

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792123

研究課題名（和文）歯周炎におけるTh17細胞の浸潤・活性化機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of Th17 cells migration and activation in periodontally diseased tissues.

研究代表者

細川 義隆（HOSOKAWA YOSHITAKA）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90346011

研究成果の概要（和文）：

本研究では歯周組織構成細胞の一つであるヒト歯肉線維芽細胞（HGF）を用い、IL-17AにTh17細胞浸潤に関与しているCCL20産生誘導能があるかどうかを明らかにするため研究を行った。また、緑茶カテキンがCCL20産生を抑制する可能性について検討した。その結果、IL-17AはHGFのCCL20産生を誘導し、その産生にはp38 MAPKならびにERKを介したシグナル伝達経路に関与している事が明らかとなった。また、緑茶カテキンはIL-17Aが誘導したHGFのCCL20産生を抑制した。これらのことより、IL-17AはCCL20産生を誘導することによりTh17細胞浸潤を促進していること、ならびに緑茶カテキンはCCL20産生を阻害することによりTh17細胞浸潤を抑制し、歯周組織破壊を軽減できる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We examined the effect of IL-17A on CCL20 production from human gingival fibroblasts (HGF) in this study. Moreover, we investigated the affect of green tea catechins on CCL20 production in HGF. We found that IL-17A could induce CCL20 production in HGF, and green tea catchins inhibited CCL20 production in IL-17A-stimulated HGF. Therefore, IL-17A is involved in Th17 cells migration in periodontal diseased tissues to induce CCL20 production in HGF. Green tea catechins might decrease alveolar bone loss in periodontally diseased tissues to inhibit CCL20 production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：歯周炎、Th17、ケモカイン、線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病はデンタルプラークを構成する歯周病関連細菌により惹起される慢性炎症性疾患であり、その発症・進行には宿主の免疫

応答が関与していることが明らかとなっている。歯周病病変局所にはリンパ球をはじめとした様々な免疫担当細胞が認められ、歯周組織破壊に関与していると考えられている。

近年、Th17 細胞と呼ばれる新たな helper T 細胞サブセットが存在することが明らかとなった。Th17 細胞は特徴として IL-17A を産生し、ROR $\cdot$ T と呼ばれる転写因子を発現していることが報告されている (Ivanov et al., Cell 126(6) 1121-1133, 2006)。また、慢性関節リウマチマウスモデルにおいて、Th17 細胞は他の helper T 細胞と比較し破骨細胞を増殖させることが出来るとともに、IL-17 を産生することにより、滑膜細胞の RANKL 産生を誘導することで破骨細胞がしやすい環境を作り出していることが明らかとなった (Sato ら, J Exp Med., 203(12) 2673-2682, 2006)。歯周病は慢性関節リウマチと同様に骨吸収を主な症状とする疾患である。また、IL-17A が歯周病変局所に発現していることは明らかとなっており歯周炎の病態に関与している事は示唆されているが (Takahashi et al., J Clin Periodontol., 32(4), 369-374, 2005)、Th17 細胞の歯周病変局所での存在、浸潤機構、活性化機構は明らかとされていない。

近年、Th17 細胞特異的に CC chemokine receptor の一つである CCR6 が発現していることが明らかとなった (Hirota et al., J Exp Med., 204(12), 2803-2812, 2007)。我々は、歯周炎において CD4 陽性 CCR6 陽性細胞が浸潤していること、また、歯周組織構成細胞の一つである歯肉線維芽細胞が proinflammatory cytokine である IL-1 $\cdot$ , TNF- $\cdot$  刺激により CCR6 のリガンドのケモカインである CCL20 を産生しうること、歯周病変局所に CCL20 が存在していることを報告している (Hosokawa et al., Clin Exp Immunol., 128(3), 548-554, 2002, Hosokawa ら, Clin Exp Immunol., 142(2), 285-291, 2005)。しかしながら、IL-1 $\cdot$  および TNF- $\cdot$  以外のサイトカインで歯肉線維芽細胞 (HGFs) の CCL20 産生が誘導されるかについては不明であった。

カテキンは緑茶に含まれるポリフェノールであり、抗癌作用、抗酸化作用、抗炎症作用など様々な作用がある事が報告されている。しかしながら、カテキンがケモカイン産生に与える影響については報告は少なく、不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

本研究において、Th17 細胞が産生するサイトカインである IL-17A に着目し、IL-17A が HGFs の CCL20 産生に与える影響を解析する事を目的とし、研究を行った。また、IL-17A が誘導する CCL20 産生に関与するシグナル伝達

経路も明らかにする事も目的とし、さらに、カテキンが IL-17A が誘導する HGFs からの CCL20 産生に与える影響を解析する事も目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト歯肉組織試料の採取および HGFs の調整：矯正治療のための便宜抜歯を行う患者において、抜歯部位のポケット深さが 3mm 以下で BOP を認めないことを確認した後、抜歯時に得られた歯肉片を正常歯肉組織として採取した。採取した正常歯肉組織から outgrowth 法を用い、HGFs を得た。

(2) 歯肉線維芽細胞からの CCL20 産生の解析：(1) の条件で採取した HGFs を IL-17A で 24 時間刺激した。その後、培養上清を採取し、ELISA 法にて CCL20 濃度を解析した。一部の実験においては、カテキンの影響を確認するため、epigallocatechin gallate (EGCG) あるいは epicatechin gallate (ECG) において 1 時間前処理した後に IL-17A で刺激を行った。また、シグナル伝達機構を確認する実験においては、SB203580 (p38 MAPK inhibitor) あるいは PD98059 (MEK inhibitor) において 1 時間前処理した後、IL-17A で刺激を行い、培養上清中の CCL20 濃度を ELISA 法を用い解析した。

(3) カテキンが IL-17A 刺激により活性化されたシグナル伝達経路に与える影響の解析：(1) の条件で採取した HGFs を EGCG (50 $\cdot$ g/ml) あるいは ECG (50 $\cdot$ g/ml) で 1 時間前処理した後、IL-17A (100 ng/ml) で 15 分、30 分あるいは 60 分刺激した後、タンパクを回収した。その後、western blot 法を用い、p38 MAPK あるいは ERK のリン酸化を解析した。

(4) HGFs の IL-17 receptor 発現の解析：

(1) の条件で採取した HGFs を EGCG (50 $\cdot$ g/ml) あるいは ECG (50 $\cdot$ g/ml) で 24 時間処理した後、細胞を回収し、flow cytometry を用い、HGFs 表層の IL-17 receptor A (IL-17RA) あるいは IL-17 receptor C (IL-17RC) の発現を解析した。

## 4. 研究成果

(1) IL-17A が HGFs の CCL20 産生に与える影響：IL-17A は濃度依存的に HGFs からの CCL20 産生を誘導した。ゆえに Th17 細胞から産生される IL-17A が HGFs の CCL20 産生を誘導することによりパラクライン的に Th17 細胞浸潤をさらに誘導することが示唆された。

(2) catechinがIL-17A誘導CCL20産生に与える影響:EGCG (50・g/ml)あるいは ECG (50・g/ml)の前処理により IL-17A (100 ng/ml)が誘導したCCL20産生は有意に抑制された。この結果より緑茶カテキンはCCL20産生を抑制することにより Th17 細胞浸潤を減少させ、歯槽骨破壊を抑制できる可能性が考えられた。

(3) catechinがp38 MAPK, ERKの活性化に与える影響:p38 MAPK あるいは ERK のinhibitorによりIL-17Aが誘導したCCL20産生は抑制され、p38 MAPKならびにERKを介したシグナル伝達経路がCCL20産生に関与している事が明らかとなった。また、EGCGあるいは ECGの前処理によりIL-17A刺激で誘導されたp38 MAPK, ERKのリン酸化は抑制され、カテキンのCCL20産生抑制にはp38 MAPK, ERKを介したシグナル伝達経路を抑制していることが明らかとなった。

(4) catechinがIL-17 receptor発現に与える影響:EGCG (50・g/ml)あるいは ECG (50・g/ml)処理によりIL-17RAあるいはIL-17RC発現が抑制された。ゆえにcatechinのCCL20産生抑制にはIL-17 receptor発現を減少させることも関与している事が示唆された。

#### 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8件)

- ① Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, Oncostatin M synergistically induces CXCL10 and ICAM-1 expression in IL-1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts.、Journal of Cellular Biochemistry、111巻、40-48頁(2010年) 査読有
- ② Tadashi Nakanishi, Kayo Mukai, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Yoshitaka Hosokawa, Takashi Matsuo, Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors、European Journal of Oral Sciences、118巻、145-150頁(2010年) 査読有
- ③ Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hiromichi Yumoto, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo、Proinflammatory effects of muramyl dipeptide on human gingival fibroblasts.、Journal of Periodontal

Research、45巻、193-199頁(2010年) 査読有

- ④ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Tadashi Nakanishi, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo、Tea polyphenols inhibit IL-6 production in tumor necrosis factor superfamily 14-stimulated human gingival fibroblasts.、Molecular Nutrition and Food Research、54巻、151-158頁(2010年) 査読有
- ⑤ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo、TNFSF14 coordinately enhances CXCL10 and CXCL11 productions from IFN- $\gamma$ -stimulated human gingival fibroblasts.、Molecular Immunology、47巻、666-670頁(2010年) 査読有
- ⑥ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Tadashi Nakanishi, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo、Catechins inhibit CCL20 production in IL-17A-stimulated human gingival fibroblasts.、Cellular Physiology and Biochemistry、24巻、391-196頁(2009年) 査読有
- ⑦ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Tadashi Nakanishi, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo、Catechins inhibit CXCL10 production from oncostatin M-stimulated human gingival fibroblasts.、Journal of Nutritional Biochemistry、21巻、659-664頁(2009年) 査読有
- ⑧ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo、Human gingival fibroblasts express functional chemokine receptor CXCR6、Clinical and Experimental Immunology、156巻、413-418頁(2009年) 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中西正、中江英明、松尾敬志:CatechinがTNFSF14刺激ヒト歯肉線維芽細胞のIL-6産生に与える影響、第133回日本歯科保存学会秋季学術大会(2010.10.28、長良川国際会議場)
- ② 橋本玲奈、細川義隆、細川育子、尾崎和美、中江英明、松尾敬志:IL-1 $\beta$ が誘導

するヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に及ぼす緑茶カテキンの影響、第 53 回日本歯周病学会秋季学術大会 (2010.9.19, サンポートホール高松)

- ③ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：IL-17A は IL-1 が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生を増強する、第 53 回日本歯周病学会春季学術大会 (2010.5.14, 盛岡市民文化ホール)
- ④ 細川育子、細川義隆、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：Adrenomedullin が樹状細胞の Th17 関連サイトカイン産生に及ぼす影響、第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2009.10.29, 仙台国際センター)
- ⑤ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中西正、中江英明、松尾敬志：Catechin が IL-17A 刺激ヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生に与える影響、第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2009.10.29, 仙台国際センター)
- ⑥ 細川育子、細川義隆、尾崎和美、湯本浩通、中江英明、松尾敬志：NOD1 アゴニストがヒト歯肉線維芽細胞のサイトカイン及び接着分子発現を誘導する、第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2009.6.11, 札幌コンベンションセンター)
- ⑦ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：Oncostatin M と IL-1beta は相乗的にヒト歯肉線維芽細胞のケモカイン産生ならびに接着分子発現を誘導する、第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2009.6.11, 札幌コンベンションセンター)
- ⑧ 細川育子、細川義隆、尾崎和美、中江英明、松尾敬志：ヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に及ぼす Adrenomedullin の cell signaling に対する影響、第 52 回日本歯周病学会春季学術大会 (2009.5.15, 岡山コンベンションセンター)
- ⑨ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中西正、中江英明、松尾敬志：Oncostatin M が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に及ぼすカテキンの影響、第 52 回日本歯周病学会春季学術大会 (2009.5.15, 岡山コンベンションセンター)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細川 義隆 (HOSOKAWA YOSHITAKA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教

研究者番号：90346601

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし