

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791625

研究課題名（和文）侵襲性歯周病患者における Th17 細胞および IL-17 の役割について

研究課題名（英文）The role of Th17 cell and IL-17 in the aggressive periodontitis

研究代表者

田中 繁寿 (TANAKA SHIGEHISA)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：30367619

研究成果の概要（和文）：侵襲性歯周炎患者より GCF を採取し、IL-17 濃度を測定したが、すべてのサンプルにおいて検出限界以下であった。GCF の採取方法を考慮し測定を行ったが、結果は同様であった。歯肉局所の IL-17 の存在を確かめるために、歯肉組織中の IL-17mRNA の発現をリアルタイム PCR にて認めた。次いで、LPS の刺激において THP-1 細胞より IL-12 および IL-23 が産生されることを確認した。その後、抹消血より単球を単離し E.coli 由来の LPS にて刺激後、培養上清の IL-12 および IL-23 について解析した。両サイトカインともに検出できたが、侵襲性歯周炎患者と健常者の間で有為な差は認められなかった。今後サンプル数を増やし検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：GCF was gathered from the patient diagnosed aggressive periodontitis, and the IL-17 density was measured. But all samples were not detected. The result was similar though it had measured in consideration of the method of gathering GCF. To confirm the existence of IL-17 in the local of gingival, The expression of IL-17mRNA was recognized in gingiva with real-time PCR. Next, It was confirmed that the THP-1 cell produced IL-12 and IL-23 stimulated with LPS. The monocytes isolated from the peripheral blood stimulated with E.coli LPS. IL-12 and IL-23 was measured of in the culture supernatant. Though both cytokines were able to detected, there were no significant difference between the aggressive periodontitis patient and healthy group. It is necessary to be going to increase the number of samples in the future and to examine it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：歯周免疫機能学、T 細胞、インターロイキン 17

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周炎はデンタルプラークなどにより歯周組織に生じる慢性炎症性破壊であることが知られている。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、近年、T細胞の新しいサブセットとして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。

(2) Th17細胞はマクロファージや樹上細胞からのIL-23により誘導され（分化にはTGF- β , IL-6が重要）IL-17を産生する。Th17細胞から産生されたIL-17は繊維芽細胞や上皮細胞などから炎症性サイトカインやケモカインを誘導し、炎症反応を惹起させることが知られている。またT細胞の各サブセットは相互排他的であると考えられており、Th1細胞の産生するIFN- γ がTh17細胞の分化を抑制することにより慢性炎症を抑制的に調節することも示唆されている。さらにIL-17はRANKLを誘導することにより骨吸収に関与していることも明らかとなっており、Th1細胞およびTh2細胞はむしろ破骨細胞の分化、誘導に対して抑制的にはたらいたという報告もある。

(3) 今までに歯周病とIL-17に関連したいくつかの報告があり、歯周炎患者においてIL-17の産生が増加することは示唆されており、Th17細胞と産生されるIL-17は慢性炎症とそれに伴う骨吸収を特徴とする歯周炎の病態形成に関連していることが考えられる。しかし、歯周病の発症及び進行における役割、もしくはTh1細胞およびTh2細胞との関係、歯槽骨破壊に及ぼす影響等は明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、歯周病におけるTh17細胞およびIL-17の役割の中で、特に歯槽骨破壊との関係について調べるため以下の点を目的とした。

① 歯周組織の破壊が大きいと考えられる、侵襲性歯周炎患者のGCFサンプルを採取し、歯周炎の病態におけるIL-17と臨床的な骨吸収の関係について考察する。

② 侵襲性歯周炎患者から採取した末梢血中の単球を刺激したとき、Th1細胞を誘導するIL-12とTh17細胞を誘導するIL-23の産生に差があるかを考察する。

(2) 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、様々な報告がなされてきた。しかしながら、Th1細胞およびTh2細胞は骨吸収を抑制することが示唆され、細菌の排除と歯周組織破壊のメカニズムを明確に説明できていな

い。近年確立された、T細胞の新しいサブセットであるTh17細胞とIL-17の歯周組織での役割を解析することは、歯周病の病態を解明する一助となるだろう。

3. 研究の方法

(1) 被験者の選択

愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科を受診し、特記すべき全身疾患を有さず、本研究の主旨に同意し、倫理委員会にて承認を得た同意書に署名した侵襲性歯周炎患者を被験者として選択した。

(2) GCFサンプル中のIL-17の測定

GCFサンプルは、被験部位を簡易防湿し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、エアージン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約1mmまで挿入し10秒間静置し吸湿採取する。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Periotron 8000を用いてペリオトロン値を測定し、湿重量についても測定した。その後、生理食塩水100 μ lを加え、GCFを溶出させてから上清を回収した後、-20度にて保存した。IL-17濃度はIL-17 ELISA Kitを用いて測定した。

(3) 歯肉組織中のIL-17mRNAの解析

歯周外科時に歯肉組織を採取し、通用に従いtotal RNAを抽出した。その後、リアルタイムPCRにてIL-17mRNAについて解析した。コントロールは口蓋歯肉組織を用いた。

(4) THP-1細胞からのサイトカインの産生
Th17細胞の分化への影響を調べる前準備として、ヒト単球由来である、THP-1細胞をE. coli LPSで24時間刺激培養し、培養上清のIL-12およびIL-23についてELISA Kitを用いて解析した。

(5) 患者末梢血からの単球の培養

末梢血20mlを採取し、Lymphoprep™ Tubeにてリンパ球を分離した後10mlディッシュにて1時間培養した。付着細胞を単球として回収した。その後、E. coli LPS (1 μ /ml) の刺激で24時間培養後、培養上清を回収し、-20度にて保存した。培養上清中のIL-12およびIL-23について、それぞれのELISA Kitを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) GCF 中の IL-17

愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科を受診した 20 歳以上 40 歳未満 (平均年齢 38.8 歳) 20 人より GCF を採取した。被検歯を上顎中切歯、下顎第一大臼歯とし、その GCF 量および臨床パラメーターを表 1 に示す。尚、なるべく条件を同じにするために、GCF 採取時期は歯肉縁下処置を行う前に行った。GCF 中の IL-17 濃度を ELISA にて測定したが、すべてのサンプルで検出限界以下であった。比較的炎症が強いと思われた部位からも IL-17 は検出できなかった。その後、GCF の採取方法等を考慮して再度調べたが検出に至らなかった。

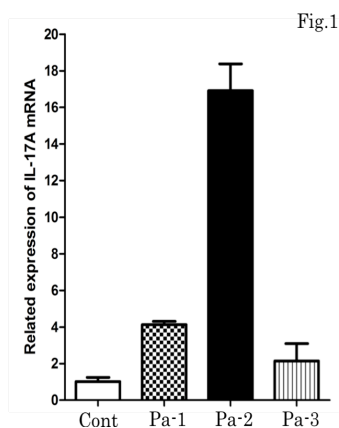
表1. GCF量および臨床パラメーター (n=20)

歯式	GCF量(μl)	PD(mm)	AL(mm)
11 or 21	0.92±0.89	2.56±1.25	3.40±1.82
36 or 46	2.09±1.08	3.49±1.05	4.50±1.54

(2) そのため、歯肉の炎症局所における IL-17 の存在を調べるため、歯周外科時に歯肉組織を採取し、リアルタイム PCR にて、IL-17mRNA の発現を調べた。

非炎症性の組織として、口蓋歯肉(Cont)をコントロールとした。結果コントロールに比べ、炎症性の歯肉組織(Pa-1, 2, 3)では 4 から 18 倍の IL-17mRNA 発現を認めた (Fig. 1)。

以上より、炎症性歯周組織に IL-17mRNA の発現を認めたため、歯肉局所での IL-17 の存在は示唆されたが、GCF から IL-17 を検出することは困難であった。その理由としては、GCF 中の IL-17 濃度が少ないこと、GCF 回収時のロスが多いことなどが考えられた。



(3) T細胞サブセットの誘導を解析する前準備として、ヒト単球由来である THP-1 細胞を E. coli LPS で 24 時間刺激培養し、培養上清の IL-12 および IL-23 について調べた。LPS の刺激において THP-1 細胞より IL-12 および IL-23 が産生されることを確認した (Fig. 2)。

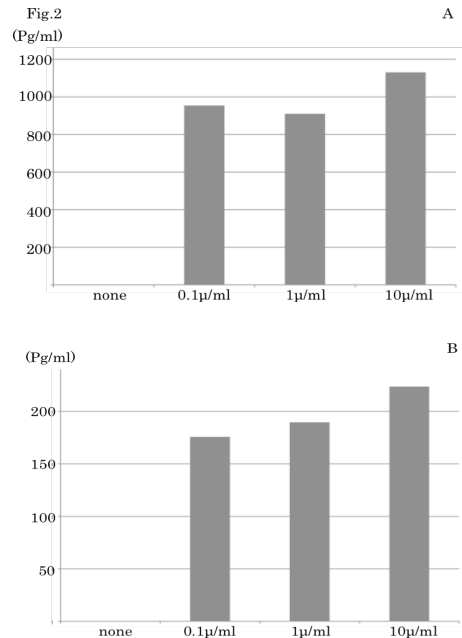


Fig. 2-A : IL-12 B: IL-23

(4) 抹消血を採取し、リンパ球分画を回収したのち、10ml ディッシュにて 1 時間培養し、附着細胞を単球として回収した。その後、E. coli LPS (1 μ/ml) の刺激にて 24 時間培養後、培養上清を回収し、-20 度にて保存した。培養上清中の IL-12 および IL-23 について、ELISA Kit を用いて解析した。

健常者 (C-1, C-2) 2 人と侵襲性歯周炎患者 (P-1) 1 人から採決し、結果を表 2 に示した。どのサンプルからも IL-12 と IL-23 産生を認めたが、サイトカインの産生量は個人差があり単純に比較できなかったため IL-12 と IL-23 の比率を求めた (IL-12/IL-23)。今回の結果では侵襲性歯周炎患者のサンプルからの比率が一番低かったが (表 2)、今後サンプル数を増やして検討する必要がある。

表2. IL-12 および IL-23 の産生量

	IL-12 (pg/ml)	IL-23 (pg/ml)	IL-12/IL-23
C-1	31.4±7.4	9.5±0.4	3.32
C-2	97.7±8.9	40.2±3.1	2.43
P-1	30.4±9.5	16.6±11.9	1.84

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

① 石原裕一、歯周病における IL-1 レセプターtypeII の働きについて、第 21 回日本歯科医学会総会、2008 年 11 月 15 日、横浜

② 田中繁寿、ある一卵性双生児において、片方のみ著しい歯周組織破壊を認めた症例、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 11 月 24 日、松本

〔図書〕(計1件)

①野口俊英、他、第一歯科出版、最新の歯周外科手術をマスターしよう！-基本から高度症例への応用まで-、2009、150(63-71)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 繁寿 (TANAKA SHIGEHIISA)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：30367619