

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593076

研究課題名(和文) インターロイキン22を用いた新しい歯周組織再生療法開発のための基礎的研究

研究課題名(英文) The effect of IL-22 on biological activity of periodontal ligament cells

研究代表者

大山 秀樹(Ohyama, hideki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90280685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：感染防御および組織破壊後の修復に深く関わるIL-22のリガンドであるIL-22レセプターが、歯根膜(PDL)細胞に高いレベルで発現する。PDL細胞は未分化間葉系幹細胞を含む細胞として歯周組織の修復の鍵を握る細胞であることから、IL-22がPDL細胞に対して誘導する生物学的効果を広く評価した。その結果、IL-22はPDL細胞の増殖に影響を及ぼさないが、石灰化物形成能を亢進させ、RUNX2、MSX2、オステオカルシンなどの石灰化に関わる因子の発現を増強することが明らかになった。IL-22はPDL細胞に対して石灰化を制御し、歯周組織の再生にかかわる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the biological effects of IL-22 on periodontal ligament (PDL) cells as part of studies to assess the involvement of IL-22 in periodontal disease. We found that IL-22 treatment had no effect on the proliferative response in PDL cells. Meanwhile, IL-22 precipitated mineralized nodule formation and induced gene expressions of RUNX2, MSX2 and osteocalcin in PDL cells, suggesting that IL-22 enhances the mineralized matrix-forming activities of PDL cells. In addition, the production of several cytokines including IL-11, IL-8 and CCL2 was upregulated by IL-22 treatment of PDL cells in a dose-dependent manner. IL-22 has the potential to promote mineralizing activity in PDL cells and to develop appropriate regenerative therapy.

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：歯根膜細胞 IL-22 石灰化誘導

1. 研究開始当初の背景

インターロイキン 22(IL-22)は、IL-10 ファミリーに属するサイトカインである。このサイトカインの最大の特徴は、リンパ球等の免疫担当細胞を標的細胞とするのではなく、主に上皮系・間葉系の器官構成細胞に作用して様々な機能を誘導することである。例えば、表皮角化細胞に対しては、抗菌ペプチドの産生、細胞の分化・増殖を、また肝細胞に対しては、細胞増殖、抗アポトーシス効果、さらには肝炎に対する抵抗性を誘導することなどがそれぞれ報告されている。IL-22 を産生する細胞は、主に活性化 CD4⁺メモリーT細胞および NK 細胞であるが、なかでも、IL-17 産生性のヘルパーT細胞(Th細胞)サブセットである Th17 細胞において、その産生性が高いことが知られている。Th17 細胞は、様々な免疫関連疾患の病態に関与することが報告されているが、Th17 が産生するサイトカインである IL-17 および IL-22 において、組織の炎症および自己免疫誘導に関わるサイトカインが IL-17 であるとされるのに対して、IL-22 はむしろ、種々の免疫関連疾患における防御機構、さらには組織破壊後の修復機構に深く関わるサイトカインであるとして捉えられている。

歯周病巣局所を対象とした研究において、申請者らは、1) Th17 細胞は歯周病巣、特に破壊を伴う病巣深部に存在すること、また 2) IL-17 の遺伝子発現が Th17 細胞の局在に比例して歯周病巣(特に病巣深部)において有意に高いことを明らかにした(Ohyama H, et al. J.Dent.Res., 2009)。以上の結果から、歯周病巣内における IL-22 遺伝子の発現レベルも IL-17 と同様に高いことが想定された。しかし、その後の我々の研究において、IL-22 遺伝子の発現は多くの被験歯周組織において検出できないか、検出できたとしても、その発現レベルは極めて低いといった作業仮説と相反する結果が得られた。同研究では同時に、1) IL-22 レセプター遺伝子の発現はほぼすべての被験歯周組織において高いレベルで検出されること、また 2) 歯周病細菌抗原反応性の末梢血由来 T 細胞の多くは、IL-22 産生能を有することについても明らかとなった。

以上のことから、「重度の歯周炎病巣は、病巣局所において IL-22 が充分産生されず

十分な防御および組織破壊後の修復が行われなかったために形成された」という仮説が考えられた。さらに我々は、IL-22 レセプターが歯周組織に発現すること、歯周組織を構成する上皮細胞、歯肉線維芽細胞に加え、歯根膜(Periodontal ligament: PDL)由来細胞(PDL細胞)も高いレベルで IL-22 レセプター分子を発現することを見出している。PDL細胞は未分化間葉系幹細胞を含む細胞として創傷治癒過程における歯周組織の修復の鍵を握る細胞であり、上述のように IL-22 が、種々の臓器において組織修復に関与すること、上皮細胞に作用して抗菌ペプチド産生を誘導すること等を考え併せると、PDL細胞に対する IL-22 の生物学的活性を明らかにすることによって、歯周組織再生療法における新たな展開が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、IL-22 を用いた新しい歯周組織再生療法の可能性を示すことの一環として、PDL細胞に対する IL-22 の生物学的活性を明らかにすることを目的とする。そのために、歯周組織再生に関わる基礎的性質である 1) 細胞増殖、2) 液性因子産生、および 3) 細胞分化を中心に IL-22 によって誘導される効果を広く評価する。

3. 研究の方法

(1) PDL細胞株の樹立

兵庫医科大学病院・歯科口腔外科を受診し、智歯の抜歯および矯正治療における便宜抜歯が行われる際にインフォームド・コンセントが得られた被験者を対象とした。抜去歯から PDL を採取し、Nishimura らの方法(J.Dent.Res., 1996)を一部改良して PDL細胞株を樹立した。10% FBS 含有 Dulbecco's modified Eagle 培地において継代培養を行うことによって細胞株を得た(倫理委員会承認済)。なお、研究には 5~8 回継代培養した細胞を用いた。

(2) IL-22 レセプター発現の評価

IL-22 レセプターは IL-22RA1 と IL-10R2 の 2 量体であることから、歯根膜組織および PDL細胞におけるそれぞれの遺伝子発現を PCR 法で確認し、さらに real-time PCR 法で定量した。また、ウエスタンブロット解析

によりタンパクレベルで評価した。さらに炎症性サイトカインである TNF- α , IL-1 β 存在下における IL-22 レセプター発現も同様に評価した。

(3) IL-22 が PDL 細胞の細胞増殖に及ぼす影響の評価

PDL 細胞を無血清培地で1日間培養後、様々な濃度の IL-22 存在下および非存在下で培養した。その後、³H thymidine 存在下で一定時間培養後、細胞を回収し、それぞれの ³H thymidine の取り込み量を測定することによって、IL-22 が PDL 細胞の細胞増殖に及ぼす影響を評価した。

(4) IL-22 が PDL 細胞の硬組織形成細胞分化に及ぼす影響の評価

PDL 細胞を石灰化誘導培地(50 μ g/ml アスコルビン酸, 10mM β -glycerophosphate, 100nM dexamethasone 含有)で培養し、石灰化物形成を評価した。石灰化形成は約10日後から25日後までのアリザリンレッド染色および破碎した細胞内外のカルシウム濃度の定量を行うことによって評価した。IL-22 を加えない系(#1), IL-22 を培養初期にのみ加える系(#2), IL-22 を培養期間中加える系(#3)でそれぞれ比較し、IL-22 の影響を評価した。

(5) IL-22 による PDL 細胞機能の変化に関わる遺伝子発現の評価

IL-22 存在下で培養を行うことによって、その影響を受けた PDL 細胞機能(細胞増殖および分化等)に関わる機序を明らかにするために、まず IL-22 存在下における PDL 細胞の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析を行った。すなわち、PDL 細胞を IL-22 存在下および非存在下において一定時間培養を行い、それぞれの条件下で発現する遺伝子を Agilent 社製 Whole Human Genome Microarray Kit を用いて網羅的に同定した。さらに、遺伝子解析チップの結果をもとに、IngenuityPathway Analysis (IPA) を行うことによって、想定される伝達系についての情報を得た。また、PDL 細胞の石灰化誘導および分化に関わることが知られている遺伝子について、その IL-22 存在下における石灰化誘導時の遺伝子発現量を real-time RT-PCR で定量的に評価した。

(6) 単クローン化した PDL 細胞における IL-22 の石灰化誘導に及ぼす影響の評価

PDL 細胞は複数の細胞亜群から構成される集団であることから、PDL 細胞株の限界希釈を行い、複数の PDL 細胞クローンを得た後、IL-22 による石灰化誘導への影響を上述の方法で評価した。

4. 研究成果

(1) IL-22 レセプター発現

歯根膜組織および樹立した PDL 細胞株において IL-22 レセプターの発現を遺伝子レベルおよびタンパクレベルで確認した。IL-22RA1 の発現は、炎症性サイトカインである TNF- α , IL-1 β 存在下において上昇すること、また両者が存在する場合さらに亢進することが明らかになった。(図1)

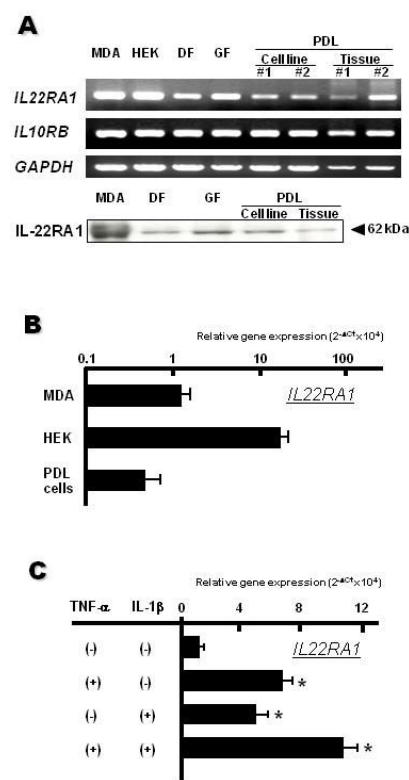


図1 IL-22 レセプター発現

(2) IL-22 による PDL 細胞の生物学的効果

IL-22 は PDL 細胞の細胞増殖に対して影響を及ぼさなかった。一方、培養初期に IL-22 が存在することによって PDL 細胞の石灰化物形成能を亢進させた(図2)。

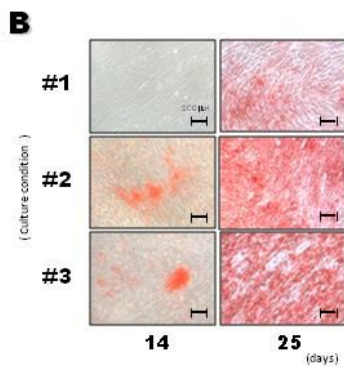
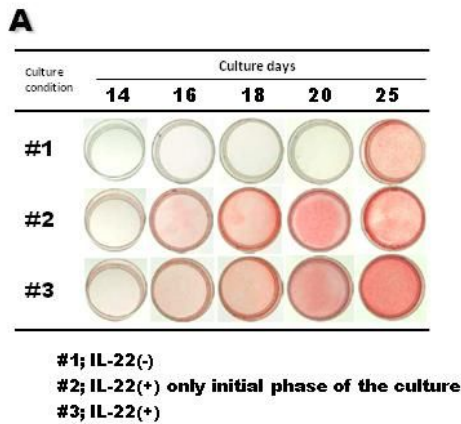


図2 IL-22による石灰化誘導

IL-22 存在下で発現が上昇する液性因子として、IL-11, IL-8, CCL2 の発現が著明に亢進していた(図3)。

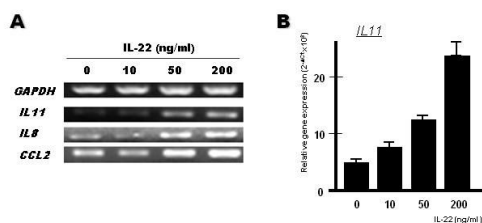


図3 IL-22によって発現亢進する液性因子

TNF- α 存在下において PDL 細胞の IL-22 レセプター発現が上昇すること、また炎症病巣局所における炎症性サイトカインの存在が IL-22 等の Th17 サイトカインの作用を修飾することが近年報告されたこと、さらに歯周病局所で TNF- α 濃度が上昇していることを考慮し、TNF- α 存在下における IL-22 刺激 PDL 細胞の生物活性を評価した。TNF- α は IL-22 による PDL 細胞の石灰化/ジュール形成促進を著しく阻害した。一方、CCL2 などのケモカイン遺伝子発現を促進した。

(3) IL-22 による PDL 細胞機能の変化に関わる遺伝子発現の評価

IL-22 存在下における PDL 細胞の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析の結果、IL-22 の刺激の有無によって発現が異なる遺伝子を多数特定した。得られた結果の IPA によって、その多くが細胞の分化、増殖および代謝に関わる遺伝子群あるいは感染防御に関わる遺伝子群であることが明らかになった。

PDL 細胞の石灰化誘導時に石灰化誘導および分化にかかわる遺伝子 *RUNX2*, *OCN*, *MSX-2* および *TNN* の発現が IL-22 存在下において石灰化誘導とともに上昇することが明らかになった(図4)。これらの因子が IL-22 による PDL 細胞の石灰化誘導促進に関わっている可能性がある。

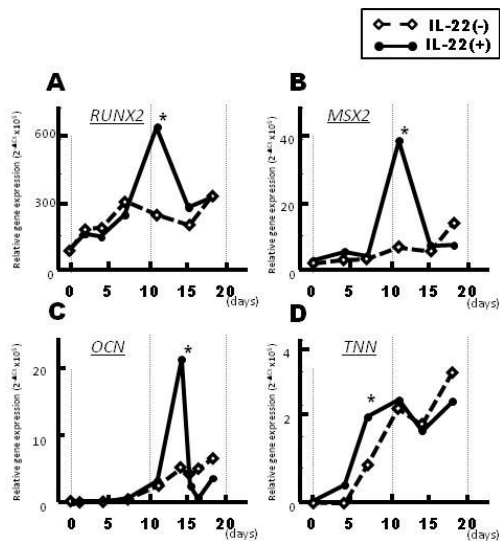


図4 IL-22 存在下における石灰化誘導時の各遺伝子発現

(4) 単クローン化した PDL 細胞における IL-22 による石灰化誘導の評価

遺伝子プロファイルの網羅的解析から IL-22 によって発現が誘導される遺伝子群の多くが細胞の分化、増殖に関わる遺伝子であることが明らかとなった。また、IL-22 が PDL 細胞の増殖に影響しないという上記の結果と併せて考えると、IL-22 は PDL 細胞に含まれる一部の細胞群に対してのみ細胞増殖および石灰化誘導の制御に関わっている可能性が考えられる。PDL 細胞は複数の細胞亜群から構成される集団であることから、単クローン化した PDL 細胞を用いて石灰化誘導に

おける IL-22 の影響を評価した。PDL 細胞株の限界希釈を行い、22 の PDL 細胞クローンを得た。IL-22 存在下あるいは非存在下において石灰化誘導培地で培養後 26 日目の石灰化物形成をアリザリンレッド染色にて評価した。半分の PDL クローン (11 クローン) において石灰化物形成が見られたが、残りの 11 クローンにはみられなかった (表 1)。石灰化物形成がみられた 11 クローンのうち 6 クローンは IL-22 存在下あるいは存在なしでも石灰化がみられたが、5 クローンは IL-22 存在下でのみ石灰化がみられた。IL-22 なしでのみ石灰化物形成がみられたクローンはなかった。これらの結果は、IL-22 が PDL 細胞株に含まれる一部の細胞群に対して石灰化の制御に関わっていることを示唆している。

Mineralized nodule formation		Number of PDL cell clones	Ratio (%)
Culture condition			
IL-22 (-)	IL-22 (+)		
+	+	6	27.3
-	+	5	22.7
+	-	0	0
-	-	11	50.0

表 1 PDL 細胞クローンにおける IL-22 による石灰化誘導の影響

以上の結果から、IL-22 は PDL 細胞の一部に対して石灰化を制御し、歯周組織の再生にかかわる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Yukitatsu Y, Hata M, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Nakasho K, Kojima Y, Oka H, Tsuzuki K, Sakagami M, Terada N., Decreased expression of VE-cadherin and claudin-5 and increased phosphorylation of VE-cadherin in vascular endothelium in nasal polyps., Cell Tissue Res. 査読あり 2013 Jun;352(3):647-57. doi: 10.1007/s00441-013-1583-0.

Ohyama H, Kato-Kogoe N, Takeuchi-Hatanaka K, Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, Matsushita S, Terada N., T-cell Responses Involved in the Predisposition to Periodontal Disease: Lessons from Immunogenetic Studies of Leprosy., J Clin Cell Immunol 査読あり 2012, S1: 005, doi:

10.4172/2155-9899.S1-005

Kato-Kogoe N, Nishioka T, Kawabe M, Kataoka F, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamamoto T, Nakasho K, Urade M, Terada N, Ohyama H., The promotional effect of IL-22 on mineralization activity of periodontal ligament cells., Cytokine., 査読あり 2012 Jul;59(1):41-8. doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.024.

〔学会発表〕(計 10 件)

川辺睦記, 浦出雅裕, 大山秀樹., IL-22 / TNF- α の単独および共刺激によって誘導されるヒト歯根膜由来細胞の生物学的活性., 第 67 回日本口腔科学会学術集会, 2013 年 5 月 23 日, 栃木県総合文化センター (栃木県)

大山秀樹., Th17 細胞産生性サイトカインが血管石灰化に及ぼす影響, 第 101 回日本病理学会総会, 2012 年 4 月 27 日, 京王プラザホテル (東京都)

大山秀樹., IL-22 がヒト歯根膜由来細胞の石灰化ノジュール形成に及ぼす影響, 第 54 回日本歯周病学会春季学術大会, 2011 年 5 月 28 日, 福岡国際会議場 (福岡県)

川辺睦記, IL-22 存在下においてヒト歯根膜由来細胞が発現する遺伝子の網羅的解析, 第 54 回日本歯周病学会春季学術大会, 2011 年 5 月 27 日, 福岡国際会議場 (福岡県)

〔図書〕(計 1 件)

Hideki Ohyama, "Leprosy-Science working towards dignity" Tokai University Press. 97-107 (2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 秀樹 (OHYAMA, Hideki)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90280685

(2) 研究分担者

寺田 信行 (TERADA, Nobuyuki)
兵庫医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号: 50150339

中正 恵二 (NAKASHO, Keiji)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00217712

山田 直子 (YAMADA, Naoko)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：10319858

山根木 康嗣 (YAMANEGI, Koji)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00434944

(3)連携研究者
該当なし