

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592397
 研究課題名（和文）歯周組織における可溶性インターロイキン1タイプ2レセプターの役割
 研究課題名（英文）A function of soluble Interleukin-1 receptor type 2 for periodontal tissue.
 研究代表者
 石原 裕一（ISHIHARA YUICHI）
 愛知学院大学・歯学部・准教授
 研究者番号：50261011

研究成果の概要：歯周病は歯垢の中の細菌が出す病原物質に生体の白血球が反応してインターロイキン-1（IL-1）というタンパクを歯周組織に放出し歯槽骨（歯を支える骨）が破壊される病気である。近年この IL-1 のある種の受容体は IL-1 の刺激の伝達だけでなく IL-1 の働きを抑制することが明らかとなった。そこでその受容体の、歯周組織での働きを調べたところ、歯周組織が急速に破壊される歯周病患者ではその受容体の産生が著しく低下していることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
2008年度	1,800,000円	540,000円	2,340,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯肉溝浸出液、インターロイキン-1、可溶性インターロイキン-1タイプ2レセプター、侵襲性歯周炎、

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病関連細菌の感染に伴う局所の炎症性骨破壊により、歯を喪失する疾患であることが知られている。研究代表者の研究グループは歯周病関連細菌の内毒素(LPS)や莢膜多糖(CP)が *in vitro* の実験系において、骨吸収活性や破骨細胞形成能を有することを明らかに

してきた。さらにその一連の研究の中で LPS や CP による骨吸収には、プロスタグランジン E₂ やインターロイキン-1(IL-1)が深く関与していることを明らかとした。とくに IL-1 は破骨細胞の分化・活性化に骨芽細胞との RANKL-RANK の接触を介することなく、IL-1 が直接、破骨細胞を分化・活性化することが国内外の研究グループに

より明らかとなり、歯周炎における炎症性骨吸収には IL-1 が最も密接に関与していると考えられている。また IL-1 は IL-1 レセプターに拮抗的に結合する IL-1 レセプターアンタゴニスト(IL-1ra), IL-1 の標的細胞の膜表面に結合して働く IL-1type II レセプター(IL-1type II R), および細胞外領域が細胞膜からプロテアーゼにより切断された可溶性 IL-1type II R によりその活性は調節されていることが明らかとなった。以上のことから、歯周病の病態の多様性は病態の進行に関与する IL-1 とそのインヒビターである IL-1ra や IL-1type II R の産生のバランスが影響しているのではないかと考え、その両者を基礎的ならびに臨床的に比較検討してみることを着想した。

2. 研究の目的

GCF 中の IL-1 α と IL-1ra は歯周組織に炎症が存在する場合、非常に高濃度に検出されるが炎症をコントロールすることによりその濃度は急速に低下することがこれまでの研究で明らかとなった(Ishihara, Y., Nishihara, T., Kuroyanagi, T. et al., *J. Periodont. Res.*, 32:524-529; 1997). また免疫組織学的に歯周組織における IL-1 の局在を調べたところ、IL-1 α と IL-1ra 産生細胞は歯肉上皮組織に多数観察された。おそらく IL-1 α と IL-1ra は歯肉上皮の炎症を直接反映しているが歯槽骨吸収にはそれほど関与していないのではないかと考えられた。しかし歯肉上皮の炎症をコントロールしても GCF 中の IL-1 β 濃度は上昇するか、変化しない場合が観察された(Yoshinari N, Kawase H, Mitani A, Ito M, Sugiishi S, Matsuoka M, Shirozu N, Ishihara Y, Bito B, Hiraga M, Arakawa K, Noguchi T.: Effects of scaling and root planing on the amounts of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist and the mRNA expression of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid and gingival tissues. *J. Periodont. Res.*,

39(3):158-167, 2004). IL-1 β 産生細胞は歯肉上皮組織だけでなく、より深部の歯肉結合組織に存在したことやヒト末梢血単核球を LPS で刺激した場合、IL-1 β の方が IL-1 α より高濃度に検出されたことから、歯周病における炎症性骨吸収は IL-1 β の産生のコントロールが重要であると考えられた。さらに IL-1 β は IL-1type II R への親和性が IL-1 α より強いことから、炎症性歯周組織では、IL-1ra だけでなく可溶性 IL-1type II R によっても IL-1 β の産生は制御されていると考えられ、おそらく急速な歯槽骨吸収を伴う歯周炎患者の GCF 中の可溶性 IL-1type II R 濃度は、歯周組織健常者や軽度な歯周炎患者より低下していると予想される。したがってこれまでと同様に歯周病患者より GCF を採取し、GCF 中の IL-1 β 濃度と可溶性 IL-1type II R 濃度を比較検討することを目的とする。

3. 研究の方法

歯肉溝滲出液中の可溶性 IL-1type II R 濃度と臨床所見との関連性について

(1) 被験者の選択: 愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科を受診し、特記すべき全身疾患を有さず、また過去3ヶ月に遡り抗菌剤や消炎酵素剤等の投与を受けていない者で、本研究の主旨に同意し、倫理委員会にて承認を得た同意書に署名した歯周炎患者を被験者とする。(代表者:石原裕一, 分担者:亀井英彦)

(2) GCF サンプル採取: GCF サンプルは、被験部位を簡易防湿し完全に唾液の混入を防いだ後、綿球にて歯肉縁上プラークを可及的に除去し、エアージンジにてエアで歯肉溝内を一旦乾燥させた後、出血によりペリオペーパーが、汚染されないように十分注意し、ペリオペーパーを歯肉溝の歯肉縁下約1mm まで挿入し 30 秒間静置し吸湿採取する。同様の操作を被験歯に対して3回繰り返し合計3本のペリオペーパー

一を1被験歯の GCF サンプルとする。ペリオペーパーは、直ちに Periotron 8000 を用いて、ペリオトロン値と湿重量を測定する。ペリオペーパーに採取された総 GCF 量は、GCF の比重を 1.0 と仮定しペリオペーパーの重量から容量を換算し求める。但し、GCF サンプル採取の時期は、GCF サンプルの採取は、①初診時、②歯周基本治療におけるプラークコントロールにより歯肉辺縁の炎症がコントロールされた時、とする。

(3) GCF サンプルの調整と保存：ペリオペーパーに、0.5%牛血清アルブミン入りの生理食塩水 100ml を加え、10 分間連続的に震盪しペリオペーパーに含まれる GCF を十分に PBS に溶出させてから可及的に GCF を含む PBS を回収し、10 分間 3,500rpm にて遠心処理をした後その上清を回収する。GCF サンプルは、測定までの間 -80°C にて保存する。

(4) GCF 中の IL-1 の測定：GCF サンプルの IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra 量の測定には、高感度で迅速な測定法である酵素免疫測定 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) 法を用いる。ELISA を行う際には、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra、可溶性 IL-1type II R について、それぞれの ELISA キットを使用する。

(5) 結果の解析：GCF サンプルの IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra 量の相関、さらには臨床所見との相関については統計用ソフト SPSS (SPSS 11.0J for windows) を用い解析を行う。

歯周組織での IL-1type II R 産生細胞の同定

(1) パラフィン包埋切片の作製：GCF サンプルの場合と同様にインフォームドコンセントを得た患者より、歯周外科手術時に炎症性歯肉サンプルを採取する。得られた歯肉サンプルをホルマリン固定し、パラフィン包埋切片を作製する

(2) IL-1type II R 産生細胞の同定：各種 IL-1

に対する、モノクローナル抗体を用い各種 IL-1 の発現細胞の局在を調べる。

In vitro の実験系を用い、免疫化学的・分子生物学的に産生のメカニズムを解析

(1) 「歯周組織での IL-1 産生細胞の同定」の結果から発現強度の高い細胞種を数種類選択し、歯周組織から細胞株を樹立し、歯周病原性細菌の菌体成分 LPS や CP で培養し、産生される IL-1 β 、または IL-1 α に対し、可溶性 IL-1type II R と IL-1ra がどの程度 IL-1 β 産生を抑制するかどうかを調べる。

4. 研究成果

研究課題を研究計画にしたがい、臨床研究と基礎研究を行った。臨床研究として病態の異なる慢性歯周炎患者と侵襲性歯周炎患者より歯肉溝浸出液 (GCF) を採取し、インターロイキン-1 β (IL-1 β) と可溶性 IL-1 タイプ 2 レセプター (type II R) を ELISA 法にて測定したところ、IL-1 β の検出率ならびにその濃度は両群間においてほぼ同程度であったのに対し、可溶性 IL-1type II R は侵襲性歯周炎患者の方が理由はまだわからないが、検出されにくい場合が多かった。しかし検出された被験歯での IL-1 type II R 濃度は両疾患群でほぼ同程度であった。次に臨床研究での現象をもとに、ヒトの歯周組織を用いて、免疫染色を行ったところ、歯肉上皮細胞に IL-1 type II R の強い局在が観察された。そこで、マウス株化歯肉上皮細胞を用いて、遺伝子とタンパクレベルでの解析を進めたところ、IL-4 と IL-13 によって歯肉上皮細胞から産生される IL-1type II R は増加し、IFN- γ によって産生が減少することが明らかとなった。この結果について現在投稿準備中である。歯周病関連細菌による歯周病モデルは今回の研究期間内には確立することはできな

ったが、研究期間終了後も引き続き研究を継続し、実験系が確立後に IL-1type II R の実験的歯周炎に対する影響を形態学的に免疫組織学ならびに画像解析による定量により評価したいと考えている。計画した実験をすべて完了させられなかったが、これまでに明らかになったことから、IL-1type II R は歯周炎の進行に対し防御的に働いていることが示唆された。

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 1 件)

1. Suzuki M, Ishihara.Y (2番目), Kamei H (9番目), 10名
Soluble Interleukin-1 Receptor Type II Levels in Gingival Crevicular Fluid in Aggressive and Chronic Periodontitis. J Periodontol,査読有,79巻,2008年,495-500.

[学会発表] (計 3 件)

1. 石原裕一, 11名, 歯周病における IL-1 レセプター-typeII の働きについて 第 21 回日本歯科医学会総会, 2008年11月15日, 横浜
2. 神谷洋介, 12名, マウス歯肉上皮細胞における typeII IL-1 レセプター発現のメカニズムについて 第 50 回秋季日本歯周病学会, 2007年9月21日, 東京
3. 神谷洋介, 7名, 歯肉上皮細胞における typeII IL-1 レセプター発現制御について 第 2 回日本歯周病学会中部地区大学 日本臨床歯周病学会中部支部 合同研究会 2007年11月11日, 名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 裕一 愛知学院大学 歯学部 准教授

研究者番号 : 50261011

(2) 研究分担者

田中 繁寿 愛知学院大学 歯学部 講師

研究者番号 : 30367619

亀井 英彦 愛知学院大学 歯学部 助教

研究者番号 : 50421243

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

鈴木万里代 愛知学院大学 歯学部 大学院生

神谷 洋介 愛知学院大学 歯学部 大学院生