

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593134

研究課題名(和文)炎症性歯周組織におけるTh17細胞に対するIL-35の影響

研究課題名(英文)The role of IL-35 on Th17 cells in inflamed gingiva

研究代表者

三谷 章雄(Mitani, Akio)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：50329611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉組織にIL-17・IL-35関連遺伝子発現およびGCF中にIL-17・IL-35タンパクが認められ、それは健常群に比べ慢性歯周炎群で高かった。IL-17とIL-35には有意ではないが負の相関が認められた。さらに、Th17細胞に対するIL-35の直接的な影響を調べたところ、rIL-35添加はTh17細胞関連遺伝子を抑制し、IL-17タンパク産生も抑制していた。これよりIL-35はTh17細胞に対し直接作用し、IL-17産生を抑制することが示唆された。本課題研究の結果より、歯周病病態においてIL-35は歯肉の過剰な炎症を抑えるためにTh17細胞のIL-17産生を抑制している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：IL-17- and IL-35-related gene expressions in gingiva and that protein levels in GCF were higher in patients with chronic periodontitis compared to the healthy group. There was a tendency toward a negative correlation between IL-17 and IL-35 in GCF samples; however, this was not significant. Furthermore, rIL-35 inhibited the Th17-related genes expression and IL-17 protein production in Th17 cells. These results suggest that IL-35 may directly act to the Th17 cells, and followed by inhibition of the IL-17 production. Taken together, IL-35 might play a suppressive role in periodontal disease by inhibition of IL-17 production from Th17 cells in order to suppress excessive inflammation in gingiva.

研究分野：医歯薬学

キーワード：IL-35 歯周組織 Th17 歯学 免疫学

1. 研究開始当初の背景

歯周病は成人のおよそ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、歯周病の存在が糖尿病、心臓血管疾患、誤嚥性肺炎、アルツハイマー病、癌などのリスクを上げる事が明らかにされ、健康寿命延長の観点においても歯周治療の重要性が再認識されている。

歯周病の病態は歯周組織における、プラーク中の細菌感染による慢性炎症性破壊であり、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いる。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、インターロイキン 17 (IL-17) を産生するTh17細胞が注目されている。IL-17はリウマチ患者の滑膜より検出され、RANKLを誘導することにより破骨細胞を介した骨吸収に関与しており(Kotake S. et al. *J.Clin. Invest.* 1999)、また、IL-23依存的に誘導されたTh17細胞が自己免疫性関節炎において骨吸収に重要であることも明らかとなっている(Sato K et al. *J Exp Med.* 2006)。さらに、歯周病においてもTh17細胞 (Schenkein HA. et al. *J Dent Res.* 2010) やTreg細胞 (Garlet GP et al. *J Clin Periodontol.* 2010) の関与が明らかとなってきた。

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(Collison LW et al. *Nature.* 2007)。さらに近年、Foxp3を発現しないIL-35産生性のiT_{R35}が見いだされるなど(Collison LW et al. *Nature Immunol.* 2010)、IL-35は免疫制御において非常に注目されている。Niedbala WらはIL-35がTh17細胞分化を抑制して、コラーゲン誘導性リウマチを抑制することを明らかにした (Niedbala W et al. *Eur J Immunol.* 2007)。また、Ebi3^{-/-}マウスやp35^{-/-}マウスのTreg細胞は調節能が落ちており、炎症性大腸炎の改善度が悪い(Collison LW et al. *Nature.* 2007)。その他、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いう報告(Yang J et al. *Eur J Immunol.* 2008)や、コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスにおいて、IL-35による免疫抑制はIL-10を誘導することによるという報告(Kochetkova I et al. *J Immunol.* 2010)がある。

2. 研究の目的

歯周病では歯周組織において、T細胞を中心とした免疫応答が惹起されているが、そのメカニズムを明確に説明できていない。また、我々はこれまで歯周病患者と健常者におけるIL-35産生について検討してきているが、歯周病病態におけるTh17細胞に対するIL-35の役割やIL-35によるTh17細胞に対する直接的な影響は未だ不明である。そこで、歯周病病態におけるTh17細胞に対するIL-35の影響を解析することとした。

また、本研究では歯周治療における免疫療法を模索する基礎的研究として、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炎症性疾患の治療にフィードバックすることも目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯肉組織中の IL-17・IL-35 関連遺伝子発現解析

同意を得た慢性歯周炎患者および健常ボランティアより、フラップ手術あるいは歯冠延長術の際に歯肉組織を採取した。組織を粉碎後、通法に従いtotal RNAを抽出し、cDNAを調整した。qPCR法にて18S rRNAに対するIL17A, EBI3, IL12Aの発現量を解析した。

(2) 歯肉溝滲出液中の IL-17・IL-35 タンパク量測定

ペリオペーパーを用いて歯肉溝滲出液(GCF)を採取し、Periotron8000にて測定後、1% protease inhibitor cocktailを添加したPBS 200 μ L中に浸漬し、30秒撹拌した。5分間の遠心後、上清をサンプルとした。各サンプルを用いてELISAキットにてIL-17あるいはIL-35量を測定した。

(3) 末梢血中 CD4⁺T細胞のポピュレーション解析

インフォームドコンセントを得た慢性歯周炎患者および健常者から採血し、リンパ球・単球を分離した。その後auto MACSにてCD4⁺T細胞をソーティングし、細胞内サイトカインFACSにてIL-17、Foxp3、IFN- γ 陽性細胞の割合を調べた。

(4) Th17細胞の誘導法の検討

上記(3)と同様に末梢血由来リンパ球・単球を分離し、auto MACSにてCD4⁺T細胞をソーティングし、*in vitro*にてリコンビナントIL-6 (rIL-6)、rIL-1 β 、rTGF β および抗IL-2・抗IL-4・抗IFN γ 中和抗体(サイトカインカクテル)を用いた誘導法とrIL-23を用いた誘導法で、

誘導された Th17 細胞を比較した。

(5) Th17 細胞に対する IL-35 の影響

誘導した Th17 細胞に、rIL-35 で刺激を行った後、total RNA を抽出し、IL17A、RORA、および RORC の mRNA 発現を qPCR 法にて解析した。また、ELISA にて IL-17 産生量を調べた。

4. 研究成果

(1) 歯肉組織中の IL-17・IL-35 関連遺伝子発現解析

歯肉組織中の IL-17・IL-35 関連遺伝子を検討した結果、慢性歯周炎群では健常群に比べ IL17A および IL-35 のサブユニットである EB13, IL12A (p35) の mRNA 発現が有意に高かった (図 1)。

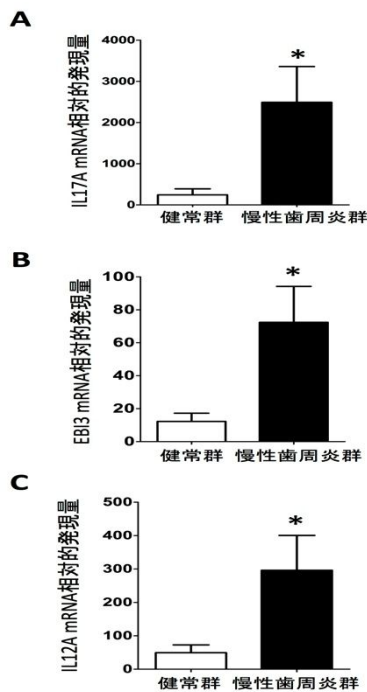


図 1. 健常群および慢性歯周炎群の歯肉組織における IL-17・IL-35 遺伝子発現。A, IL17AmRNA の発現の違い。B, EB13 mRNA の発現の違い。C, IL12A (p35) mRNA 発現の違い。各群 10 名。18S rRNA にてノーマライズした後、発現の最も低いものを 1 とし、それに対する相対発現量で示した。*, $P < 0.05$ 。

(2) 歯肉溝滲出液中の IL-17・IL-35 量の相関検討

GCF 中の IL-17 および IL-35 量を検討した結果、慢性歯周炎群では健常群に比べ IL-17A および IL-35 産生は有意に高かった (図 2A, B)。次に、歯周炎患者由来 GCF サンプルの中で IL-17・IL-35 共に検出された 12 サンプルに関して、相関分析を行った。その結果、IL-17 と IL-35 には有意ではないが中程度の負の相関を認めた (図 2C; Spearman $r = -0.50$)。

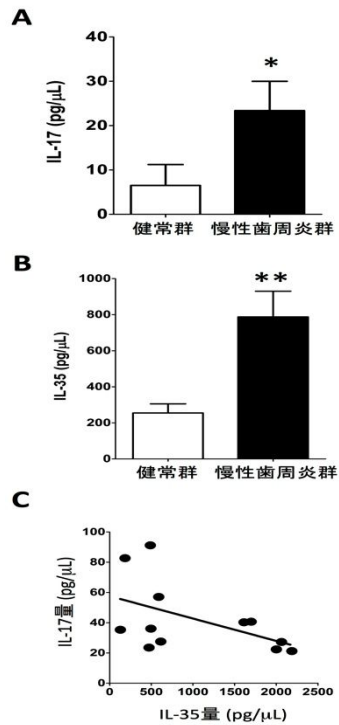


図 2. GCF 中の IL-17 および IL-35 産生。A, IL17 産生量の発現の違い。B, IL-35 産生量の違い。C, IL-17 および IL-35 産生量の相関性。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

(3) 末梢血中 CD4⁺T 細胞のポピュレーション解析

歯周病が末梢血中 T 細胞ポピュレーションに影響を与えるか否かを確認するため、慢性歯周炎患者と健常者で末梢血中の CD4⁺T 細胞の IL-17、Foxp3、IFN- γ 陽性細胞の割合を調べた。その結果、歯周炎患者は健常者に比べ IL-17 陽性細胞が多い傾向にあった。逆に IFN- γ 陽性細胞は歯周炎患者よりも健常者において多い傾向にあった。しかし、両者に有意な差は認められなかった (表 1)。

表 1. 末梢血中 CD4⁺T 細胞ポピュレーション

	IL-17A	IFN-	Foxp3
健常者 (n=3)	3.9 ± 1.3	22.8 ± 9.6	8.0 ± 2.3
歯周炎患者 (n=4)	4.8 ± 3.4	17.3 ± 5.5	7.5 ± 0.9

(4) Th17 細胞の誘導

末梢血中の IL-17、Foxp3、IFN- γ 陽性 CD4⁺T 細胞の割合には慢性歯周炎患者と健常者で有意な差はなかったが、Th17 細胞へ誘導した場合、両者の誘導効率が異なる可能性がある。そこで 2 種類の誘導方法で末梢血 CD4⁺T 細胞からの Th17 細胞誘導効率を比較した。サイトカインカクテル群はコントロールおよび rIL-23 群と比較して、Th17 細胞分化転写因子の RORA および RORC の遺伝子発現

が有意に上昇していた (図3)。

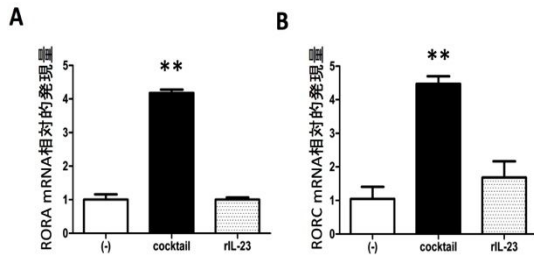


図3. 2種類のTh17細胞誘導法によるTh17関連転写因子の発現. A, RORAmRNAの発現の違い. B, RORC mRNAの発現の違い. **, $P < 0.01$.

(5) Th17細胞に対するIL-35の影響

サイトカインカクテルを用いてTh17細胞を誘導し、IL-35の影響を検討した。誘導したTh17細胞にrIL-35を添加した後、IL17A、RORA、RORCのmRNA発現を検討したところ、誘導により上昇したIL17A mRNA発現がrIL-35添加(0.1、1ng/mL)により有意に

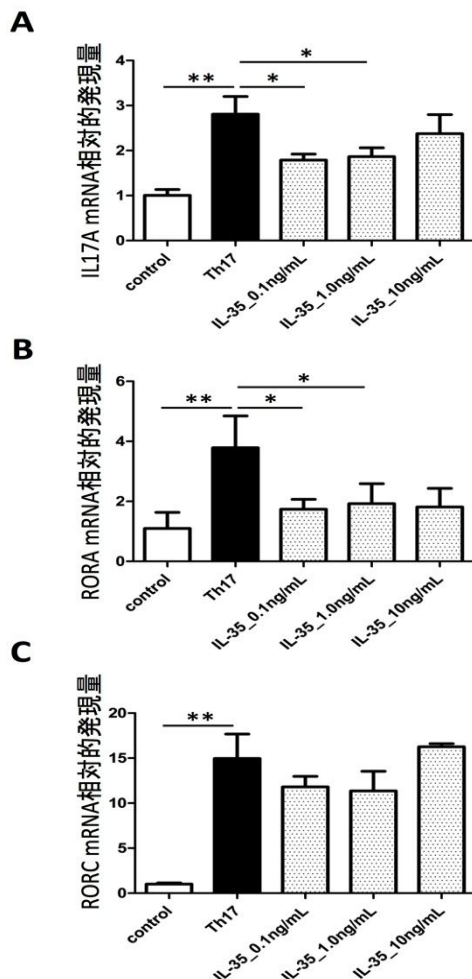


図4. Th17細胞関連遺伝子発現に対するrIL-35の影響.

A, IL17A mRNA発現への影響. B, RORA mRNA発現への影響. C, RORC mRNA発現への影響. control, Th17未誘導CD4⁺T細胞; Th17, 誘導Th17細胞; IL-35 (0.1-10 ng/mL), 誘導Th17細胞にrIL-35添加群. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

抑制された(図4A)。また、Th17誘導により上昇したRORA mRNA発現はrIL-35添加(0.1、1 ng/mL)により有意に抑制された(図4B)。一方、RORC mRNA発現はrIL-35添加による有意な減少を認めなかった(図4C)。このことより、IL-35はTh17細胞のRORαを特異的に抑制する可能性が考えられた。

さらに、誘導したTh17細胞にrIL-35を添加した後、IL-17産生量を検討したところ、Th17誘導により増加したIL-17産生はrIL-35添加(1、10ng/mL)により有意に抑制された(図5)。

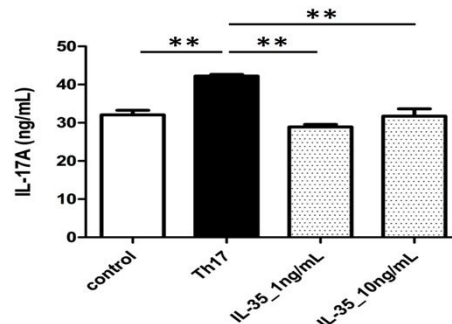


図5. Th17細胞のIL-17産生に対するrIL-35の影響. control, Th17未誘導CD4⁺T細胞群; Th17, 誘導Th17細胞群; IL-35 (1, 10 ng/mL), 誘導Th17細胞にrIL-35添加した群. **, $P < 0.01$.

(6) まとめ

本研究により、歯肉組織にIL-17およびIL-35関連遺伝子発現およびGCF中IL-17・IL-35タンパクが認められ、それは健常群に比べ慢性歯周炎群で高かった。また、その両者には有意ではないが中程度の負の相関が認められた。さらに、Th17細胞に対するIL-35の直接的な影響を調べたところ、rIL-35添加はTh17細胞関連遺伝子を抑制し、IL-17タンパク産生も抑制していた。これまでの*in vivo*研究より、IL-35はTreg細胞よりIL-10を誘導する、あるいはTh17細胞の分化を抑制することでIL-17産生抑制につながると考えられていたが、本研究によりIL-35はTh17細胞に対し直接作用し、IL-17産生を抑制することが示唆された。

本課題研究の結果より、歯周病病態においてIL-35は歯肉の過剰な炎症を抑えるためにIL-17産生を抑制している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計17件)

Mitani A, Niedbala W, Fujimura T, Mogi M, Miyamae S, Higuchi N, Abe A, Hishikawa T,

Mizutani M, [Ishihara Y](#), Nakamura H, Kurita K, Ohno N, Tanaka Y, Hattori M, Noguchi T. **Increased expression of interleukin-35 and -17, but not -27, in gingival tissues with chronic periodontitis.** *J Periodontol*. 査読有、86巻、2015、301-309

DOI:10.1902/jop.2014.140293

[Mitani A](#), Takasu H, Horibe T, Furuta H, Nagasaka T, [Aino M](#), Fukuda M, Fujimura T, Mogi M, Noguchi T. Five-year clinical results for treatment of intrabony defects with enamel matrix derivative, guided tissue regeneration and open-flap debridement: a case series. *J Periodont Res*. 査読有、50巻、2015、123-130
DOI:10.1111/jre.12188

Ting CC, Fukuda M, Watanabe T, Sanaoka A, [Mitani A](#), Noguchi T. Morphological Alterations of Periodontal Pocket Epithelium Following Nd:YAG Laser Irradiation. *Photomed Laser Surg*. 査読有、32巻、2014、649-657

DOI:10.1039/pho.2014.3793

[Aino M](#), Nishida E, [Mitani A](#), Noguchi T, Makino H, Murakami S, Umezawa A, Yoneda T, Saito M. Isolation and characterization of the human immature osteoblast culture system from the alveolar bones of aged donors for bone regeneration therapy. *Expert Opin Biol TH*. 査読有、14巻、2014、1731-1744

DOI: 10.1517/14712598.2014.960387

Miyajima S, Naruse K, Kobayashi Y, Nakamura N, Nishikawa T, Adachi K, Suzuki Y, [Kikuchi T](#), [Mitani A](#), Mizutani M, Ohno N, Noguchi T, Matsubara T. Periodontitis-activated monocytes/macrophages cause aortic inflammation. *Sci Rep*. 査読有、4巻、2014、5171

DOI:10.1038/srep05171

Takeda H, [Kikuchi T](#), Soboku K, Okabe I, Mizutani H, [Mitani A](#), [Ishihara Y](#), Noguchi T. Effect of IL-15 and natural killer cells on osteoclast and osteoblast in a mouse coculture. *Inflammation*. 査読有、37巻、2014、657-669

DOI:10.1007/s10753-013-9782-0

Takahashi S, Fukuda M, [Mitani A](#), Fujimura T, Iwamura Y, Sato S, Kubo T, Sugita Y, Maeda H, Shinomura T, Noguchi T. Follicular dendritic cell-secreted protein expression is reduced in experimental periodontitis concurrently with the up-regulation of IL-17 mRNA and an increase in the RANKL/OPG mRNA ratio. *J Periodont Res*. 査読有、49巻、2014、390-397

DOI:10.1111/jre.12118

Izawa A, [Ishihara Y](#), Mizutani H, Kobayashi S, Goto H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Sugita Y, Kubo K, Kamei H, [Kikuchi T](#), [Mitani A](#), Hayashi J, Nishihara T, Maeda H, Noguchi T. Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in IL-1Ra knockout mice. *Infect Immun*. 査読有、82巻、2014、1904-1913

DOI: 10.1128/IAI.01618-13

Fujimura T, [Mitani A](#), Fukuda M, Mogi M, Osawa K, Takahashi S, [Aino M](#), Iwamura Y, Miyajima S, Yamamoto H, Noguchi T. Irradiation with a low-level diode laser induces the developmental endothelial locus-1 gene and reduces pro-inflammatory cytokines in epithelial cells. *Lasers Med Sci*. 査読有、29巻、2014、987-994

DOI: 10.1007/s10103-013-1439-6

Watanabe T, Fukuda M, [Mitani A](#), Ting CC, Osawa K, Nagahara A, Sato S, Fujimura T, Takahashi S, Iwamura Y, Murakami T, Noguchi T. Nd:YAG laser irradiation of the tooth root surface inhibits demineralization and root surface softening caused by minocycline application. *Photomed Laser Surg*. 査読有、31巻 2013、571-577

DOI: 10.1089/pho.2013.3561

Suga T, [Mitani A](#), Mogi M, [Kikuchi T](#), Fujimura T, Takeda H, Hishikawa T, Yamamoto G, Hayashi J, [Ishihara Y](#), Noguchi T. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulated epithelial cells produce interleukin-15 that regulates T cell activation. *Arch Oral Biol*. 査読有、58巻、2013、1541-1548

DOI:10.1016/j.archoralbio.2013.06.20

Mizutani H, [Ishihara Y](#), Izawa A, Fujihara Y, Kobayashi S, Gotou H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Kamei H, [Kikuchi T](#), Yamamoto G, [Mitani A](#), Nishihara T, Noguchi T., Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* upregulates inflammatory cytokines, PGE₂ synthesis, and osteoclast formation in IL-1Ra deficient mice. *J Periodont Res*. 査読有、48巻、2013、748-756
DOI: 10.1111/jre.12065

Nagahara A, [Mitani A](#), Fukuda M, Yamamoto H, Tahara K, Morita I, Ting CC, Watanabe T, Fujimura T, Osawa K, Sato S, Takahashi S, Iwamura Y, Kuroyanagi T, Kawashima Y, Noguchi T., Antimicrobial photodynamic

therapy using a diode laser with a potential new photosensitizer, indocyanine green-loaded nanospheres, may be effective for the clearance of *Porphyromonas gingivalis*, **J Periodont Res**, 査読有、48巻、2013、591-599
DOI: 10.1111/jre.12042

Niedbala W, Besnard AG, Jiang HR, Alves-Filho JC, Fukada SY, Nascimento D, Mitani A, Pushparaj P, Alqahtani MH, Liew FY. **Nitric Oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function.** **J Immunol**, 査読有、191巻、2013、164-170
DOI: 10.4049/jimmunol.1202580

【学会発表】(計 24 件)

Kobayashi S, Mitani A 他 : Surface modification of polyvinylidene chloride films using argon ion bombardment for guided bone regeneration, 2015 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition 2015年3月13日、Boston (USA)

Tobata H, Fujimura T, Mitani A 他: Effects of mouthrinse on gingivitis and bacterial flora. The 62th Annual Meeting of International Association for Dental Research Japanese Division、2014年12月5日、KKRホテル大阪(大阪府大阪市)

宮島真一、菊池毅、三谷章雄 他 : 歯周炎により活性化された単核球が大動脈の炎症を惹起する機序の検討、第57回秋季日本歯周病学会、2014年10月19日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

Kamiya Y, Ishihara Y, Mitani A 他 : High levels of sIL-1RAcP was observed in chronic periodontitis patients. 2014 Annual Meeting of American Academy of Periodontology、2014年9月20日、San Francisco (USA)

齋藤正寛、相野 誠、三谷章雄 他 : ヒト歯槽骨由来未分化骨芽細胞の骨原性維持に関わるマーカーの探索、第140回春季日本歯科保存学会、2014年6月19日、滋賀県立芸術劇場(滋賀県大津市)

鈴木佑基、菊池毅、三谷章雄 他 : GIPIは歯周炎を抑制する、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月22日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

Ishihara Y, Aino M, Mitani A 他、Serum sIL-1RAcP levels are correlated with periodontal disease severity、98TH Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of

Periodontology、2012年09月30日、Los Angeles (USA)

Mitani A, Takeda H, Kikuchi T, Ishihara Y 他、The Effect of Interleukin- 15 on Inflammatory Bone Metabolism、EUROPEAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY、2012年09月07日、Glasgow (Scotland, UK)

三谷章雄、相野誠、石原裕一 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136回日本歯科保存学会春季学術大会、2012年06月29日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

【図書】(計 1 件)

三谷章雄 他、医歯薬出版、慢性疾患としての歯周病のアプローチ 患者さんの生涯にわたる QOL に貢献するために、2014、252

【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・教授
研究者番号 : 5 0 3 2 9 6 1 1

(2) 研究分担者

菊池 毅 (KIKUCHI, Takeshi)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号 : 4 0 4 2 1 2 4 2

相野 誠 (AINO, Makoto)
愛知学院大学・歯学部・助教
研究者番号 : 2 0 5 7 2 8 1 1

石原 裕一 (ISHIHARA, Yuichi)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 5 0 2 6 1 0 1 1

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

藤村 岳樹 (FUJIMURA, Takeki)
愛知学院大学・歯学部・助教
研究者番号 : 4 0 7 4 9 8 9 2