

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09548

研究課題名(和文) 口腔粘膜における抗ウイルス自然免疫応答に対するIL-29の役割とその臨床応用

研究課題名(英文) Potential role of interleukin-29 in oral mucosal defense against viruses

研究代表者

四釜 洋介 (Shikama, Yosuke)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・副部長

研究者番号：10588908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、III型インターフェロン(IFN)の一つであるIL-29を臨床応用するための基礎研究を行う事を目的とした。i) ヒト歯肉上皮初代培養細胞において IL-29 はウイルス核酸受容体であるRIG-IおよびTLR3発現を誘導する事、ii) TLR3 agonistまたはRIG-I agonist刺激により、IL-6, IL-8, IFN-beta産生が誘導され、IL-29前処理によりそれら産生が増強される事、iii) ヒト歯肉上皮組織において、IL-29受容体であるIFN-lambdaR1が遺伝子・タンパクレベルで発現している事、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスに関する研究は非常に幅広く行われているが、口腔粘膜における抗ウイルス能の増強、賦活作用に着目した検討はほとんど行われていない。歯科領域疾患の中で、ウイルス感染に起因する疾患の予防、治療法開発は臨床上非常に重要であると考えられる。本研究はIL-29が口腔粘膜を介したウイルス感染予防法として臨床応用出来る可能性を示した、意義深い研究である。

研究成果の概要(英文)：Interferon (IFN) lambda-1 (IFN-l1), a type III IFN, exhibits type I IFN-like antiviral activity. In contrast to ubiquitously expressed type I IFN receptors, IFN-l receptor 1 (IFN-IR1) is mainly expressed on epithelial cells. The regulation of type III IFN receptor expression and its functions in the oral mucosa remain unclear. We herein showed the expression of IFN-IR1 in human gingival keratinocytes. The expression of IL-6 and IL-8 in human primary gingival keratinocytes (HGK) was significantly higher following treatments with either type I IFN (IFN-b) or type II IFN (IFN-g) than with IFN-l1. However, the IFN-l1 treatment strongly induced toll-like receptor (TLR) 3 and retinoic acid-inducible gene I (RIG-I), which mainly recognize viral nucleic acids, via the STAT-1-mediated pathway. Furthermore, a stimulation with a RIG-I or TLR3 agonist promoted the production of IL-6, IL-8, and IFN-b in HGK, which was significantly enhanced by a pretreatment with IFN-l1.

研究分野：免疫学 ウイルス学 病理学

キーワード：口腔粘膜 自然免疫 ウイルス感染

## 様式 F - 19 - 1

### 1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜疾患の原因は多岐にわたるが、ウイルス感染が原因と考えられている疾患も数多く存在し、口腔領域で最も多い悪性病変である扁平上皮癌の発症にもウイルス感染が関与している事が明らかになっている。宿主細胞が細菌やウイルス等の病原体を感知する認識機構として、病原体で保存された特徴的な構造(pathogen-associated molecular patterns: PAMPs)を認識するパターン認識受容体(pattern recognition receptor: PRR)を発現している。現在まで様々な病原体由来の PAMPs が報告されており、それらの中でもウイルスや細菌由来の核酸は免疫応答を強力に誘導する事が明らかになっている。近年、口腔粘膜を構成する上皮細胞や線維芽細胞にも病原体由来核酸に対する PRR が発現しており、核酸刺激により自然免疫反応を介した I 型 IFN や炎症性サイトカイン/ケモカイン産生を誘導する事が多数報告されている。本研究は、口腔粘膜においてウイルス核酸認識を担う PRR 発現を誘導する様な物質があれば、ウイルス感染に起因する口腔粘膜疾患の予防法として臨床応用できるのではないかと仮説のもと、III 型 IFN の一つである interleukin(IL)-29 を臨床応用するための礎となる基礎研究を行う事を目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究は IL-29 の特徴である下記 2 点

- (1) 全組織で受容体が発現している I 型 IFN とは異なり、III 型 IFN 受容体は臓器特異性が高く、肝臓および上皮系細胞に受容体が高発現している。
- (2) I 型 IFN に比べ抗ウイルス作用に関連する遺伝子誘導能は長時間持続する。

を活かし、口腔粘膜上皮細胞において、IL-29 シグナルを介し PRR 発現を誘導する分子メカニズムを明らかにし、IL-29 タンパクをウイルス感染に起因する口腔粘膜疾患の予防薬として臨床応用するための礎となる基礎研究を行う。具体的には

ヒト歯肉上皮細胞(HGK)及びヒト歯肉切片における IL-29 シグナル、IL-29 受容体発現解析  
HGK における、PRR である retinoic acid-inducible gene-1(RIG-I)及び toll-like receptor 3(TLR3)アゴニスト誘導性 I 型 IFN および炎症性サイトカイン/ケモカイン産生に対する IL-29 の効果  
、 に対する JAK/STAT シグナル経路の関連性

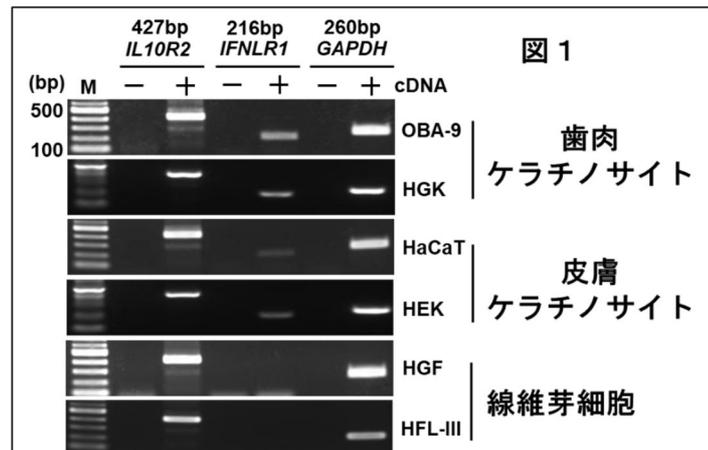
### 3. 研究の方法

解析すべき I 型 IFN および炎症性サイトカイン/ケモカイン候補として、PRR を介し誘導される事が知られている IFN $\beta$ 、IL-6、IL-8 があげられる。IL-29 は受容体に結合すると、細胞内ドメインに結合した janus kinase (JAK)<sup>1</sup> および tyrosine kinase (Tyk)<sup>2</sup> を介し signal transducer and activator of transcription (STAT)<sup>1</sup> をリン酸化する事で IFN 関連遺伝子を誘導し、抗ウイルス作用を発揮する事が知られている。IL-29 による RIG-I 及び TLR3 発現誘導に対する、STAT1 阻害剤である S14-95 の影響を、western blot 法を用い検討する。RIG-I アゴニストである 3p-hpRNA または TLR3 アゴニストである Poly(I:C)刺激による IFN $\beta$ 、IL-6、IL-8 産生に対す

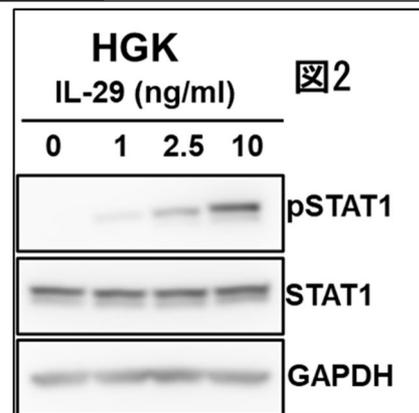
る IL-29 の効果を Real-time PCR 法および Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)法を用いて評価する。III 型 IFN 受容体は IL-10R2(低親和性)と IFN- $\lambda$ R1(高親和性)の 2 量体からなり、IL-10R2 はユビキタスに発現しているのに対し、IFN- $\lambda$ R1 は組織特異性が高く、肝細胞および腸管上皮や気道粘膜上皮等の上皮系細胞に高発現している事が知られているが、口腔粘膜での発現の有無は不明である。これら背景から、免疫組織化学染色法を用い、ヒト歯肉組織における III 型 IFN 受容体発現を解析する。

#### 4 . 研究成果

まず始めに、口腔由来上皮細胞における IL-29 受容体発現レベルを PCR により検討した。IL-10R2 はヒト歯肉由来 (OBA-9:不死化, HGK:初代培養) ヒト表皮由来 (HaCaT:不死化, HEK:初代培養) ヒト線維芽細胞 (HGF:歯肉由来, HFL-III:肺由来) 全ての細胞でその発現を確認したが、IFN- $\lambda$ R1 はケラチノ

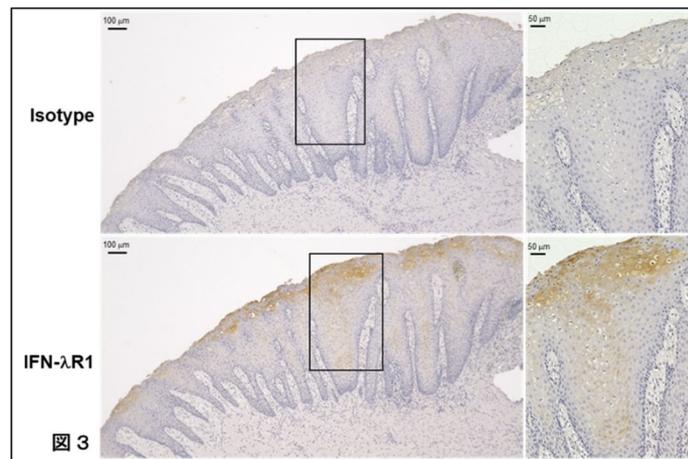


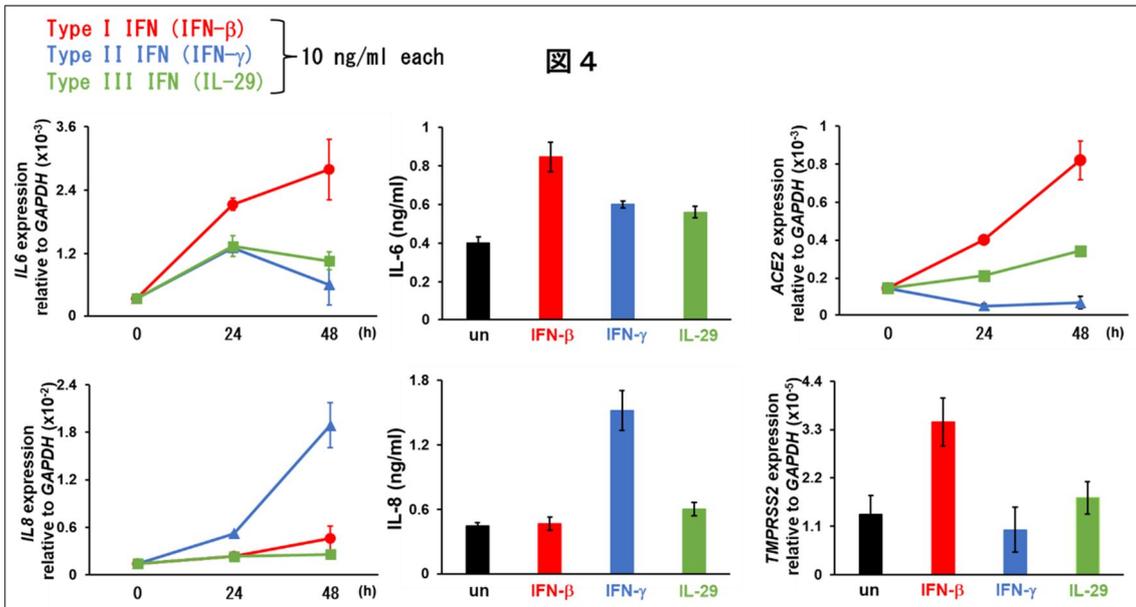
サイトのみ発現していた(図 1)。HGK において、IL-29 処理する事により濃度依存的に STAT1 がリン酸化された(図 2)。免疫組織化学染色法により、ヒト歯肉組織において IFN $\lambda$ R1 が上皮表層に発現している事を明らかにした(図 3)。



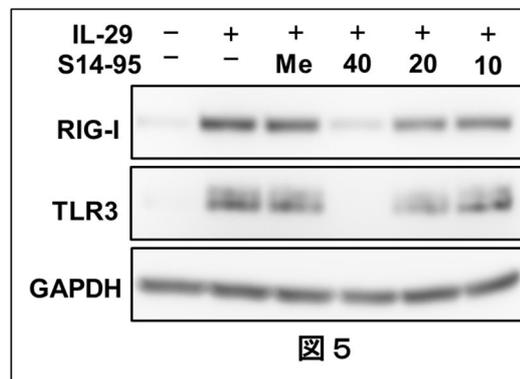
次に各種 IFN の HGK における、IL-6、IL-8、新型コロナウイルス感染に関する angiotensin-converting Enzyme 2(ACE2)、transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2)

発現におよぼす影響を検討した。遺伝子発現解析結果から、I 型 IFN である IFN- $\beta$ により IL-6 が、II 型 IFN である IFN- $\gamma$ により IL-8 が著しく発現誘導され、同様の結果が分泌量を測定した ELISA 法から明らかとなった。ACE2 や TMPRSS2 発現も IFN- $\beta$ により強く発現誘導され、これら実験結果から、IL-29 は他の IFN と比較し、炎症性サイトカインや新型コロナウイルス関連因子発現を誘導しにくい事が明らかになった(図 4)。

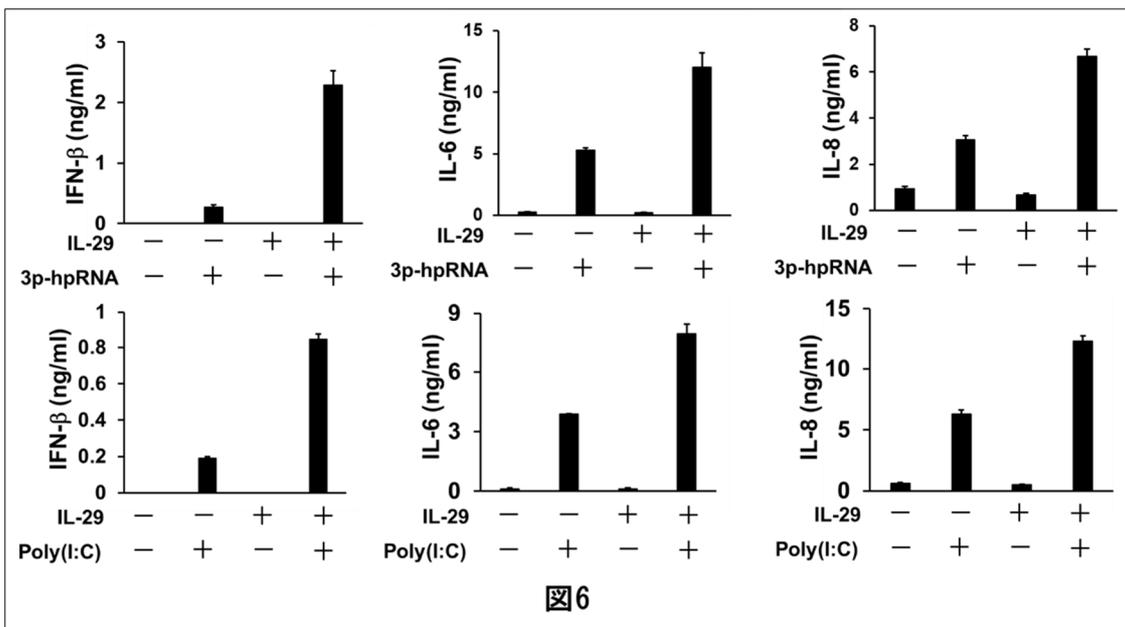




HGKにおける IL-29 の RIG-I および TLR3 発現におよぼす影響を western blot 法で解析した結果、IL-29 により両タンパク発現が誘導され、STAT1 inhibitor である S14-95 濃度依存的にそれらタンパク発現が抑制された(図 5)。RIG-I アゴニストである 3p-hpRNA、TLR3 アゴニストである Poly(I:C) が誘導する IFN- $\beta$ 、IL-6、IL-8 に対する IL-29 前処理の効果を ELISA 法により検討した。RIG-I は



麻疹や流行性耳下腺炎、インフルエンザ等の原因となる RNA ウイルス核酸認識を担う PRR、TLR3 は単純ヘルペスウイルスに由来する RNA ウイルス核酸認識を担う PRR である。HGK において、IL-29 前処理により、IFN- $\beta$ 、IL-6、IL-8 産生が増強する事を明らかにした(図 6)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kurosawa Mie, Shikama Yosuke, Furukawa Masae, Arakaki Rieko, Ishimaru Naozumi, Matsushita Kenji	4. 巻 22
2. 論文標題 Chemokines Up-Regulated in Epithelial Cells Control Senescence-Associated T Cell Accumulation in Salivary Glands of Aged and Sjogren's Syndrome Model Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2302 ~ 2302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa Masae, Wang Jingshu, Kurosawa Mie, Ogiso Noboru, Shikama Yosuke, Kanekura Takuro, Matsushita Kenji	4. 巻 63
2. 論文標題 Effect of green propolis extracts on experimental aged gingival irritation in vivo and in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 58 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamoto Mariko, Yun Yuna, Omine Mariko, Mori Sarasa, Shuto Emi, Nakamoto Akiko, Hata Akiko, Aki Nanako, Shikama Yosuke, Bando Yukiko, Ichihara Takako, Minagawa Takako, Tamura Ayako, Kuwamura Yumi, Funaki Makoto, Sakai Tohru	4. 巻 67
2. 論文標題 Dietary diversity and characteristics of lifestyle and awareness of health in Japanese workers : a cross-sectional study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 255 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.67.255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chaweewannakorn Chayanit, Harada Takashi, Nyasha Mazvita R., Koide Masashi, Shikama Yosuke, Hagiwara Yoshihiro, Sasaki Keiichi, Kanzaki Makoto, Tsuchiya Masahiro	4. 巻 238
2. 論文標題 Imaging of muscle activity induced morphometric changes in fibril network of myofascia by two photon microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 515 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joa.13339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Masae, Yamada Kiyoko, Kurosawa Mie, Shikama Yosuke, Wang Jingshu, Watanabe Maki, Kanekura Takuro, Matsushita Kenji	4. 巻 98
2. 論文標題 High concentration of glucose induces filaggrin-1 expression through AP-1 in skin keratinocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 137 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsushita Kenji, Yamada-Furukawa Masae, Kurosawa Mie, Shikama Yosuke	4. 巻 Volume 13
2. 論文標題 Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer 's Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 275 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JIR.S255309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Endo Yasuo, Funayama Hiromi, Yamaguchi Kouji, Monma Yuko, Yu Zhiqian, Deng Xue, Oizumi Takefumi, Shikama Yosuke, Tanaka Yukinori, Okada Satoshi, Kim Siyoung, Kiyama Tomomi, Bando Kanan, Shima Kazuhiro, Suzuki Hikari, Takahashi Tetsu	4. 巻 140
2. 論文標題 Basic Studies on the Mechanism, Prevention, and Treatment of Osteonecrosis of the Jaw Induced by Bisphosphonates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 63 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamoto M, Omine M, Yun Y, Shuto E, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minamigawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Associations of Dietary Diversity With Allergic Diseases in Japanese Workers: A Cross-Sectional Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asia Pac J Clin Nutr	6. 最初と最後の頁 857-869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6133/apjcn.201912_28(4).0023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shikama Yosuke, Kurosawa Mie, Furukawa Masae, Ishimaru Naozumi, Matsushita Kenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Involvement of adiponectin in age-related increases in tear production in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 8329 ~ 8346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.102322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 四釜洋介、黒澤実愛、松下健二	4. 巻 22
2. 論文標題 IL-29 は口腔粘膜上皮細胞においてRIG-IおよびIFI-16発現誘導を介し 抗ウイルス活性を増強する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 エンドトキシン・自然免疫研究 2 エンドトキシン・自然免疫研究の新たな可能性を求めて	6. 最初と最後の頁 40-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamoto M, Shuto E, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minagawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Soy product and isoflavone intake associations with allergic diseases in Japanese workers: rhinitis, dermatitis and asthma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition	6. 最初と最後の頁 1277-1285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6133/apjcn.201811_27(6).0015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shikama Y.	4. 巻 60
2. 論文標題 Free fatty acids may be involved in the pathogenesis of oral-related and cardiovascular diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 65-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shikama Yosuke, Kurosawa Mie, Furukawa Masae, Kudo Yasusei, Ishimaru Naozumi, Matsushita Kenji	4. 巻 45
2. 論文標題 The Priming Potential of Interferon Lambda-1 for Antiviral Defense in the Oral Mucosa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1348 ~ 1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-022-01624-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 四釜洋介
2. 発表標題 加齢に伴う涙液分泌の変化：ヒトとマウスの相違およびアディポネクチンの関連性
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介
2. 発表標題 老化関連T細胞および唾液腺上皮の細胞老化が口腔乾燥症の病態形成に關与する可能性
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 四釜洋介、黒澤実愛、古川匡恵、松下健二
2. 発表標題 老齡マウスにおけるアディポネクチンと涙液分泌の關連性
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurosawa Mie, Furukawa Masae, Matsushita Kenji, Shikama Yosuke
2. 発表標題 Senescence-associated T-lymphocytes accumulate in the submandibular glands of aged mice
3. 学会等名 97th IADR General Session (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 四釜洋介、黒澤実愛、古川匡恵、松下健二
2. 発表標題 エストロゲンの欠乏は唾液腺上皮細胞にCXCL13産生を誘導し、老化関連T細胞集積を促進する
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介
2. 発表標題 免疫老化及び細胞老化による唾液腺へのSA-T細胞集積メカニズムの解析
3. 学会等名 第38回分子病理学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介
2. 発表標題 唾液腺上皮の細胞老化及び免疫老化が唾液腺機能に与える影響: 老齢マウスおよびモデルマウスを用いた解析
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 四釜洋介
2. 発表標題 加齢および脂質代謝異常によるドライマウス発症機序とその病態解明
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四釜洋介、黒澤実愛、山田(古川)匡恵、松下健二
2. 発表標題 口腔粘膜におけるIL-29の抗真菌および抗ウイルス作用：臨床応用の可能性
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四釜洋介、黒澤実愛、松下健二
2. 発表標題 IL-29は口腔粘膜上皮細胞においてRIG-I発現誘導を介し抗ウイルス活性を増強する
3. 学会等名 第24回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四釜洋介、古川匡恵、松下健二
2. 発表標題 III型interferon(IFN)であるinterleukin(IL)-29の口腔粘膜における抗ウイルス応答増強作用
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部ホームページ  
<https://www.ncgg.go.jp/ri/lab/gero/department/oralscience/home.html>  
四釜洋介ホームページ  
<http://shikamax.net/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------