

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592222

研究課題名（和文） 根尖性歯周炎の発症・拡大におけるIL-10の機能的役割

研究課題名（英文） The functional roles of IL-10 in periapical inflammation

研究代表者

鈴木 規元（SUZUKI NORIYUKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20372451

研究成果の概要（和文）：根尖性歯周炎では生体防御反応として様々な炎症・免疫反応が局所的に営まれているが、本疾患の成立および拡大に関与している因子について、その詳細は未だ不明な点が多い。本研究では、根尖性歯周炎における骨吸収および炎症の拡大に対するIL-10およびTh1サイトカインの機能的役割を、ノックアウト(KO)マウスを用いて解明することを目的とした。その結果、IL-10KOマウスにおいて、IL-12依存性のT細胞性免疫が、根尖性歯周炎における炎症性骨吸収の亢進を誘発している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The periapical lesion is a granuloma containing a mixed inflammatory infiltrate induced by local immune reaction, however, its pathogenesis and the mechanism of expansion are still unclear. In this study, we examined the roles of IL-10 and Th1 cytokines in periapical inflammation using knockout (KO) mice. We conclude that IL-12-dependent T cell-mediated responses seem to induce hyper periapical inflammation in IL-10 KO mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯内療法学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：根尖性歯周炎、IL-10、Th1サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎は、う蝕や歯牙破折に伴う歯髄経由の細菌による持続的な外来侵襲に対する生体防御反応の結果として根尖歯周組織に生じる病変である。この免疫反応は、生体の他の部位に炎症によって生じる反応と類似のものであるが、病変部の骨の吸収を伴う点において特徴的である。臨床的には慢性の経過をたどることも多いため、その病態の判定は困難であり、ときに急性症状を呈して患者に強い苦痛を与えることも少なくない。

そのため根尖性歯周炎の治療の際には、根尖病変の生物学的な状態を常に考慮しながら治療にあたることが不可欠である。一方、病変内では生体防御反応として様々な炎症・免疫反応が局所的に営まれていることが知られているが、本疾患の成立および拡大には様々な因子が関与していると考えられ、その詳細は未だ不明な点が多い。

ラットあるいはマウスの第一臼歯を露髄し、そのまま口腔内に開放または歯内疾患原因細菌を根管内に播種すると、歯髄は次第に

壊死に陥り、根尖周囲に骨吸収を伴った肉芽腫性病変が形成される。この根尖病変内にはマクロファージ、T細胞、形質細胞などさまざまな免疫担当細胞が存在することが知られているが、これまで我々が行った免疫組織化学を用いた研究より、マクロファージがもっとも優位な免疫担当細胞であり、マクロファージの活性化による形態的・機能的変化が、病変の拡大に大きく関与していることが明らかになっている。The Forsyth Institute (Boston, USA)のDr. Philip Stashenkoのグループは、マウス臼歯を露髄させることによって誘発した根尖性歯周炎における根尖周囲の骨吸収に関与するサイトカインの発現に関して、長年にわたり数多くの報告を行っている。彼らの報告によると、根尖病変内には露髄後の経過日数により種々の異なったサイトカインの発現が認められるが、根尖周囲の骨吸収の誘発にはインターロイキン(IL)-1, TNF などの炎症性サイトカインが関与しており、その中でも特にマクロファージによって産生される IL-1 の関与が強く示唆されている。IL-1 の産生および活性を含む根尖周囲の炎症は、T細胞によって産生されるサイトカイン・ネットワーク(Th1 および Th2)によって主に調節されていると考えられるが、その中でも特に IL-10 が根尖周囲の炎症の拡大に大きな役割を果たしていることが、ノックアウトマウスを用いた研究から明らかになっている。同グループの佐々木らは、IL-10 ノックアウト(KO)マウスに誘発した実験的根尖性歯周炎において、野生型マウスに比較して根尖周囲の高度の骨吸収および IL-1 をはじめとする炎症性サイトカイン産生の有意な増加が認められたと報告している。このことから、内因性 IL-10 は炎症性サイトカインの発現を抑制することにより、感染によって誘発された根尖周囲の炎症および骨吸収の抑制に重要な役割を果たしていると考えられ、根尖周囲の免疫制御において、Th2 サイトカインは Th1 サイトカインよりも優位に働いている可能性が示唆される。さらに、IL-10 KO マウスの腸炎の炎症モデルでは、Th1 サイトカイン優位の反応が生じることが報告されており、特に IL-12 および IFN γ の関与が示唆されているが、根尖性歯周炎におけるこれらの機能は明らかになっていない。

本研究の最終目標は、マウスに誘発した実験的根尖性歯周炎に対し、分子生物学的および免疫組織化学的手法を用いて基礎的に解析を加えることにより、根尖性歯周炎の発症および拡大の機構を解明し、治療への展望を開くことである。

2. 研究の目的

今回の研究では、マウス実験的根尖性歯周炎における骨吸収および炎症の拡大に対する IL-10 の機能的役割を解明することを目的とし、IL-10 KO マウスにおける Th1 サイトカインの機能を、IL-10 と Th1 サイトカインとのダブルノックアウトマウスを用いて検討した。IL-10 KO マウスは、根尖性歯周炎の病態を解析するうえで、非常に有用なモデルであると考えられる。とくに今回用いる IL-10 と他のサイトカインとのダブルノックアウトマウスを用いた根尖性歯周炎に関する研究はこれまでに例がない。この研究を行うことによって、根尖性歯周炎における IL-10 の機能の詳細が解明され、根尖性歯周炎の成立および拡大における免疫制御の動態がより明らかになり、本疾患の生物学的状態に対する理解がより深まることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 6 ~ 8 週齢の IL-10 $^{-/-}$, IL-12 $^{-/-}$, T cell $^{-/-}$ (TCR β /TCR δ), IL-12/IL-10 $^{-/-}$, T cell/IL-10 $^{-/-}$, C57BL/6 (wild-type)マウスを用いた。下顎第一臼歯をラウンドバーにて露髄後、抜髄し、4種の細菌(*Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*)の混合液を根管内に播種した。非処置群をコントロールとした。21日後に屠殺して下顎骨を摘出し、左側はマイクロ CT 撮影により根尖周囲の骨吸収の範囲を測定した。右側は、根尖周囲の病変部を周囲の骨とともに一塊として摘出し、タンパク抽出後、起炎症性サイトカイン(IL-1 α , TNF α , IL-6)および Th1 サイトカイン(IFN γ , IL-12)の発現量を ELISA にて測定した。

(2) 6 ~ 8 週齢の IL-10 $^{-/-}$, C57BL/6 (wild-type)マウスを用いた。マウス腹腔内から採取した常在性腹腔マクロファージを、 10^5 cells/well になるようにプレートに播種し、上述の4種の生菌(5.0×10^6)および *E.coli* LPS にて 24 時間刺激した。培養上清中の IL-12 の発現量を ELISA にて測定した。

4. 研究成果

(1) マイクロ CT による根尖周囲の骨吸収範囲の測定により、IL-10 $^{-/-}$ マウスの感染群では、T cell/IL-10 $^{-/-}$ および IL-12/IL-10 $^{-/-}$ マウスと比較して、有意に大きな骨吸収を示した。Wild Type、IL-12 $^{-/-}$ 、T cell $^{-/-}$ マウスにおける骨吸収は、ダブルノックアウトマウスと同程度であった(図1、図2)。

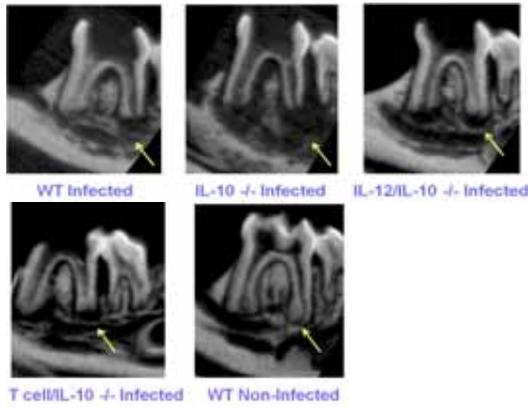


図1 下顎第一臼歯のマイクロCT画像

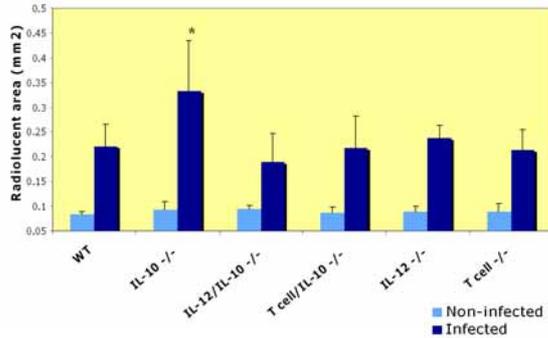


図2 根尖周囲の骨吸収

(2) ELISA による根尖周囲の病変内におけるサイトカインのタンパク発現の測定結果より、IL-10^{-/-} マウスの感染群では、T cell/IL-10^{-/-}、IL-12/IL-10^{-/-} および Wild Type マウスと比較して、起炎症性サイトカイン発現が有意に増加した(図3)。また、Th1 サイトカインである IFN γ の発現も、IL-10^{-/-} マウスで有意に増加した(図4)。

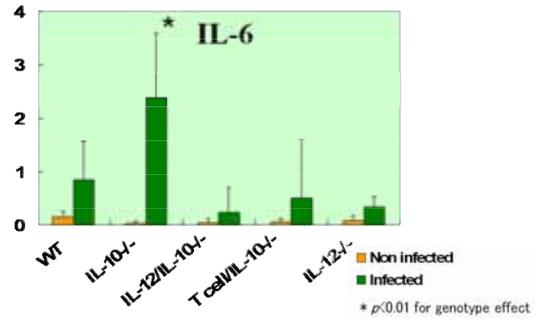
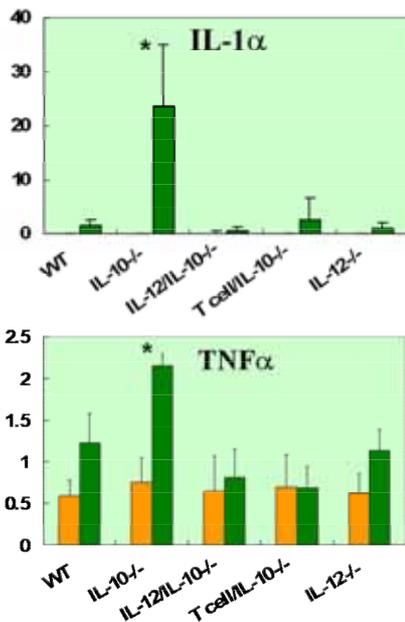


図3 根尖周囲の起炎症性サイトカイン発現

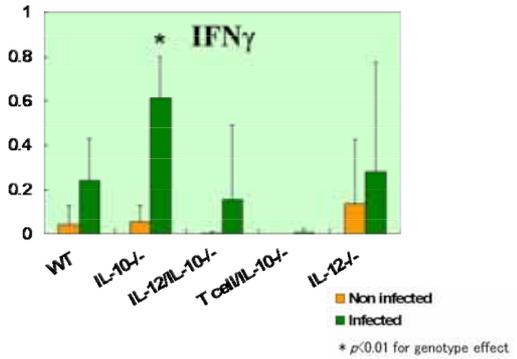


図4 根尖周囲の Th1 サイトカイン発現

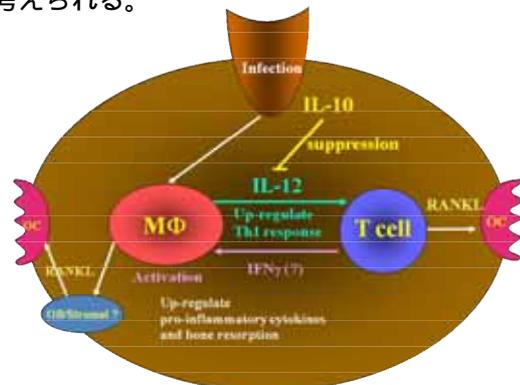
(3) 細菌によって刺激された IL-10^{-/-} マウスの腹腔マクロファージでは、Wild Type マウスと比較して、IL-12 発現が有意に増加した。

(4) 以上の結果より、以下のことが示唆された。

IL-10^{-/-} マウスにおいて、T細胞性免疫応答が炎症性骨吸収の亢進に参与している。IL-12 は T細胞性免疫応答による炎症性骨吸収の亢進に重要な役割を果たしている。

Wild Type マウスにおける IL-12 の産生および機能は、内因性 IL-10 によって制御されている。

Wild Type マウスにおける炎症性骨吸収は、自然免疫が大きくかかわっている可能性が考えられる。



(5) 今回の研究により、IL-10 ノックアウトマウスにおいて、IL-12 依存性の T 細胞性免疫が、根尖性歯周炎における炎症性骨吸収の亢進を誘発していることが示唆された。

Hajime Sasaki
The Forsyth Institute (Boston, USA)

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 5 件)

Sasaki H, Suzuki N, Alshwaimi E, Xu Y, Battaglini R, Morse L, Stashenko P: 18 β -Glycyrrhetic acid inhibits periodontitis via glucocorticoid -independent nuclear factor- κ B inactivation in interleukin-10-deficient mice; J Periodont Res, Vol.45, p757-763, 2010. 査読有

Rittling S, Zetterberg C, Yagiz K, Skinner S, Suzuki N, Fujimura A, Sasaki H: Protective role of osteopontin in endodontic infection; Immunology, Vol.129, p105-114, 2009. 査読有

Sasaki H, Suzuki N, Kent R, Kawashima N, Takeda J, Stashenko P: T cell response mediated by myeloid cell-derived IL-12 is responsible for *Porphyromonas gingivalis* -induced periodontitis in IL-10 deficient mice; J Immunol, Vol.180, p6193-6198, 2008. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

Suzuki N, Kawashima N, Xu J, Suda H: Effective suppression of periapical lesion expansion by Cathepsin K inhibitor; IADR 88th General Session, 2010/7/16, Barcelona, Spain.

鈴木規元、川島伸之、許 婧、須田英明 : ラット実験的根尖性歯周炎の進展におけるカテプシン K 阻害剤の抑制効果; 第 131 回日本歯科保存学会、2009/10/30、仙台。

鈴木規元、川島伸之、須田英明 : IL-10 ノックアウトマウスに誘発した根尖性歯周炎における IL-12 の役割 ; 第 128 回日本歯科保存学会、2008/6/6、新潟。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 規元 (SUZUKI NORIYUKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号 : 20372451

(2) 研究協力者

Philip Stashenko

The Forsyth Institute (Boston, USA)