

機関番号：33902

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21792134

研究課題名 (和文) 新規サイトカイン インターロイキン 35 の歯周組織における役割の検討

研究課題名 (英文) The role of interleukin 35, the novel cytokine, in the human periodontal tissue.

研究代表者

三谷 章雄 (MITANI AKIO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：50329611

研究成果の概要 (和文) : 歯周炎歯肉組織における、IL-35 のサブユニットの免疫組織学的検索・遺伝子発現解析、および歯肉溝浸出液における IL-35 の検出により、IL-35 は歯周病患者において有意に多く存在することが明らかになった。また、IL-35 は破骨細胞形成を抑制する可能性が示唆された。本研究により、IL-35 が歯周病において防御的に機能している可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文) : The subunits of IL-35 were detected higher in gingival tissue of patients with periodontitis compare with healthy volunteer. IL-35 protein was also higher in GCF of patients with periodontitis compare with healthy volunteer. Moreover, IL-35 may inhibit the osteoclastogenesis. These results suggest that IL-35 could have the protective role in progression of periodontitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：IL-35、歯周組織、制御性 T 細胞、歯学、免疫学

1. 研究開始当初の背景

歯周病は国民のおよそ8割が罹患している生活習慣病であり、その罹患率は他の多くの疾患の中でも著しく高く、病態の解明につながる研究が期待される。近年、歯周病の存在が心臓血管疾患、低体重児出産、糖尿病などを誘発することが明らかにされ、歯周病治療の重要性が再認識されている。

歯周病は歯周組織における、デンタルプラークなど細菌感染による慢性炎症性破壊で

あり、その発症や進行には宿主の生体防御機能が大きく関わる。また、その病態において T 細胞を中心とした免疫応答が深く関与していることが示唆されており、今までに多くの報告がある。T 細胞のサブセットとしては細胞性免疫に関与する Th1 細胞と液性免疫に関与する Th2 細胞、また制御性 T 細胞 (Treg 細胞) などが知られていたが、近年、T 細胞の新しいサブセットとしてインターロイキン 17 (IL-17) を産生する Th17 細胞が提唱され、炎

症や感染防御における役割が注目されている。さらに、歯周病におけるTreg細胞 (*Oral Microbiol Immunol.* 2008 23: 49-54, *Clin Exp Immun.* 2007 148: 271-280, *J Dent Res.* 2005 84: 639-643) やTh17細胞 (*Infect Immun.* 2008 76: 4206-4213, *Clin Chim Acta.* 2008 395: 137-141, *J Periodontol.* 2007 78: 1083-1093, *J Clin Periodontol.* 2005 32: 369-374, *J Clin Periodontol.* 2005 32: 383-389) の関与も示唆されており、歯周病病態におけるこれらT細胞や関連するサイトカインの役割について更なる研究が必要である。

近年、Treg細胞より産生される、抑制性のサイトカインであるIL-35が新規に同定された。IL-35はEpstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3)とIL-12のサブユニットであるp35のヘテロダイマーである(*Nature.* 2007 450: 566-569)。Niedbala Wらは、IL-35がコラーゲン誘導性リウマチを抑制すること、またTh17細胞分化を抑制することを明らかにした(*Eur J Immunol.* 2007 37: 3021-3029)。また、Collison LWらはEbi3^{-/-}マウスやp35^{-/-}マウスのTreg細胞は調節性が落ちており、炎症性大腸炎の改善度が悪かったと報告している(*Nature.* 2007 450: 566-569)。その他、Yang JらはEbi3^{-/-}マウスではROR γ tの発現が増強しており、Ebi3^{-/-}マウスのTh17はIL-17、IL-22の発現が増強していると報告している(*Eur J Immunol.* 2008 38: 1204-1214)。

これまでに、歯周病とTh17細胞もしくはTreg細胞に関連したいくつかの報告があるが、歯周病の病態における新規サイトカインIL-35の役割は全く不明である。

2. 研究の目的

歯周炎は歯周病原性細菌に感染し、歯周組織に慢性炎症が持続することにより歯槽骨を中心とした歯周組織の破壊を引き起こす病態を特徴とする。歯周組織の局所において、T細胞を中心とした免疫応答が惹起されていることは明らかであり、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、Treg細胞の関与を示唆する様々な報告がなされてきた。しかしながら、歯周組織破壊の収束あるいは歯周病の治癒機転のメカニズムを明確に説明できていない。新規に同定されたサイトカインであるIL-35の

歯周組織での免疫調節機構を解明することは、歯周病の病態を解明する一助となる。

また、他の医学分野ではサイトカイン療法をはじめとした免疫療法が行われているが、歯周治療の分野では一般的ではない。

今回、歯周治療における免疫療法を模索する初歩的研究として、IL-35による生体防御機構の調節の可能性について検討し、将来の歯周治療およびリウマチ性疾患のような慢性の炎症性疾患の治療にフィードバックすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織学的検索

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組織サンプルを採取した。採取したサンプルは直ちに、凍結包埋し、凍結切片を作成後、抗p35および抗EBI3モノクローナル抗体を用い免疫組織染色を行った。

(2) IL-35およびIL-17関連mRNA発現の検討

インフォームドコンセントを得た歯周病患者および健常者の歯肉組織を採取し、TRIZOLを用いてtotal RNAを抽出した。その後、p35、EBI3、IL-17AおよびIL-17FのmRNAの発現をリアルタイムPCR法にて解析した。

(3) 歯肉溝滲出液(GCF)中のIL-35濃度の差の検討

インフォームドコンセントを得た歯周病患者および健常者から、GCFをペーパーストリップスにて採取した。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、エアースリッジにてエアで歯肉溝内を一旦乾燥させた後、ペリオペーパーを歯肉溝の歯肉縁下に挿入し30秒間静置し吸湿採取した。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を1被験歯のGCFサンプルとした。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した。回収

したペリオペーパーに、0.5%牛血清アルブミン入りのPBS100 μ l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、10分間3,500rpmにて遠心処理をした後その上清を回収した。GCFサンプルのIL-35量はhuman IL-35 ELISA kitを用いて測定した。

(4) 破骨細胞培養系における、rIL-35の影響の検討

マウス頭蓋骨由来骨芽細胞と骨髄細胞を共培養し、PGE₂で刺激した。その際、IL-35を加えた場合と加えない場合の破骨細胞形成能をTRAP染色により検討した。

4. 研究成果

(1) 歯肉組織におけるIL-35およびIL-17の検出

歯周病において、IL-35が関与するか否かを確認するため、はじめに、歯肉組織におけるIL-35の存在を確認する検討を行った(図1)。EBI3陽性細胞は上皮組織および結合組織に認められ、興味深いことに、上皮層により多く認めた(図1. B)。p35陽性細胞は、

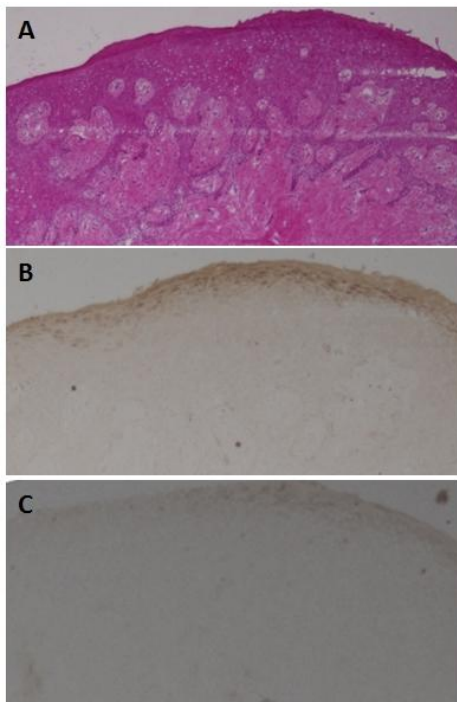


図1. 炎症性歯肉組織におけるIL-35
A, HE染色. B, EBI3(免疫染色). C, p35(免疫染色). 3名の患者歯肉組織での典型例.

EBI3同様に上皮組織および結合組織に認められるように思われたが、検出が弱く、今回用いた製品以外の抗体による再検討が必要である(図1. C)。歯肉組織に、IL-35のサブセットであるEBI3とp35のうち、少なくともEBI3は認められることが明らかとなった。しかしながら、EBI3は、p28とヘテロダイマーを形成しIL-27として機能する可能性もあり、さらなる検討が必要である。

次に、歯周病におけるIL-35の役割を模索するため、歯周病患者および健常者の歯肉組織での、p35、EBI3、IL-17AおよびIL-17FのmRNAの発現をリアルタイムPCR法にて解析した(図2、図3)。歯周炎患者の炎症歯肉組織では、健常者に比べEBI3mRNAの発現が有意に高かった($p < 0.05$) (図2. A)。p35mRNAに関しては健常者よりも発現が高い傾向にあるが、有意な差を認めなかった(図2. B)。TregによるTh17活性の抑制においてIL-35が重要な役割を担っていると考えられているが、歯周組織において、Th17に対する

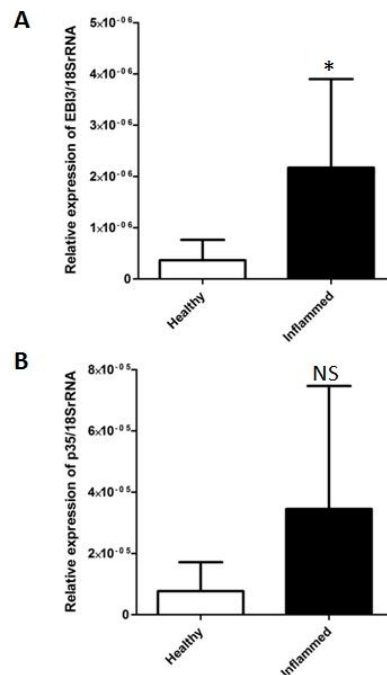


図2. 歯肉組織におけるIL-35関連遺伝子の発現
A, 健常者および歯周炎患者のEBI3mRNAの発現の違い. B, 健常者および歯周炎患者のp35mRNAの発現の違い. *, $p < 0.05$

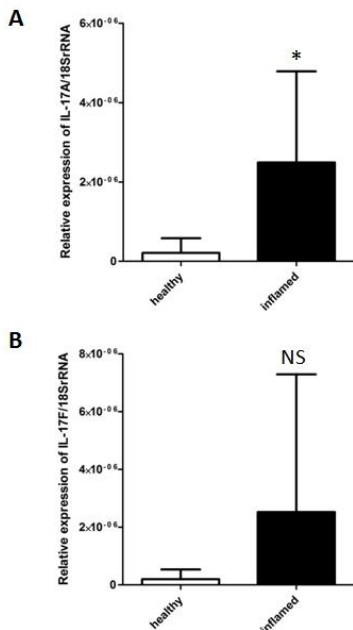


図3. 歯肉組織におけるIL-17関連遺伝子の発現。A, 健常者および歯周炎患者のIL-17AmRNAの発現の違い。B, 健常者および歯周炎患者のIL-17FmRNAの発現の違い。*, $p < 0.05$

IL-35の役割については、全く不明である。図1と図2の結果より、歯周炎患者において、少なくともIL-35のサブユニットであるEBI3はmRNAレベルおよびタンパクレベルで、健常者に比べ亢進している可能性が高いと考えられる。そこで、IL-35関連遺伝子の発現を検討したのと同じサンプルにおける、IL-17関連遺伝子の発現について調べた(図3)。歯周炎患者のIL-17AmRNA発現は、健常者に比べ有意に高かった(図3.A)が、IL-17FmRNA発現は健常者よりも高い傾向を示すものの、有意な差は認めなかった(図3.B)。歯周炎患者において、IL-17は歯周炎の進行に関係していると考えられており、図3の結果はそれと一致している。しかしながら、図2のIL-35関連遺伝子の発現上昇の結果と併せて考えた場合、IL-35によるTh17の活性抑制はみられない、あるいは非常にわずかである可能性がある。

(2) 歯肉溝滲出液(GCF)中のIL-35濃度の差の検討

図1、図2で示したように、歯肉組織におけるIL-35の存在が示唆されたものの、各サブユニットの検出でしか

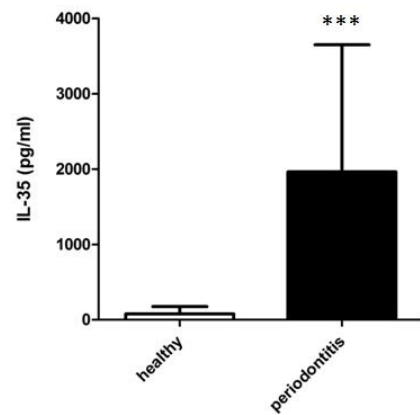
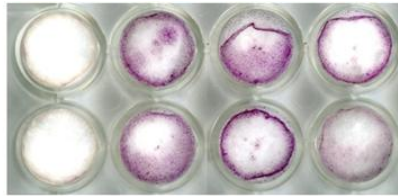


図4. 歯肉溝浸出液におけるIL-35量。健常者および歯周炎患者のGCF中のIL-35量の違い。***, $p < 0.001$

い。IL-35の存在を確認するためにはEBI3とp35がヘテロダイマーを形成している状態、すなわち成熟したIL-35を検出する必要がある。そこで、ELISA kitにて、歯周炎患者および健常者のGCF中IL-35量を解析した。図4に示すように、歯周炎患者のGCF中IL-35量は、健常者に比べ有意に($p < 0.001$)多いことが明らかとなった。このことから、IL-35による歯周炎の抑制はみられない可能性が示唆された。もしかしたら、歯周病においてIL-35は、炎症の抑制よりもむしろ感染の早期除去のため炎症を誘発する役割を持っているのかもしれない。とはいえ、これまで、歯周組織にかかわるIL-35の報告はなく、本研究の結果は非常に興味深いものである。

(3) 破骨細胞培養系における、rIL-35の影響の検討

次に、歯肉組織で検出されたIL-35が、防御的役割を果たすのか、あるいは歯周病を進行させる役割を担うのかを調べる基礎的研究として、以下のような検討を行った。マウス頭蓋骨由来骨芽細胞と骨髄細胞を共培養し、PGE₂刺激による破骨細胞誘導において、IL-35の役割を調べるために、rIL-35を加えて培養を行った。図5に示すように、PGE₂は、TRAP陽性細胞を誘導していることが分かる。この誘導は、20ng/mlのrIL-35添加では変化が



PGE ₂ (10 ⁻⁶ M)	-	+	+	+
rIL-35	-	-	20ng/ml	200ng/ml

図5. 破骨細胞形成におけるIL-35の効果
マウス頭蓋骨由来骨芽細胞と骨髄細胞をPGE₂およびrIL-35存在下で、6日間共培養し、TRAP染色を行った。

見られないものの、200ng/mlのrIL-35の添加により抑制され、TRAP陽性細胞数は減少していた(図5)。このことより、歯周炎患者の歯周組織において、IL-35は破骨細胞の誘導に関しては抑制する可能性がある。この点では、IL-35は歯周病の進行に対して抑制的なかもしれない。

(4) 結論

以上の結果より、歯周炎患者の歯周組織において、IL-35は炎症を誘導し、細菌感染から早期に回復するために防御的に作用していることが示唆された。しかしながら、今回の検討では、やや不十分な点があり、今後より詳細な検討を行い、歯周病におけるIL-35の役割を明らかにする必要がある。

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)

- ① Niedbala W, Alves-Filho JC, Fukada SY, Vieira SM, Mitani A, Sonogo F, Mirchandani A, Nascimento DC, Cunha FQ, Liew FY. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 査読有, 2011, *in press*.
- ② Matsumura Y, Mitani A, Suga T, Kamiya Y, Kikuchi T, Tanaka S, Aino M, Noguchi T. Azithromycin may inhibit interleukin-8 through the suppression of Rac1 and a nuclear factor kappaB pathway in KB cells stimulated with lipopolysaccharide, **Journal of Periodontology**, 査読有, 2011, *in press*. (<http://www.joponline.org/toc/jop/0/0>)

- ③ 柳千登勢, 福田光男, 三谷章雄, 久野真由実, 佐藤聡太, 高橋伸行, 村上多恵子, 中垣晴男, 野口俊英. 口臭患者に対するメトロナゾール(フラジール)溶液による含嗽の長期的効果, **日本口臭学会誌**, 査読有, 1巻1号, 2010, 16-22.
- ④ 村上多恵子, 福田光男, 三谷章雄, 柳千登勢, 中垣晴男, 野口俊英, 佐藤孝至. 口臭を主訴とする患者に認められた副鼻腔炎の症例, **愛知学院大学歯学会誌**, 査読有, 48巻1号, 2010, 27-31.
- ⑤ 福田光男, 永原絢子, 大澤数洋, 佐藤聡太, 高橋伸行, 渡辺智久, 青木恒宏, 三輪晃資, 三谷章雄, 野口俊英. バイオフィルム対策としてのレーザーの応用 歯周治療における PDT の現状, **日本レーザー歯学会誌**, 査読有, 20巻3号, 2009, 161-164.

[学会発表] (計23件)

- ① 水谷大樹 他. LPS に対する IL-1RaK0 マウス腹腔マクロファージの応答に関する研究, 愛知学院大学歯学会, 2010年12月5日, 愛知学院大学楠元学舎(愛知県)
- ② 高須英成 他, 骨縁下欠損に対する歯周組織再生療法5年経過症例の臨床的検討-エナメルマトリックスタンパク質を用いた症例について-, 愛知学院大学歯学会, 2010年12月5日, 愛知学院大学楠元学舎(愛知県)
- ③ 大澤数洋 他, 歯周治療における aPDT の効果について, 第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会, 2010年11月14日, ウィンクあいち(愛知県)
- ④ Noguchi T et.al, The photodynamic therapy using low level diode laser with an indocyanine green might be effective for clearance of periodontal pathogens, AAP 96th Annual Meeting, 2010年10月31日, Hawaii Convention Center (Honolulu, USA)
- ⑤ 佐々公太 他, 慢性歯周病患者に対して歯周基本治療と歯周組織再生療法を行い歯周組織の改善を認めた1症例, 第5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, 2010年10月3日, ウィルあいち(愛知県)
- ⑥ 高須英成 他, 骨縁下欠損に対するエナメルマトリックスタンパク質を応用した歯周組織再生療法5年経過症例の臨床的検討, 第53回秋季日本歯周病学会学術大会, 2010年9月19日, サンポートホール高松(香川県)
- ⑦ 水谷大樹 他, IL-1RaK0 マウス腹腔マクロファージからの IL-1 産生亢進, 第53回秋季日本歯周病学会学術大会, 2010

- 年9月19日, サポートホール高松(香川県)
- ⑧ 小澤佑介 他, ラット実験的歯周炎における破骨細胞形成と IL-1 ファミリーの動態, 第53回秋季日本歯周病学会学術大会, 2010年9月19日, サポートホール高松(香川県)
- ⑨ 大澤数洋 他, 半導体レーザーと光感受性物質の併用による aPDT の歯周治療への応用について, 第10回日本歯科用レーザー学会, 2010年9月5日, 日本歯科大学生命歯学部富士見ホール(東京都)
- ⑩ Mitani A et.al, Azithromycin inhibits interleukin-8, Rac1 and nuclear factor kappaB activation in an oral epithelial cell line stimulated with lipopolysaccharide, 14th International Congress of Immunology, 2010年8月25日, 神戸国際展示場(兵庫県)
- ⑪ 三谷章雄, AZM のサイトカイン産生修飾作用, 愛知学院大学歯周病学講座同門会学術研修会, 2010年7月1日, メルパルク名古屋(愛知県)
- ⑫ 福田光男 他, ナノ粒子を用いた光線力学療法の歯周治療への応用, 第9回バイオテクノロジー国際会議 バイオアカデミックフォーラム, 2010年6月30日, 東京ビッグサイト(東京都)
- ⑬ 大澤数洋 他, 歯周治療における半導体レーザーと光感受性物質の併用による aPDT 効果について, 第53回春季日本歯周病学会学術大会, 2010年5月14日, いわて県民情報交流センター(岩手県)
- ⑭ 村上多恵子 他, 耳鼻科との連携で改善が認められた口臭の1症例, 第75回愛知学院大学歯学会歯学学術大会, 2009年12月6日, 愛知学院大学楠元学舎(愛知県)
- ⑮ 佐々公太 他, Er:Cr:YSGG レーザーとCO2 レーザーによる歯肉メラニンの除去効果の比較, 第21回日本レーザー歯学会, 2009年11月22日, 福岡県歯科医師会館(福岡県)
- ⑯ 須賀貴行 他, 当院歯周科における歯科用レーザーの歯科治療への使用状況について, 第21回日本レーザー歯学会, 2009年11月22日, 福岡県歯科医師会館(福岡県)
- ⑰ 永原絢子 他, インドシアニングリーン封入ナノ粒子と半導体レーザーを用いた光線力学療法について, 第4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, 2009年10月25日, 松本歯科大学図書館(長野県)
- ⑱ 柳千登勢 他, 運動負荷が口臭に与える影響について, 第52回秋季日本歯周

病学会学術大会, 2009年10月11日, 宮崎観光ホテル(宮崎県)

- ⑲ 大澤数洋 他, 愛知県豊橋市で行われた健診における歯周病指数と心臓血管疾患との関連について, 第52回秋季日本歯周病学会学術大会, 2009年10月11日, 宮崎観光ホテル(宮崎県)
- ⑳ 柳千登勢 他, 疲労は、口臭の原因となるか?—運動負荷が、口臭に与える影響について—, 第4回口鼻臭臨床研究会, 2009年7月12日, 福岡県歯科医師会館(福岡県)
- ㉑ 村上多恵子 他, 口臭を訴えた患者に認められた副鼻腔炎の1症例, 第4回口鼻臭臨床研究会, 2009年7月11日, 福岡県歯科医師会館(福岡県)
- ㉒ 永原絢子 他, インドシアニンググリーン封入ナノ粒子を用いた光線力学療法について, 第74回愛知学院大学歯学会歯学学術大会, 2009年6月14日, 愛知学院大学楠元学舎(愛知県)
- ㉓ 永原絢子 他, 半導体レーザーとインドシアニンググリーン封入ナノ粒子による PDT 作用について, 第52回春季日本歯周病学会学術大会, 2009年5月15日, 岡山コンベンションセンター(岡山県)

〔図書〕(計2件)

- ① 伊藤正満, 三谷章雄, 野口俊英, 他, 永末書店, 歯科衛生士講座 歯周病治療の基礎と臨床 第2版, 2011, 280(共著担当 p.96-133)
- ② 野口俊英, 三谷章雄, 他, 第一歯科出版, 最新の歯周外科手術をマスターしよう, 2010, 152(共著担当 p.72~94, 139~143)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 章雄 (MITANI AKIO)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号: 50329611

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者