

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11727

研究課題名(和文) 歯根嚢胞におけるIL-22の病態への関与と制御の可能性

研究課題名(英文) Potential role of interleukin-22 in the pathogenesis of periapical cysts

研究代表者

小越 菜保子 (Kato-Kogoe, Nahoko)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：60509115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯根嚢胞は、根尖性歯周炎における慢性的炎症性刺激によって形成されると考えられている。インターロイキン22(IL-22)は、免疫細胞から産生され、感染防御および組織再生に重要な役割を果たすことが知られているサイトカインであることから、本研究は歯根嚢胞の病態におけるIL-22の機能について解析を行った。臨床検体を用いて歯根嚢胞の病巣局所のIL-22発現様態を明らかにした。手術時摘出組織から樹立した細胞株は、IL-22存在下で間葉系幹細胞の性質を示すことが明らかになった。したがって、IL-22が歯根嚢胞の病巣局所で間葉系幹細胞の分化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、歯根嚢胞の病態におけるIL-22の関与を明らかにする基礎的研究であるが、この成果は慢性炎症組織において免疫系と間葉系の細胞の相互作用が果たす機能を理解する上で重要な知見であり、その制御によって新たな治療標的となり得る可能性がある。

IL-22が歯根嚢胞由来の間葉系幹細胞の分化に関与することは、この細胞が近年、歯根膜由来幹細胞や歯髄由来幹細胞と同様に再生医療に有用である可能性が明らかになってきたことから、今後この分野での応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Periapical cysts are believed to be formed through epithelial proliferation due to the chronic inflammatory irritation in apical periodontitis. Therefore, this study focused on interleukin 22 (IL-22), which is produced by immune cells, acts on epithelial cells, and plays a vital role in infection defense and tissue regeneration. Our results demonstrated the expression of IL-22 and its receptor (IL-22R) in the lesion of human periapical cysts. The cell lines established from surgically removed tissues of periapical cysts exhibited IL-22R expression and high levels of mesenchymal stem cell markers. Moreover, IL-22 stimulation enhanced the expression of some mesenchymal stem cell markers. Therefore, IL-22 may be involved in the differentiation of mesenchymal stem cells in the focal area of periapical cysts.

研究分野：歯内免疫病理学

キーワード：歯根嚢胞 IL-22 間葉系幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎は感染根管に対する防御と組織の破壊と修復によって特徴づけられる。根尖性歯周炎において、慢性的な炎症性刺激が持続することによってマラッセの上皮遺残由来の細胞が増殖し、歯根嚢胞が形成されるとされるが、根尖性歯周炎のすべてが歯根嚢胞になるわけではなく、その発症機序に関して詳細は明らかでない。近年、歯根嚢胞において免疫細胞、上皮細胞および間葉系細胞が産生する因子が病態形成に重要であることがわかってきた (Bernardi L et al., J Endod. 2015)。

インターロイキン 22 (IL-22) は、約 10 年前に同定されたサイトカインで消化管や気道、皮膚といった外界に接する組織に発現が高い。これらの組織では、リンパ球などの免疫細胞から産生される IL-22 が、上皮細胞に発現する IL-22 レセプター (IL-22R) を介して、抗菌ペプチドやケモカイン産生を誘導し、感染防御に関わる (Wolk K et al., Eur J Immunol. 2006) とともに、上皮細胞の分化に影響を与え、組織修復にも重要であることが報告されている (Sonnenberg GF et al., Nat Immunol. 2011)。

根尖性歯周炎においてリンパ球が産生するサイトカインについての知見は多い (Colić M et al., Mol Immunol. 2009)。IL-22 産生性の T リンパ球が根尖病巣の局所に多いという報告がある (Aranha AM et al., J Endod. 2013)。また、IL-22KO マウスの研究から、根尖病巣の病態に IL-22 が関与していることが示唆されている (de Oliveira KM et al., Int Endod J. 2015)。したがって、IL-22 が根尖病巣において上皮細胞や間葉系細胞に作用し、歯根嚢胞の病態形成に影響を及ぼしている可能性がある。しかしながら、歯根嚢胞を構成する上皮細胞および間葉系細胞における IL-22 のレセプター発現様態、作用機構に関しては何もわかっていない。

我々はこれまでに歯周病の病態における IL-22 の役割に着目して研究を進めてきた。その結果、歯周病細菌抗原に対して特異的な IL-22 産生性 T 細胞が存在すること、IL-22 レセプターは歯周局所の歯根膜細胞、歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞において高発現していること、IL-22 は歯根膜細胞に対して骨芽細胞様細胞への分化を誘導することを明らかにした (Kato-kogoe N et al., Cytokine. 2012)。これらの成果と IL-22 産生細胞が根尖病巣において存在するという報告を考え合わせると、根尖病巣の病巣局所の上皮細胞や、間葉系細胞が IL-22 レセプターを発現し、感染防御あるいは組織再生に関わっている可能性がある。したがって、歯根嚢胞の病態形成において IL-22 が鍵を握るに違いないと考え着想に至った。

### 2. 研究の目的

本申請課題は根尖性歯周炎の病態を明らかにする一環として、免疫系のサイトカインである IL-22 に着目し、その歯根嚢胞の病態への関与を明らかにし、制御の可能性を探ることを目的とした基礎的研究として位置づけられる。研究期間内の目標は以下の 2 点に絞った。

- (1) ヒト歯根嚢胞の病巣局所における IL-22 レセプターの発現様態を把握し、細菌感染様態や炎症状態との関連も明らかにする。
- (2) 歯根嚢胞を構成する細胞に対する IL-22 の感染防御や組織再生といった生物学的活性に及ぼす影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 組織の採取

大阪医科大学附属病院歯科口腔外科を受診した患者を対象として、手術適応になった歯根嚢胞および濾胞性歯嚢胞の摘出組織を採取した。患者から組織の採取を行う際には、大阪医科大学研究倫理委員会の承認を得た計画(承認番号: 臨-548(2264))に従い、患者に対して十分な説明を行い、同意を得た上で実施した。採取した組織サンプルを分割して、免疫組織化学用に Zamboni 固定液に、mRNA および細菌 DNA 採取用に RNA later® 液 (Ambion 社製) に、細胞株樹立用に PBS 緩衝液に、それぞれ浸した状態で輸送、保存した。

#### (2) IL-22 および IL-22 レセプターの発現の解析

採取した組織における IL-22 および IL-22R の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて定量した。また、IL-22R の局在性および産生細胞を明らかにするために、免疫組織化学的解析を行った。

#### (3) 細胞株の樹立

採取組織から、上皮細胞および間葉系細胞の分離・培養を行い、細胞株を樹立した。採取した組織を抗生物質含有 PBS で洗った後に、メスで細切し、酵素処理した後に、セルストレーナーでろ過し、遠心後、細胞を培養ディッシュに播種した。上皮細胞は上皮細胞用培地 (KGM; COMBR 社) にて、間葉系細胞は 10%FBS および抗生物質含有 D-MEM 培地にて培養を行い、80% コンフルエントになった状態で実験に用いた。

#### (4) 細胞株における IL-22 レセプターおよび間葉系幹細胞のマーカー遺伝子発現の解析

樹立した細胞株が IL-22 レセプターおよび間葉系幹細胞のマーカーを発現していることを、リアルタイム RT-PCR 法および Western Blotting 法にて確認した。

#### (5) IL-22 によって誘導される遺伝子プロファイルの網羅的解析

樹立した細胞株を IL-22 存在下あるいは不在下で 48 時間培養後、total RNA を回収し、cDNA マイクロアレイ法 (ABI TaqMan™ Gene Expression Assays Human Mesenchymal Stem Cell) にて遺伝子発現量を網羅的に定量し比較解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト歯根嚢胞の病巣局所における IL-22 および IL-22 レセプターの発現

臨床検体として、歯根嚢胞組織を 19 検体、歯根嚢胞以外の嚢胞の組織を 28 検体採取した。調べたすべてのサンプルにおいて、IL-22 および IL-22R の mRNA 発現を検出することができた。免疫組織化学的解析の結果、一部の炎症性細胞において IL-22 の発現、上皮および間質に IL-22R の発現がみられた。歯根嚢胞とそれ以外の嚢胞において、明らかな違いは見られなかった。

##### (2) 歯根嚢胞の手術摘出組織から樹立した細胞株

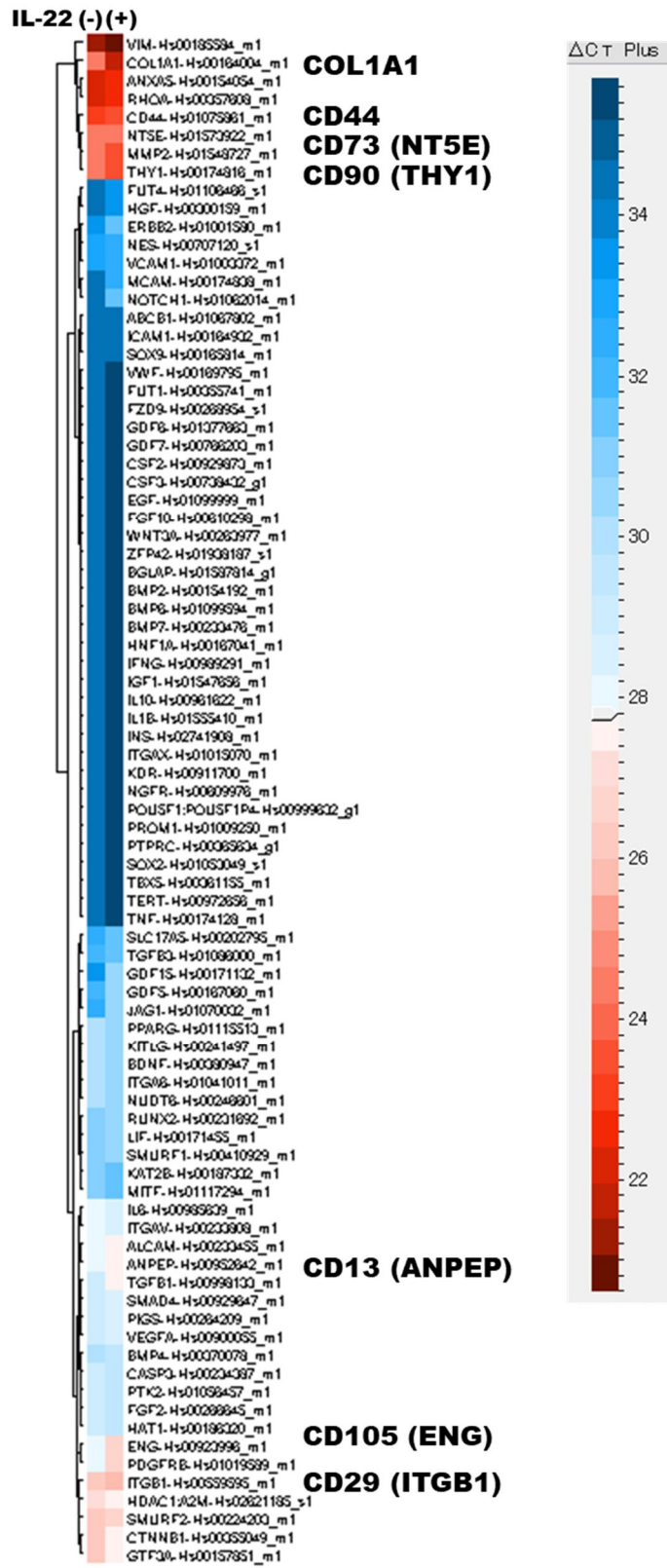
歯根嚢胞 5 症例(年齢 41-66 歳, 男女比 4/1) とコントロールとして歯根嚢胞以外の顎骨嚢胞 9 症例(年齢 22-69, 男女比 7/2) から細胞株を樹立した。歯根嚢胞由来の細胞株 15、濾胞性歯嚢胞由来の細胞株 22 を樹立することができた。

##### (3) 細胞株の IL-22 レセプターおよび間葉系幹細胞マーカー発現

樹立した歯根嚢胞由来細胞株の IL-22R 発現を mRNA レベルおよびタンパクレベルで確認した。細胞株によって発現レベルは異なるものの、すべての株で IL-22R 発現が検出された。これらの細胞株は、間葉系幹細胞のマーカーである CD44 (ANPEP), CD73 (NT5E), CD90 (THY1), CD29 (ITGB1), CD13 (ANPEP) および CD105 (ENG) を高発現していた。

##### (4) IL-22 による間葉系幹細胞のマーカーの発現

樹立した歯根嚢胞由来細胞株を IL-22 存在下で培養した時には、IL-22 なしの場合と比較して ENG, ITGB1 および ANPEP などの mRNA 発現レベルが高い傾向があった。さらに、間葉系幹細胞に関連する遺伝子発現量をアレイキットで網羅的に評価したところ、IL-22 刺激によって発現レベルが上昇する複数の遺伝子、COL1A1 (collagen type I alpha 1), NOTCH1 (notch 1) などが明らかになった(上図)。



以上より、IL-22 が歯根嚢胞の病巣局所で間葉系幹細胞の分化に関与する可能性が示唆された。近年、歯根嚢胞由来の間葉系幹細胞は、歯根膜由来幹細胞や歯髓由来幹細胞と同様に再生医療への応用が期待されていることから、本研究で樹立した細胞株の性質をさらに評価することが、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大山 秀樹  (Ohyama Hideki)  (90280685)	大阪医科大学・医学部・非常勤講師   (34401)	
研究分担者	植野 高章  (Ueno Takaaki)  (60252996)	大阪医科大学・医学部・教授   (34401)	
研究分担者	山根木 康嗣  (Yamanegi Koji)  (00434944)	兵庫医科大学・医学部・講師   (34519)	
研究分担者	木村 吉宏  (Kimura Yoshihiro)  (00351388)	大阪医科大学・医学部・非常勤講師   (34401)	
研究分担者	中島 世市郎  (Nakajima Yoichiro)  (10720691)	大阪医科大学・医学部・非常勤医師   (34401)	
研究分担者	寺井 陽彦  (Terai Haruhiko)  (70207471)	大阪医科大学・医学部・教授   (34401)	