

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463151

研究課題名(和文) IL-22による歯周病細菌の感染制御のための基礎的研究

研究課題名(英文) Effect of IL-22 on immune response against periodontal bacteria

研究代表者

小越 菜保子 (Kato-kogoe, Nahoko)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：60509115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病細菌は歯周組織の細胞内に侵入，増殖し，歯周病の進行と慢性化に深く関わると考えられている。それらの細胞内侵入細菌の制御のために，本研究は IL-22 に着目し，その感染防御に及ぼす影響を調べた。IL-22 は *in vitro* で歯肉上皮細胞の分化を抑制し，抗菌ペプチド産生も抑制することが明らかになった。一方，IL-22 は *Porphyromonas gingivalis* の歯肉上皮細胞への付着性あるいは侵入性を抑制する傾向があった。より詳細な検討が必要であるが，IL-22 が *P.gingivalis* に対する感染防御に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the effects of IL-22 on the response against periodontal bacteria in gingival epithelial cells. We found that IL-22 reduced gingival epithelial cell differentiation and subsequently decreased antibiotic peptide productivity. In addition, incubation with IL-22 decreased the invasion of *Porphyromonas gingivalis* into the gingival epithelial cells. The results suggest that IL-22 augments resistance to bacterial invasion of gingival epithelial cells.
The effect of IL-22 on immune response against periodontal bacteria.

研究分野：歯周病態学

キーワード：IL-22 歯肉上皮細胞 細胞内侵入細菌

1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌は歯周組織の細胞内に侵入、増殖し、歯周病の進行と慢性化に深く関わると考えられている。中でも *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) については、宿主細胞内への侵入およびその後の動態に関してその機構の解明が進んでいる (Takeuchi H *et al.*, *Commun Integr Biol.* 2011)。細胞内に侵入する細菌に対する口腔粘膜上皮の防御としては、物理的なバリア機能の他に、抗菌ペプチド (タンパク) 産生がある。細胞内侵入細菌に対する抗菌ペプチドとしては、ディフェンシンやカテリシジン、カルプロテクチン、SLPI、LCN2 の他、多くの種類が知られている。中でも細胞内で細菌の侵入を抑制するのは、細胞質内のカルプロテクチン (S100A8/A9) と、エンドソームのカテリシジンの2つであり、これらを発現させることによって、リステリアおよびサルモネラの上皮細胞内侵入が抑制されるという報告がある (Zou X *et al.*, *Infect Immun.* 2013)。カルプロテクチン (S100A8/A9) は、*P.gingivalis* の上皮細胞への付着、侵入を抑制することから、口腔上皮細胞におけるその産生機構が詳細に明らかにされている (Hayashi N *et al.*, *J Periodontal Res.* 2007)。

インターロイキン 22 (IL-22) は、約 10 年前に同定されたサイトカインで消化管や気道、皮膚といった外界に接する組織に発現が高い。これらの組織では、免疫細胞から産生される IL-22 が、上皮細胞に発現する IL-22 レセプターを介して、ディフェンシンや S100A8、S100A9 といった抗菌ペプチド産生を誘導することが知られている (Wolk K *et al.*, *Eur J Immunol.* 2006)。IL-22 によって産生誘導された S100A8 が結核菌の細胞内増殖抑制にかかわるという報告もある (Dhiman R *et al.*, *J Infect Dis.*, 2013)。従って、歯周病細菌の感染においても IL-22 がその制御に関与し得るにちがいない。

我々はこれまでに歯周病の病態における IL-22 の役割に着目して研究を進めてきた。その結果、歯周病細菌抗原に対して特異的な IL-22 産生性 T 細胞が存在すること、IL-22 レセプターは歯周局所の歯肉線維芽細胞およ

び歯根膜細胞において高発現していること、IL-22 の歯根膜細胞に対する生物学的活性を明らかにしてきた (Kato-kogoe N *et al.*, *Cytokine.*, 2012)。

IL-22 は組織修復に関わると共に前述のように感染防御にも重要なサイトカインであることから、本研究は歯周病細菌の感染における IL-22 の役割の解明に焦点をあてた。歯周組織を構成する歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞は IL-22 レセプターを発現することから、IL-22 は歯周組織における抗菌ペプチド産生に影響を及ぼす可能性がある。近年前述のように細胞外のみでなく細胞内から細菌感染の制御にかかわる抗菌ペプチドの作用がわかってきた。細胞内侵入歯周病細菌の感染制御に IL-22 が鍵を握るに違いないと考え着想に至った。

2. 研究の目的

歯周病細菌は歯周組織の細胞内に侵入、増殖し、歯周病の進行と慢性化に深く関わると考えられている。それらの細胞内侵入細菌の制御のために、本研究は抗菌ペプチドを誘導する IL-22 に着目し、その感染防御に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。そのために、IL-22 が抗菌ペプチド産生性、さらに歯周病細菌の細胞内侵入に及ぼす影響を広く評価する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

歯肉上皮細胞 (CELLnTEC. Bern. Switzerland) と歯肉線維芽細胞 (ScienCell research laboratories. CA. USA) の正常初代培養細胞株および歯肉上皮由来細胞株 Ca9-22 (JCRB 0625) を購入し、説明書に従って培養し、以下の実験系に用いた。

(2) IL-22 による抗菌ペプチド発現の定量解析
歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞における抗菌ペプチドの遺伝子発現の定量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて行った。すなわち、細胞から全 mRNA を回収した後、オリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応を行うことによって cDNA を合成し、それらを鋳型としてターゲット分子に対して特異的な

TaqMan プローブを用いて増幅を行ない、LightCycler® 480 System (Roche Life Science, IN, USA) にて蛍光強度をリアルタイムに測定した。また、抗菌ペプチドのタンパクレベルでの産生性を ELISA およびウェスタンブロット法にて解析した。これらの遺伝子およびタンパクの発現レベルを IL-22 の存在下および非存在下の各条件で比較し、IL-22 の抗菌ペプチド産生性への関与について考察した。

(3) *P.gingivalis* の細胞内侵入性の顕微鏡的観察

歯肉上皮細胞あるいは Ca9-22 細胞を FITC 標識した *P.gingivalis* W83 株あるいは ATCC33277 株と共培養した。培養は 3.5cm ガラスボトム dish 上で行い、経時的に蛍光色素の細胞内局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察した。IL-22 の存在下および非存在下での各条件で比較し、IL-22 の *P.gingivalis* 細胞内局在に及ぼす影響について考察した。

(4) *P.gingivalis* の細胞内侵入性のフローサイトメーターによる解析

歯肉上皮細胞あるいは Ca9-22 細胞を FITC 標識した *P.gingivalis* W83 株あるいは ATCC33277 株と共培養し、3, 6, 24 時間後に BD FACS Calibur™ で解析した。

(5) Antibiotic protection assay

IL-22 による *P.gingivalis* の細胞内侵入性を antibiotic protection assay により評価した。歯肉上皮細胞あるいは Ca9-22 細胞を *P.gingivalis* W83 株あるいは ATCC33277 株と共培養し、一定時間後に抗生剤入りの培地に交換し細胞外の細菌を殺した後、細胞を回収してバーストさせ、血液寒天培地にまき、CFU をカウントすることによって、細胞内に侵入した細菌を定量した。なお、嫌気培養については、嫌気ボックス (BD) を用いて 37°C インキュベーター内で行った。

4. 研究成果

(1) IL-22 が歯肉上皮細胞の抗菌ペプチド産生性に及ぼす影響

① 歯肉上皮細胞における IL-22 による抗菌ペ

プチド産生性

これまでに歯周組織を構成する歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞が IL-22 レセプターを高発現していることを見出してきたことから、これらの細胞において IL-22 によって誘導される抗菌ペプチドを広く調べた。抗菌ペプチドとしては、カルプロテクチン (S100A8/A9)、ディフェンシン、RegIII γ 、リポカリン 2 (LCN2) を調べた。その結果、歯肉上皮細胞および歯肉上皮細胞株 Ca9-22 細胞において S100A8, A9, hBD2, LCN2 の mRNA 発現がみられたが、IL-22 がこれらの抗菌ペプチドの mRNA 発現に及ぼす影響は、IL-1 β , TNF- α , IL-17 と比較して弱いことがわかった。

② 歯肉上皮細胞の分化と IL-22 による抗菌ペプチド産生性

IL-22 存在下で、歯肉上皮細胞を分化誘導した時の抗菌ペプチド産生性を評価した。分化の程度は、低分化マーカー CK14, 中分化マーカー CK10, 高分化マーカー involucrin の発現レベルによって確認した。歯肉上皮細胞の分化に伴い、経時的に S100A8, A9, LCN2 の mRNA 発現レベルは上昇した。IL-22 存在下では分化のレベルが低く、抗菌ペプチドの発現レベルも低いことが明らかになった (図 1)。このことはタンパクレベルでカルプロテクチンおよびリポカリン 2 の ELISA およびウェスタンブロット法によっても確認した。

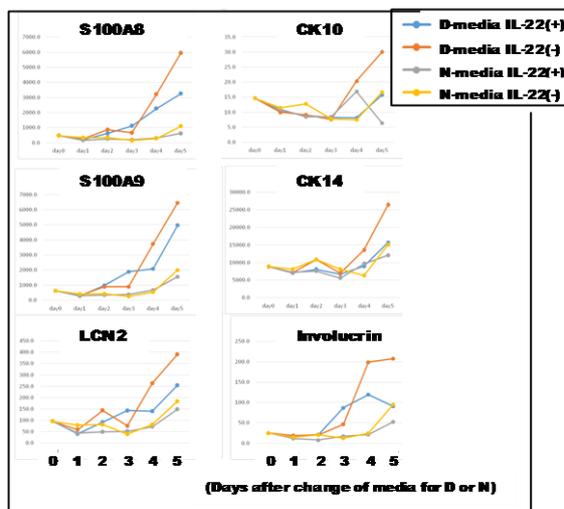


図 1 歯肉上皮細胞の分化誘導時の抗菌ペプチド産生性

(2) IL-22が*P.gingivalis*の細胞内侵入性に及ぼす影響

①共焦点レーザー顕微鏡による観察

IL-22存在下において歯肉上皮細胞あるいはCa9-22細胞をFITC標識した*P.gingivalis* W83株あるいはATCC33277株と共培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、IL-22存在下では細胞周囲の標識*P.gingivalis*が少ない傾向が見られた(図2)。

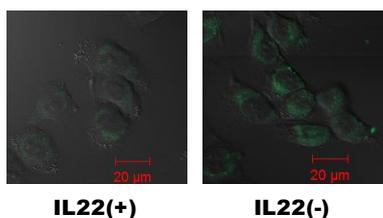


図2 FITC標識*P.gingivalis*の局在

②フローサイトメーターによる解析

IL-22存在下において歯肉上皮細胞あるいはCa9-22細胞をFITC標識した*P.gingivalis* W83株あるいはATCC33277株と共培養し、フローサイトメーターで蛍光細胞を解析した。その結果、IL-22を加えて培養した歯肉上皮細胞では、加えなかった時と異なる傾向があった(図3)

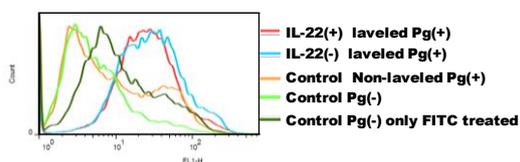


図3 FITC標識*P.gingivalis*の分布

③Antibiotic protection assayによる評価

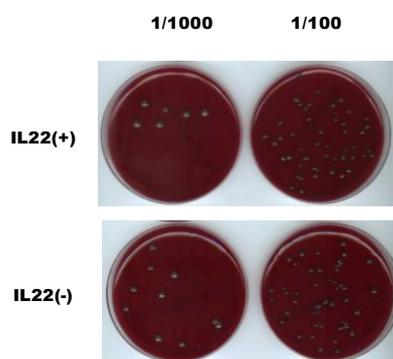


図4 Antibiotic protection assay

*P.gingivalis*の細胞内侵入性におけるIL-22の影響を評価するために、歯肉上皮細胞の細胞株であるCa9-22細胞株を用いて*P.gingivalis*

W83株およびATCC33277株と共培養し、antibiotic protection assayを行った。その結果、IL-22存在下では*P.gingivalis*のCa9-22細胞への侵入性が抑えられる傾向があった(図4)。

以上の結果から、IL-22は*P.gingivalis*の歯肉上皮細胞への侵入性に影響を及ぼすことが示唆された。しかしながら、その詳細の解明にはさらに検討が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

- ① Kato-Kogoe N, Ohyama H, Okano S, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Nishiura H, Abiko Y, Terada N, Nakasho K., Functional analysis of differences in transcriptional activity conferred by genetic variants in the 5' -flanking region of the IL12RB2 gene., Immunogenetics.; 査読有, 2016; 68(1): 55-65 doi: 10.1007/s00251-015-0882-x.
- ② Kuroda Y, Kato-Kogoe N, Tasaki E, Yuasa-Sunagawa M, Yamanegi K, Nakasyo K, Nakase I, Futaki S, Tohyama Y, Hirose M., Suppressive effect of membrane-permeable peptides derived from autophosphorylation sites of the IGF-1 receptor on breast cancer cells., Eur J Pharmacol ; 査読有, 2015; 765: 24-33. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.004.

6. 研究組織

(1)研究代表者

小越 菜保子 (KOGOE, Nahoko)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60509115

(2)研究分担者

大山 秀樹 (OHYAMA, Hideki)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 90280685
中山 真彰 (NAKAYAMA, Masaaki)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 10579105
山根木 康嗣 (YAMANEGI, Koji)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00434944
山田 直子 (YAMADA, Naoko)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10319858

黒田 義弘 (KURODA, Yoshihiro)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：90093236