抑制されていた。マイクロ CT による実験的歯周炎惹起後の歯槽骨変化を観察したところ、*A.actinomycescomitans* 感染 IL-1Ra KO マウスでは歯槽骨表面が粗造となり、歯槽骨頂部は歯槽骨吸収を伴う不整な形態が観察され、下顎第二臼歯の近遠心接触点下部の槽間中隔と根分岐部に明らかな歯槽骨の吸収が観察された (図 3A)。

さらに、下顎第二臼歯近心舌側の歯槽骨残存度を測定したところ、*A.actinomycescomitans* 感染 IL-1Ra KO マウスは未処置 IL-1Ra KO マウス、未処置野生型マウスおよび *A.actinomycescomitans* 感染野生型マウスと比較して約 30%、歯槽骨残存度が有意に低下していた。H-E 染色による実験的歯周炎惹起後の歯周組織変化を観察したところ、*A.actinomycescomitans* 感染野生型マウスでは、上皮突起の伸張や歯肉固有層での結合組織線維の走行の乱れや歯槽骨頂部における炎症性細胞浸潤は観察されなかったのに対し、*A.actinomycescomitans*

*comitans* 感染 IL-1Ra KO マウスでは歯肉頂部に辺縁不整な上皮と結合組織線維の走行の乱れ、上皮直下に炎症性細胞浸潤、付着の喪失が観察された(図3B)。A. *actinomycetemcomitans* 感染 IL-1Ra KO マウスは A. *actinomycetemcomitans* 感染野生型マウスと比較して歯肉固有層直下の骨頂部だけでなく、槽間中隔表層と根間中隔表層と骨髄側に TRAP 陽性細胞が観察された(図3C)。

図3



(4) IL-1Ra のヒト上皮細胞からの接着分子発現に与える影響

RNA 干渉による細胞増殖への影響について、位相差顕微鏡像と生細胞数をノックダウン群とコントロール群で調べたところ有意差は認められなかった。RNA 干渉による IL-1Ra 遺伝子発現は約 1/10 まで抑制されていた。PCR アレイを行ったところ、コントロール群と比較し、ノックダウン群においてマトリックスメタロプロテアーゼ 13 (以下、MMP-13) 遺伝子発現の増加が認められた。そこで、IL-1Ra 欠損マウス群と野生型マウス群に実験的歯周炎を惹起し、下顎骨を採取し、免疫組織学的観察と歯肉組織中の MMP-13 タンパク発現を ELISA 法で比較検討した。その結果、A. *actinomycetemcomitans* 感染 IL-1Ra 欠損マウスの接合上皮中の MMP-13 濃度は、A. *actinomycetemcomitans* 感染野生型マウスに比べ有意に高い発現増加が認められた(図4)。

実験的歯周炎マウス歯肉組織でのMMP-13タンパク発現比較

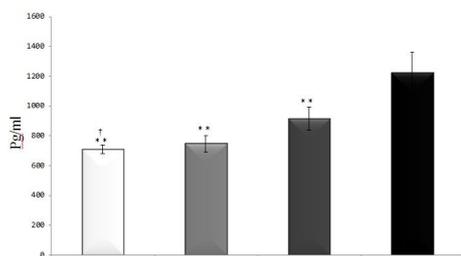
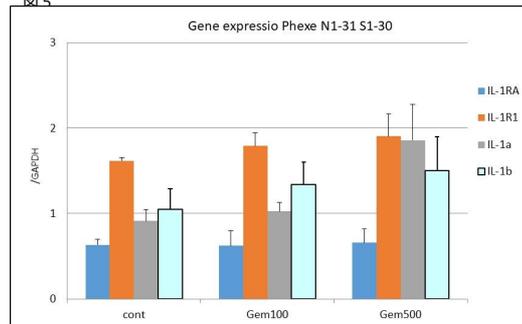


図4

(5) マウス株化上皮細胞、マウス株化マクロファージをクロフィブラート刺激した際の炎症性サイトカインと IL-1Ra 発現

GE1 細胞をクロフィブラート 25, 100, 500  $\mu$ M で刺激し IL-1、IL-1、IL-1Ra, IL-1R1 mRNA 発現を調べたところ、IL-1、IL-1、は若干の mRNA 発現の増加が認められたが、IL-1Ra, IL-1R1 mRNA 発現はほとんど変化しなかった。(図5)

図5



RAW264.7 細胞の場合も、クロフィブラート単独では IL-1、IL-1、IL-1Ra, mRNA 発現はほとんど変化しなかった。またクロフィブラート単独では IL-1 以外の TNF- $\alpha$  が著しくその発現を亢進し、予想とは全く逆の結果であった。そこで、活性化したマクロファージでの場合を検討するため、LPS 刺激した RAW264.7 細胞では IL-1Ra 発現はクロフィブラートの濃度に依存してその発現が減少した。しかし IL-6, と TNF- $\alpha$  については LPS 刺激により亢進した mRNA 発現はクロフィブラート添加により濃度依存的に抑制された。

以上の結果から、IL-1Ra は歯周組織破壊における炎症性骨吸収と上皮性付着の維持に非常に重要な分子であることが明らかとなった。しかし、高脂血症治療薬の一つであるクロフィブラートは IL-1Ra の発現または産生亢進には働いていないが TNF- $\alpha$  遺伝子発現を部分的に抑制したことから、IL-1Ra を介さない何らかの抗炎症作用を有している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Funaki-Kato Y, Hagiwara M, Ferdous T, Abdullah M, Mitani A, Michikawa M, Matsushita K\_Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. NPJ Aging Mech Dis. 査読有

2017, doi:10.1038/s41514-017-0015-x.

石原裕一 歯周組織破壊における IL-1Ra

の役割と治療薬への可能性. 日歯周病

誌 査読無 2017 59:101-109

Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T,

Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N Bone Formation Is Coupled to Resorption Via Suppression of Sclerostin Expression by Osteoclasts.、Journal of Bone Mineral Research、査読有、Vol.32、2017、2074-2086

Ozaki Y, Koide M, Furuya Y, Ninomiya T, Yasuda H, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Yoshinari N, Udagawa N.、Treatment of OPG-deficient mice with WP9QY, a RANKL-binding peptide, recovers alveolar bone loss by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis.、PLoS One、査読有、2017 Sep 22 12:e0184904、doi:10.1371/journal.pone.0184904.

石原裕一、吉成伸夫、ミニレビュー 超高齢社会における歯周病治療の役割。査読有、日歯周誌、2015、57: 18-25.

Okabe E, Ishihara Y, Kikuchi T, Izawa A, Kobayashi S, Goto H, Kamiya Y, Sasaki K, Ban S, Noguchi T, Kawai T, Mitani A. Adhesion Properties of Human Oral Epithelial-Derived Cells to Zirconia.、Clin Implant Dent Relat Res. 査読有、2015 Aug 5. doi: 10.1111/cid.12369.

Goto H, Ishihara Y, Kikuchi T, Izawa A, Ozeki N, Kamiya Y, Ozawa Y, Mizutani H, Yamamoto G, Mogi M, Nakata K, Maeda H, Noguchi T, Mitani. Interleukin-1 Receptor Antagonist Has a Novel Function in the Regulation of Matrix Metalloproteinase-13 Expression.、PLoS One.、査読有、Vol.58、2015 Oct 16;10(10):e0140942.

Mitani A, Niedbala W, Fujimura T, Mogi M, Miyamae S, Higuchi N, Abe A, Hishikawa T, Mizutani M, Ishihara Y, Nakamura H, Kurita K, Ohno N, Tanaka Y, Hattori M, Noguchi T. Increased Expression of Interleukin-35 and -17, but not -27, in Gingival Tissues with Chronic Periodontitis.、J Periodontol、査読有、Vol.86、2015、301-309

[学会発表](計 5 件)

石原裕一、小出雅則、吉成伸夫 IL-1Ra 欠損マウスでの破骨細胞形成と炎症性骨吸収が亢進する 第 2 回日本骨免疫学会ウインターセミナー ホテルマロウド軽井沢(軽井沢) 2017 年 1 月 27 日

尾崎友輝、小出雅則、古屋優里子、二宮 禎、保田尚孝、中村美どり、吉成伸夫、高橋直之、宇田川信之、W9 ペプチド投与による OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨喪失の改善効果 第 35 回日本骨代謝学会(福岡) 2017 年 7 月 27 日

石原裕一、歯周組織における IL-1Ra の役割と治療薬への可能性 第 60 回 春季日本歯周病学会学術大会 学会学術賞記念講演 福岡国際会議場(福岡) 2017 年 5 月 12 日

小出雅則、尾崎友輝、古屋優里子、二宮 禎、保田尚孝、中村美どり、吉成伸夫、高橋直之、宇田川信之歯槽骨吸収モデルに対する W9 ペプチドの改善効果 第 1 回日本骨免疫学会ウインターセミナーマロウド軽井沢(軽井沢) 2016 年 1 月 28 日

尾崎友輝、小出雅則、古屋優里子、二宮 禎、保田尚孝、中村美どり、吉成伸夫、高橋直之、宇田川信之 OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨吸収に対する W9 の骨修復効果第 33 回日本骨代謝学会、京王プラザホテル(東京)、2015 年 7 月 23 日

[図書](計 3 件)

石原裕一、吉成伸夫、医歯薬出版株式会社(東京) 患者さんに語るシンプル歯周治療 細菌・感染のコントロール 2 見えるプラーク 40-47、2016 年 3 月 2 日

石原裕一 医歯薬出版株式会社(東京) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会編 糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン 改訂第 2 版 2014 2. 歯周治療と糖尿病 1. 糖尿病患者における歯周病の病態、8-12、2015 年 3 月 20 日

吉成伸夫 医歯薬出版株式会社(東京) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会編 糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン 改訂第 2 版 2014 2. 歯周治療と糖尿病 5. 歯周組織再生療法、インプラント治療、69-78、2015 年 3 月 20 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 裕一 (ISHIHARA, Yuichi)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 5 0 2 6 1 0 1 1

### (2) 研究分担者

小出 雅則 (KOIDE Masanori)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号: 1 0 3 6 7 6 1 7

吉成 伸夫 (YOSHINARI Nobuo)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 2 0 2 3 1 6 9 9