

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592366

研究課題名（和文）

実験的歯周炎における IL27 受容体を介した骨破壊と炎症の制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanism of bone destruction and inflammation in experimental periodontitis mediated by IL-27 receptor

研究代表者

久木田 明子 (KUKITA AKIKO)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：30153266

研究成果の概要（和文）：

感染における免疫制御や炎症に関わるサイトカイン IL-27 の受容体である WSX-1 遺伝子欠損マウスを用いて、*Porphyromonas gingivalis* 感染により実験的に歯周炎を起こし、IL-27 とその受容体の歯周炎による骨破壊における役割について解析した。その結果、野生型マウスと比較して WSX-1 遺伝子欠損マウスでは、歯周炎による骨破壊が亢進しており、Th1 や Th17 細胞の形成が上昇していることが考えられた。一方、*P. gingivalis* の感染はマクロファージからの破骨細胞分化を促進し、WSX-1 遺伝子欠損マウスのマクロファージでは感染による破骨細胞形成が亢進していた。WSX-1 を介したシグナルは、破骨細胞分化に Th 細胞を介して或いは直接的に影響し歯周炎の骨破壊に関わることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

WSX-1 gene is a subunit of receptor for IL-27 which is involved in the regulation of immunity and inflammation. We analyzed the role of IL-27 in bone destruction of periodontitis using WSX-1 knocked-out mice. Mice were infected with *Porphyromonas gingivalis* which is one of major pathogens in periodontitis. Alveolar bone loss following *P. gingivalis* was enhanced in WSX-1 KO mice compared to those in wild-type mice. CD4-positive T cells in spleen of periodontitis mice produced higher amount of IL-17, and the production of IFN- γ and IL-17 was further promoted in WSX-1 KO mice. *P. gingivalis* infection promoted differentiation from macrophages into osteoclasts, and osteoclast formation induced by infection was enhanced in macrophage of WSX-1 KO mice. The data suggest that signals through IL-27 receptor are involved in bone loss of periodontitis by affecting osteoclastogenesis directly and indirectly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000 円	480,000 円	2,080,000 円
2010 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2011 年度	700,000 円	210,000 円	910,000 円
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000 円	4,420,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞、歯周病、細菌感染、骨破壊、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

歯周炎では歯周ポケットに入り込んだ嫌気性の細菌が増殖することによる炎症反応が原因となり歯槽骨の破壊を引き起こされる。この疾患では、骨を吸収する破骨細胞の活性を制御することが重要となるが、歯周病の進行には生体の遺伝的素因や免疫系が大きく関わっており、炎症にかかわる免疫系の細胞の作用を明らかにすることが重要となる。IL-27はp28とEBI3のサブユニットからなる2量体からなるIL-12ファミリーに属するサイトカインで、T細胞のサブセットであるTh1細胞やTh17細胞の分化を制御し、腎炎などの炎症及び感染時の炎症性のサイトカインの抑制に関わることが知られている。Th17細胞は関節炎における骨破壊に関与することが報告されているが、一方IL-17は歯周炎における感染初期の好中球の動員にも重要であることが報告されている。しかしながら、歯周炎の骨破壊におけるIL-27の作用については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究においては、IL-27の受容体であるWSX-1遺伝子欠損マウスと野生型マウスを使用して、マウスに実験的に歯周炎を引き起こし、その骨破壊のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細菌株と培養

Porphyromonas gingivalis は、ATCC 33277を使用し、ヘミン、ヒツジの血液、メナジオンを添加した培地を使用して嫌気培養を行った。

(2) 歯周炎の誘導及び骨破壊の評価 Bakerら(1994)の方法に従い、野生型及びWSX-1KO Balb/c 6週令マウス(♀♂, n=10)に、Sulfamethoxazole 2mg/ml及びtrimethoprim 0.4mg/mlを添加した飲料水を5日間与えた後、*Porphyromonas gingivalis*を口腔内に3回2日おきに投

与し感染させた。感染42日間後に上顎骨を摘出し、X線マイクロCTスキャナーを用いて骨破壊を評価した。

(3) Real-time PCR 脾臓細胞、歯肉組織及びマクロファージからIsogen(Nippon Gene)を用いてRNAを単離し、PrimeScript RT-PCRキット(Takara Bio)を用いてcDNAを合成後、Taqman gene expression assay kitを用いてStepOnePlus real-time PCRsystemによりmRNAの発現のレベルの解析した。内在性コントロールとしては、GAPDHを用いて行った。

(4) CD4陽性T細胞の単離と*P. gingivalis*による刺激 脾臓細胞にFITC標識抗CD4抗体を結合させ、MACSを用いてCD4陽性T細胞を単離した。*P. gingivalis*で再刺激を行い、24或いは48時間後にRNA及びサイトカインの産生を測定した。

(5) ELISA 脾臓細胞の培養上清を集めeBioscienceのELISAキットを用いてサイトカインの産生量を定量した。

(6) 破骨細胞分化系 マウスマクロファージ細胞株RAW-DにRANKLを添加し3日間培養し破骨細胞を形成した。また、マウスから骨髄を採取し、骨髄細胞にM-CSFを添加し3日間培養し形成した骨髄マクロファージに、RANKLを添加してさらに2日間培養し破骨細胞を形成した。また、RAW-DにRANKLを添加して22時間培養後に*P. gingivalis*を細胞に感染させ骨細胞の分化を誘導した。破骨細胞の分化の評価は、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)染色及び破骨細胞特異的な遺伝子、カテプシンK、カルシトニン受容体のmRNA発現を測定した。

4. 研究成果

(1) 実験的歯周炎の誘導と骨破壊の解析

まず、野生型マウスに*P. gingivalis*を感染させ実験的歯周炎を引き起こした。X線マイクロCTスキャナーを用いて骨破壊の評価を行った。その結果、*P. gingivalis*

を感染したマウスの上顎骨では顕著な骨破壊が見られた。次に、野生型とWSX-1遺伝子欠損マウスを用いて同様に歯周炎を引き起こし歯槽骨の骨破壊について検討した。その結果、WSX-1 遺伝子欠損マウスにおいては、野生型に比べて上顎骨で骨破壊の増大が見られた。これらのことから、実験的歯周炎の骨破壊の制御にはIL-27が関わる可能性が示された

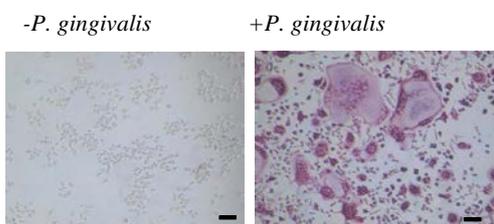
- (2) 歯周組織におけるサイトカインの発現解析 *P. gingivalis*感染したマウスの歯周組織におけるIL-27のサブユニットp28, EBI3及びTNF α のmRNAの発現をreal-time PCR法により解析した。その結果、p28 及びTNF α の発現レベルはいずれも感染していないマウスの歯周組織と比較しやや亢進していたが、EBI3の発現は感染によっては変化が見られなかった。WSX-1遺伝子欠損マウスの歯周組織においては、p28とEBI3の発現が野生型と比べ減少していた。
- (3) 歯周炎マウスの脾臓細胞におけるサイトカイン産生の解析 歯周炎をおこしたマウスから脾臓細胞を単離し、*P. gingivalis*により再刺激を行い、IL-17a及びIFN γ のmRNAの発現レベルをreal-time RT-PCR法により測定した。その結果、*P. gingivalis*を感染したマウスでは、IFN γ の発現は変化しなかったが、IL-17の発現の上昇が見られた。次に、歯周炎をおこした野生型マウスとWSX-1KOマウスの脾臓細胞を*P. gingivalis*で再刺激したときのIL-17a, IFN γ のmRNAの発現を比較したところ、WSX-1KOマウスでは、歯周炎によりIFN γ のmRNAの発現レベルが亢進し、野生型と比較しIL-17a, mRNAの発現レベルが上昇していた。さらに、脾臓細胞より単離したCD4陽性T細胞からのIFN γ 及びIL-17aの産生量をELISAで定量した。その結果、WSX-1KO マウスでは野生型マウスと比較してIFN γ 及びIL-17aの産生量が高かった。以上より、歯周炎においては、Th17細胞の産生が亢進してい

ること、WSX-1KOマウスでは、さらにTh1細胞及びTh17細胞の産生が亢進していることが考えられた。

- (4) *P. gingivalis*感染したマクロファージにおけるサイトカインの発現の解析 IL-27は樹状細胞やマクロファージにおいて感染により産生されることが知られている。骨髄マクロファージに*P. gingivalis* 感染させ、p28, EBI3, TNF α 及びIL-6のmRNAの発現を解析した。その結果、*P. gingivalis*感染により、p28, TNF α 及びIL-6のmRNAの発現が上昇した。一方、EBI3の発現は感染による顕著な変化は見られなかった。
- (5) *P. gingivalis* 感染したマクロファージからの破骨細胞分化誘導の解析 IL-27は、T細胞の分化のみでなく、樹状細胞たマクロファージの機能も制御することが明らかとなっている。*P. gingivalis* 感染時のマクロファージから破骨細胞の分化にIL-27及びその受容体が関与するか検討した。まず、*P. gingivalis* 感染によるマクロファージからの破骨細胞分化への影響について、破骨細胞に分化するマクロファージ細胞株RAW-D及び骨髄マクロファージを用いて解析した。マクロファージに*P. gingivalis*を感染させても破骨細胞分化は誘導できなかったが、RANKLを添加した後22時間後すなわちマクロファージから分化した破骨細胞前駆細胞に*P. gingivalis*を感染させると破骨細胞の分化が顕著に促進することがわかった(図1)。破骨細胞前駆細胞の*P. gingivalis*感染ではTNF α の産生は低く、TNF α 中和抗体の存在下においても破骨細胞が形成した。さらに、そのメカニズムを解析した結果、破骨細胞分化シグナルであるNFATc1のシグナル阻害剤FK502の添加によって顕著に阻害されたが、NF- κ Bシグナル阻害剤は*P. gingivalis*感染によって誘導される破骨細胞の分化を阻害しなかった。このように、*P. gingivalis*の破骨細胞前駆細胞への感染はTNF α の作用

を介さずに破骨細胞の分化を促進することが考えられた。さらに、破骨細胞前駆細胞においてはp28, EB13の発現がマクロファージと比べ低下しており、RANKLによってマクロファージのIL-27の発現が影響を受けることがわかった。

図 1



- (6) IL-27及びWSX-1の破骨細胞分化における作用の解析 マクロファージからの破骨細胞分化に対するIL-27の作用について検討した。IL-27はヒト破骨細胞の分化を阻害することが知られているが、RANKLによるマウス破骨細胞分化に対しては殆ど影響しなかった。次に感染による破骨細胞の形成に対するWSX-1の役割を検討した。野生型及びWSX-1遺伝子欠損マウスの骨髄を単離し骨髄マクロファージを形成し、RANKLを添加し24時間培養後、*P. gingivalis*で刺激して破骨細胞分化を誘導した。その結果、WSX-1遺伝子欠損マウスのほうが野生型マウスと比較して多くの破骨細胞の形成が見られ、WSX-1を介したシグナルが*P. gingivalis*感染によって誘導される破骨細胞の形成の抑制に関与する可能性が考えられた。

以上の結果から、WSX-1遺伝子欠損マウスの歯周炎では、歯周炎の骨破壊の亢進及びTh1細胞やTh17細胞の分化の亢進が見られ、IL-27を介した作用が骨破壊に関わることが考えられた。一方、*P. gingivalis*感染によるマクロファージからの破骨細胞の分化はWSX-1遺伝子欠損マウスのマクロファージで亢進しており、WSX-1を介したシグナルがその過程に関わる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

久木田 明子

1. A. Kukita, T. Ichigi, I. Takigawa, T. Watanabe, T. Kukita, H. Miyamoto. Infection of RANKL-primed RAW-D macrophages with *Porphyromonas gingivalis* promotes osteoclastogenesis in a TNF- α -independent manner. **Plos One** in press 査読有
2. 久木田明子, 菖蒲池健夫, 久木田敏夫 破骨細胞の分化と機能を制御する転写因子の役割 化学と生物、解説 印刷中 2012 査読無
3. Teramachi J, Kukita A, Li YJ, Ushijima Y, Ohkuma H, Wada N, Watanabe T, Nakamura S, Kukita T. Adenosine abolishes MTX-induced suppression of osteoclastogenesis and inflammatory bone destruction in adjuvant-induced arthritis. **Lab Invest.** 2011 91(5):719-31. 査読有
4. A. Kukita, T. Kukita, K. Nagata, J. Teramachi, Y-J. Li, H. Yoshida, H. Miyamoto, S. Gay, F. Pessler, T. Shobuike. The transcription factor FBI-1/OCZF/LRF is expressed in osteoclasts and regulates RANKL-induced osteoclast formation in vitro and in vivo. **Arthritis Rheum** 63(9):2744-54 2011. 査読有
5. Liu J., Shiono J., Shimizu K., Kukita A., Kukita T., Kondo R. Ganoderic acid DM: anti-androgenic osteoclastogenesis inhibitor **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2009 19:2154-2157. 査読有
6. Miyamoto I, Liu J, Shimizu K, Sato M, Kukita A, Kukita T, Kondo R. Regulation of osteoclastogenesis by ganoderic acid DM isolated from *Ganoderma lucidum*. **Eur J Pharmacol.** 2009 5;602(1):1-7. 査読有
7. Li YJ, Kukita A, Teramachi J, Nagata K, Wu Z, Akamine A, Kukita T. A possible suppressive role of galectin-3 in upregulated osteoclastogenesis accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. **Lab Invest.** 2009 Jan;89(1):26-37. 査読有

久木田敏夫

8. Wu Z, Ma HM, Kukita T., Nakanishi Y., Nakanishi H. Phosphatidylserine-containing liposomes inhibit the differentiation of osteoclasts and trabecular bone loss. 2010 **J. Immunol.** 184(6): 3191-201. 査読有
9. Ogino Y, Ayukawa Y., Kukita T., Atsuta I., Koyano K. **J. Periodontal Res.** 2009 44(2):217-24. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

国内学会

1. 久木田明子 et al. RANKL で刺激したマクロファージから *P. gingivalis* 感染によって誘導される破骨細胞分化における TNF α の役割 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27 日 長崎
2. 高橋良 et al. 膜ナノチューブによる前破骨細胞融合制御 第 53 回歯科基礎医学会 2011 年 10 月 2 日 岐阜
3. 宮崎利文 et al. 磁場を用いた骨吸収制御法の開発 第 53 回歯科基礎医学会 2011 年 10 月 2 日 岐阜
4. 高野登志雄 et al. 間葉系間細胞による炎症性骨破壊制御 第 53 回歯科基礎医学会 2011 年 10 月 2 日 岐阜
5. 市木佑佳 et al. *Porphyromonas gingivalis* による破骨細胞分化促進作用 第 53 回歯科基礎医学会 2011 年 9 月 30 日 岐阜
6. 高橋良 et al. 破骨前駆細胞間の融合に於ける「膜ナノチューブ」の関与と制御: 破骨細胞分化制御の新局面 第 29 回日本骨代謝学会 2011 年 7 月 28 日 大阪
7. 松原麗 et al. TNF α と TGF β は低濃度の M-CSF の存在下で Kat1+c-fms+, Kat1+CD11b+ の単核破骨細胞前駆細胞を誘導する 第 29 回 日本骨代謝学会 2011 年 7 月 28 日 大阪
8. 李銀姫 et al. Nordihydroguaiaretic Acid は破骨細胞分化とラットアジュバント関節炎における骨破壊を抑制する 第 29 回 日本骨代謝学会 2011 年 7 月 28 日 大阪
9. 高野登志雄 et al. 間葉系幹細胞による骨破壊制御: アジュバント関節炎ラットを

用いた解析 第 29 回 日本骨代謝学会 2011 年 7 月 28 日 大阪

10. 渡邊敏之 et al. 低出力パルス超音波は破骨細胞系細胞の増殖を促進する 第 29 回 日本骨代謝学会 2011 年 7 月 28 日 大阪
11. 松原麗 et al. 破骨細胞特異的モノクローナル抗体 Kat1 を用いた破骨細胞前駆細胞の性状解析 第 52 回歯科基礎医学会 2010 年 9 月 20 日 東京
12. 李銀姫 et al. アンチセンス WT1RNA による破骨細胞分化状態維持機能の可能性について 第 52 回歯科基礎医学会 2010 年 9 月 20 日 東京
13. 久木田明子 et al. IL-27 受容体 WSX-1 ノックアウトマウスの歯周炎モデルにおける骨破壊の解析 第 52 回歯科基礎医学会 2010 年 9 月 20 日 東京
14. 寺町順平 et al. メソトレキセートによる炎症性骨破壊抑制野アデノシンによる解除 第 28 回 日本骨代謝学会 2010 年 7 月 22 日 東京
15. 松原麗 et al. 破骨細胞特異的表面抗原を認識する抗体 Kat1 を用いた単核破骨細胞前駆細胞の性状解析 第 28 回 日本骨代謝学会 2010 年 7 月 22 日 東京
16. 李銀姫 et al. 破骨細胞分化制御における Wilms' 腫瘍遺伝子産物 WT1 とそのアンチセンス RNA の関与 第 28 回 日本骨代謝学会 2010 年 7 月 22 日 東京
17. 李銀姫 et al. Nordihydroguaiaretic acid による破骨細胞分化と機能の制御 第 51 回歯科基礎医学会 2009 年 9 月 10 日 新潟
18. 李銀姫 et al. Nordihydroguaiaretic acid は破骨細胞の形成と骨吸収を抑制する 第 27 回 日本骨代謝学会 2009 年 7 月 25 日 大阪

国際学会

19. Akira Takahashi et al. Involvement and regulatory role of membrane nanotubes in fusion of osteoclast precursors: a possible migration and penetration of DC-STAMP protein into osteoclast precursors through inter-cellular bridges 33th **The American Society for Bone and Mineral Research 2011 Annual Meeting** Sep.16-20 2011 San

- Diego, California, USA
20. Toshio Takano et al. Mesenchymal stem cells markedly suppressed inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis. **The American Society for Bone and Mineral Research 2011 Annual Meeting** Sep. 18 2011 San Diego, California, USA
21. Yuka Ichigi et al. *P. gingivalis* infection promotes osteoclastogenesis from RANKL-stimulated macrophages 13th International **Union of Microbiological Sciences 2011 Congress** Sep. 6-10 2011 Sapporo, Japan

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.microbio.med.saga-u.ac.jp/biodefense/res4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久木田 明子 (KUKITA AKIKO)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：3 0 1 5 3 2 6 6

(2) 研究分担者

久木田 敏夫 (KUKITA TOSHIO)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号：7 0 1 5 0 4 6 4

(3) 連携研究者

吉田 裕樹 (YOSHIDA HIROKI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：4 0 2 6 0 7 1 5

中山 浩次 (NAKAYAMA KOJI)

長崎大学・医歯薬総合研究科・教授

研究者番号：8 0 1 5 0 4 7 3