

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07316

研究課題名(和文) Ebi3<sup>-/-</sup>マウスを用いた実験的歯周炎におけるIL-35の役割について

研究課題名(英文) The role of Interleukin-35 in experimental periodontitis model in Ebi3 knockout mice.

研究代表者

後藤 久嗣 (Goto, Hisashi)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号：10783037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病病態でのTh17 関連免疫応答におけるIL-35 の役割を明らかにすることを目的とし、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスにPorphyromonas gingivalis (P. gingivalis) を経口接種し実験的歯周炎を惹起させ歯周病病態の比較検討を行った。その結果、Ebi3<sup>-/-</sup>マウス、野生型マウスともにP.gingivalisを感染させることで歯槽骨吸収が認められ、さらに、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスにP.gingivalisを感染させた群において最も歯槽骨吸収が認められた。また、HE染色とTRAP染色を行った組織切片像にて、各群とも比較して顕著な差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The role of Interleukin (IL)-35 in periodontitis is not clear and the effect of IL-35 on the function of T helper 17 (Th17) cells is still incompletely understood. Therefore, we investigated the effects of IL-35, undertaken to compare experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis, clearly associated with the pathogenesis of periodontitis in Ebi3 knockout (KO) mice and wild-type (WT) mice. Computed tomography(CT) analysis and hematoxylin-and-eosin (H&E) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining were performed. Alveolar bone resorption was seen around the first and second mandibular molars in P.gingivalis-infected WT mice or in infected KO mice. Furthermore, infected Ebi3 KO mice alveolar bone resorption fenestration was higher than any other groups. Histological analysis of mandibles from Ebi3 KO and WT mice did not show clearly difference in the elements characteristic of periodontal tissues.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：ノックアウトマウス 実験的歯周炎

1. 研究開始当初の背景

近年、T 細胞の新しいサブセットとして Th17 細胞が提唱され、炎症や感染防御における役割が注目されている。Th17 細胞から産生される IL-17 はリウマチ患者の滑膜より検出され、破骨細胞分化因子 (RANKL{Receptor Activator of NF- B Ligand}) を誘導することにより破骨細胞を介した骨吸収に関与していることも明らかとなっている ( Kotake S.et al. *J.Clin.Invest.*1999)。これまでに IL-23 依存的に誘導された Th17 細胞が自己免疫性関節炎における骨吸収に重要であり、Th1 細胞および Th2 細胞は、むしろ破骨細胞の分化、誘導に対して抑制的に働くことが報告されている (Sato K.et al. *J.Exp.Med.*2006)。歯周病における Th17 細胞 (Schenkein HA.et al. *J Dent Res.* 2010, Monteiro AC.et al. *J Immunol.* 2009, Ohyama H.et al. *J Dent Res.* 2009, Yu JJ et al. *Infect Immun.* 2008, Takahashi K et al. *J Clin Periodontol.* 2005, Vernal R et al. *J Clin Periodontol.* 2005) や Treg 細胞 (Garlet GP et al. *J Clin Periodontol.* 2010, Dutzan N et al. *J Clin Periodontol.* 2009, Okui T et al. *Oral Microbiol Immunol.* 2008, Ernst CW et al. *Clin Exp Immun.* 2007, Nakajima T et al. *J Dent Res.* 2005) の関与も示唆されており、歯周病病態におけるこれら T 細胞の役割について更なる研究が必要である。Treg 細胞より産生される新規に同定された抑制性のサイトカインである IL-35 は、Epstein-Barr virus-induced gene 3 (Ebi3) と IL-12 のサブユニットである p35 のヘテロダイマーであり (Collison LW et al. *Nature.* 2007)、最近の報告では、Foxp3 を発現しない IL-35 産生性の iT<sub>R35</sub> が見いだされるなど (Collison LW et al. *Nature Immun.* 2010)、免疫制御において非常に注目されている。Niedbala W らは IL-35 が Th17 細胞分化を抑制して、コラーゲン誘導性リウマチを抑制することを明らかにした (Niedbala W et al. *Eur J Immunol.* 2007)。また、IL-35 のサブユニットの一つである Ebi3 の欠損マウス (Ebi3<sup>-/-</sup>マウス) の Treg 細胞は調節性が低下しており、炎症性大腸炎の改善度が悪いという報告がある (Collison LW et al. *Nature.* 2007)。その他、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスでは ROR $\gamma$ t の発現が増強しており、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスの Th17 は IL-17・IL-22 の発現が増強しているという報告 (Yang J et al. *Eur J Immunol.* 2008) がある。これまで、IL-35 がコラーゲン誘導性リウマチを抑制すること、Th17 細胞分化を抑制することが明らかとなっている (Niedbala W et al. *Eur J Immunol.* 2007)。また、歯周病やリウマチなどの慢性炎症性骨疾患において Th17 細胞や Treg 細胞の関与が示唆されているが、IL-35 の骨形成もしくは骨破壊への影響、さらには歯周病関連細菌刺激による炎症性骨吸収において、IL-35 が抑制的に作用し

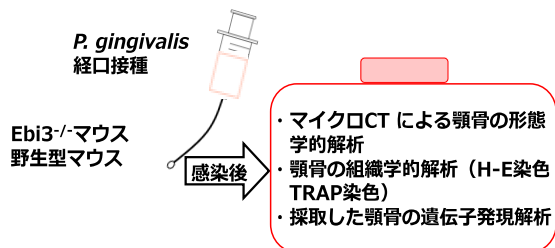
ているかについては明らかとなっていない。

2. 研究の目的

そこで、申請者は歯周病関連細菌刺激による炎症性骨吸収において、IL-35 の影響を検討することを目的として、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスに *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を経口接種し実験的歯周炎を惹起させ歯周病病態の比較検討を行う。

3. 研究の方法

IL-35 が炎症性歯周組織の Th17 細胞に与える影響を確認するために、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスを用い、顎骨の組織学的および形態学的解析を行う。具体的には、実験的歯周炎を惹起させるために、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスに *P. gingivalis* 菌体浮遊液 (1×10<sup>10</sup> cells/ml) 300 $\mu$ l を合計 5 回投与し、6 週後に屠殺する。連続切片を作成し、H-E 染色と TRAP 染色を行い、主に下顎第 1 臼歯と第 2 臼歯の歯周組織を解析する。また、 $\mu$ -CT 撮影を行い、3D 画像での観察と残存骨量を計測・数値化する。



4. 研究成果

歯周病病態での Th17 関連免疫応答における IL-35 の役割を明らかにすることを目的とし、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスに *P. gingivalis* を経口接種し実験的歯周炎を惹起させ歯周病病態の比較検討を行った。その結果、Ebi3<sup>-/-</sup>マウス、野生型マウスともに *P. gingivalis* を感染させることで歯槽骨吸収が認められ、さらに、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスに *P. gingivalis* を感染させた群において最も歯槽骨吸収が認められた (図1、2)。

図1 **Micro-CT images of mandibles**

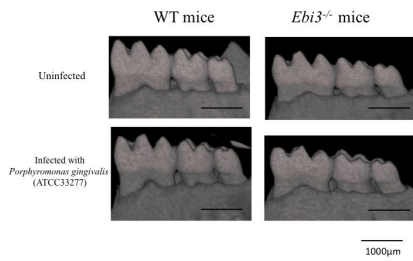
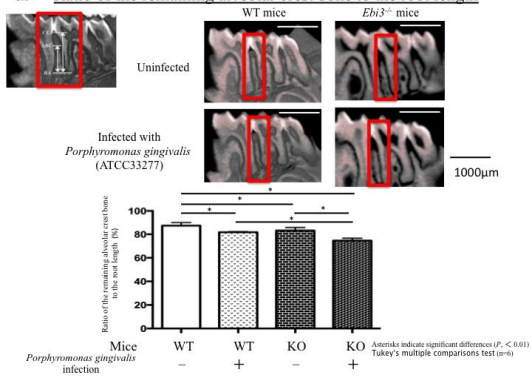


図2 **Ratio of the remaining alveolar crest bone to the root length**



また、HE染色(図3)とTRAP染色(図4)を行った組織切片像にて、各群とも比較して顕著な差は認められなかった。

図3 **Histological analysis of mandibles (hematoxylin and eosin (H&E))**

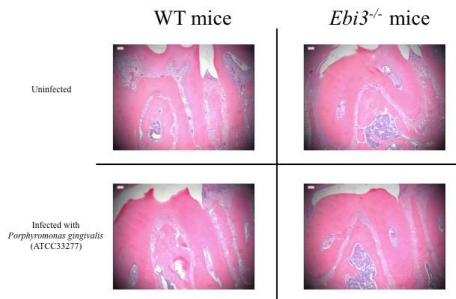
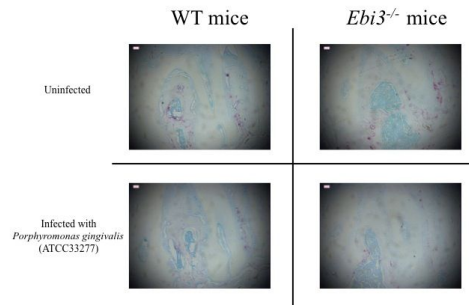


図4 **Histological analysis of mandibles (tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP))**



## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 久嗣 (GOTO Hisashi)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号: 10783037

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
菊池 毅 (KIKUCHI Takeshi)  
岡田 康佑 (OKADA Kosuke)