

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11383

研究課題名(和文)新規サイトカインIL-17Cから歯周炎病態形成メカニズムを探る

研究課題名(英文) Looking for a periodontal flame clinical condition formation mechanism from IL-17C.

研究代表者

伊藤 晴江 (Ito, Harue)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30397145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性辺縁性歯周炎の原因は歯周病原菌による細菌感染であるが、その病態形成には宿主側の免疫応答が関与していることが報告されている。これまでinterleukin(IL)-17について自己免疫疾患や炎症性疾患に関与していることが報告されている。今回このIL-17のファミリー分子の一つであるIL-17Cに注目し、歯周炎の病態形成への関与とその役割について解明を図った。ヒト歯肉上皮細胞においてIL-17CとそのレセプターであるIL-17REの遺伝子発現が認められ、また細菌性の抗原刺激によりIL-17Cの遺伝子発現の上昇が認められたことから歯周炎の病態形成にIL-17Cが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is caused by bacterial infection. However, the periodontal tissue destruction and alveolar bone resorption are caused by the host immune responses. Recently it has been reported that interleukin (IL)-17 has important role in autoimmune diseases and inflammatory diseases. Therefore, we focused on IL-17C which is one of the family molecules of IL-17, and attempted to clarify its involvement and role in the pathogenesis of periodontitis. We observed that the gene expression of IL-17C and IL-17RE which is its receptor, in human gingival epithelial cells. And the gene expression of IL-17C increased by bacterial antigen stimulation. This suggested that IL-17C is involved in the pathogenesis of periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 IL-17C

## 1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性歯周炎の原因は歯周病原菌による細菌感染である。しかしながらその病態の主軸をなす歯周組織破壊は宿主側の免疫応答によることが知られている。IL-17 は自己免疫疾患や炎症性の疾患に関与し、骨破壊への関与についても報告されている炎症性サイトカインである。歯周炎は炎症により歯槽骨吸収を伴う歯周組織破壊をおこす疾患であることから IL-17 が歯周炎の病態形成にも関与している可能性が考えられる。そこで申請者の所属するグループは IL-17 と歯周炎との関連について注目し以下報告を行ってきた。

・単核球を歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) で刺激したところ IL-17A の発現上昇を認めた (Oda et al., Oral Microbiol Immunol. 2003)

・歯肉炎と比較して歯周炎組織において IL-17A の遺伝子発現の上昇が認められた (Honda, Nakajima, Ito., et al. Clin Chim Acta. 2008)。

・歯周炎罹患組織中において IL-17A の発現が認められた。また歯周炎罹患患者の歯肉組織から樹立した CD4 陽性 T 細胞クローンは末梢血由来 T 細胞クローンよりも IL-17A の遺伝子発現率が高かった (Ito, Nakajima., et al. Oral Microbiol Immunol. 2005)

上述の報告から歯周炎の病態形成において IL-17 が関与している可能性が高いと考えられる。

IL-17 には IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E(IL-25), IL-17F の 6 つのファミリー分子が存在する。我々の報告も含め IL-17 についての報告の多くは IL-17A もしくは IL-17F に関するものであり他ファミリー分子についての報告は少なく、いまだ不明な点が多い。近年、マウスを用いた研究で IL-17 ファミリー分子の一つである IL-17C が細菌性刺激や炎症性サイトカイン刺激により上皮系細胞から特異的に産生されたとの報告がなされた。さらには IL-17C の受容体である IL-17RE が上皮系細胞に発現していることが報告された。これらの報告は IL-17C が感染や炎症性刺激により上皮系細胞から特異的に産生され、オートクライン的に上皮系細胞に作用することを示唆している。これらのことから感染防御の第一線で働くヒト歯肉上皮細胞においても IL-17C が重要な役割を果たし、歯周炎に関与していることが考えられる。

## 2. 研究の目的

歯肉上皮は物理的な刺激に対するバリアーとしての働きをもつとともに常に対峙している口腔内細菌およびその他の外来抗原に対する防御機構として自然免疫の誘導、さらには獲得免疫の発動を担う重要な歯周組織

である。その歯肉上皮細胞において IL-17C の産生誘導経路およびその生物学的機能を明らかにすることで歯周炎の病態形成のメカニズムのさらなる解明を図る。

## 3. 研究の方法

(1) 歯周組織における IL-17C 関連遺伝子およびタンパク発現の解析。

インフォームドコンセントを得たうえで、歯周炎患者より歯周外科手術時あるいは抜歯時に切除した歯周炎罹患組織を採取する。また、歯周炎以外の患者より歯周炎以外の理由による抜歯時に臨床的歯肉炎あるいは臨床的健康歯肉を採取する。

得られた組織から全 RNA を抽出し、通報に従い cDNA を合成する。特異的プライマーを用いた Real-time PCR 法により IL-17C, IL-17RA, IL-17RE とそれに関連する遺伝子発現を定量的に解析し、歯周炎と歯肉炎における発現量を比較する。

(2) IL-17C 産生誘導経路の検索

マウスにおいては Toll-like receptor (TLR) を介した細菌性の刺激により IL-17C 産生が誘導されることが報告されている。産生誘導経路解明のため、各種 TLR アゴニストを用いてヒト歯肉上皮細胞の刺激培養を行い、IL-17C 発現変動を解析する。IL-17C 産生を誘導する抗原を検索するとともに自然免疫応答への関与についても検討する。

(3) リコンビナント IL-17C の作成

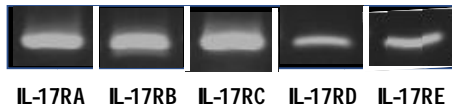
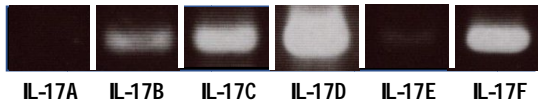
ヒト胎児由来腎臓細胞株 HEK293 に IL-17C 発現ベクターを用いて遺伝子を導入し、ヒト IL-17C 過剰発現細胞株を作製する。この細胞培養上清より IL-17C を精製し、ヒト歯肉上皮細胞を刺激する。刺激後の細胞における遺伝子発現に関して DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行い、生物学的活性の有無を確認する。生物学的活性の認められた遺伝子導入細胞株を培養して生物学的活性のあるリコンビナント IL-17C を作成する。

(4) IL-17C の生物学的作用の解明

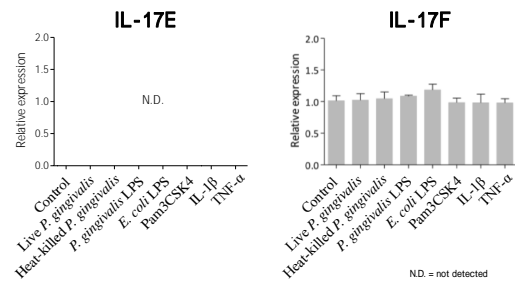
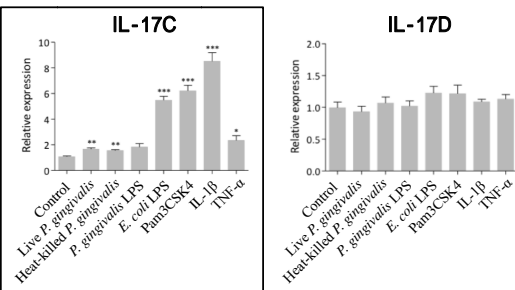
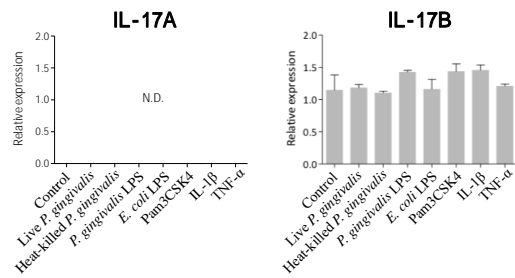
作成されたリコンビナント IL-17C を用いてヒト歯肉上皮細胞を刺激する。刺激により特異的に変動する遺伝子を抽出し、IL-17C 受容体下流のシグナリングによる遺伝子発現誘導経路を解明する。アレイ解析により IL-17C との関連が示唆された遺伝子に関しては、siRNA による IL-17RA, IL-17RE ノックダウン時の発現変動を解析し、IL-17C との関連性を再検討する。

## 4. 研究成果

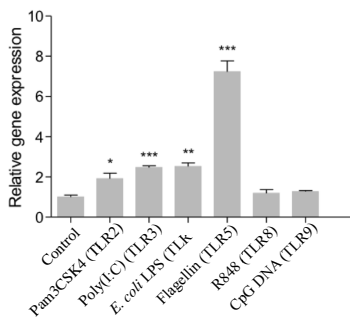
(1) 未刺激時のヒト歯肉上皮細胞において IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17F および全ての IL-17R ファミリーの遺伝子発現が発現が認められた。



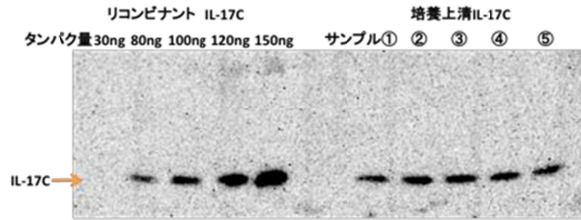
また、各種抗原刺激により遺伝子発現を検索したところヒト歯肉上皮細胞において IL-17 ファミリーのうち IL-17C のみが細菌抗原刺激や炎症性サイトカインに反応してその発現が上昇することを確認した。



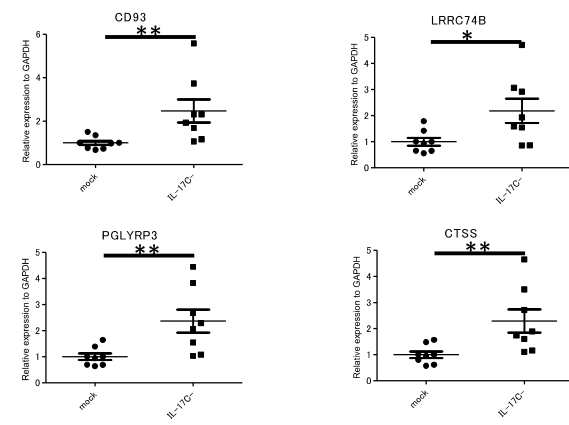
(2) ヒト歯肉上皮細胞において TLR2, 3, 4, 5 リガンド刺激により IL-17C の遺伝子発現の上昇をみとめた。



(3) IL-17C 過剰発現上皮細胞株を作成した。培養上清中に IL-17C タンパクが産生されていることを確認した。

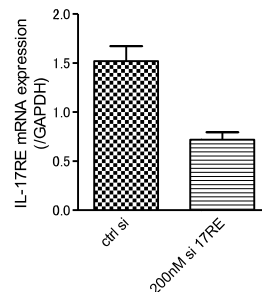


その培養上清を用いてヒト歯肉上皮細胞を刺激したところ 4 つの遺伝子発現に優位な変化をみとめた。



Mann-Whitney-U test: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01

(3) SiRNA を用いてヒト歯肉上皮細胞における IL-17RE のノックダウンを行った。これまでのところヒト歯肉上皮細胞において IL-17C のレセプターである IL-17RE がノックダウンされたところまで確認している。今後この細胞を IL-17C を含む培養上清を用いて培養し、先に認められた遺伝子発現の変動に変化が出るか確認する予定としている。



ヒト歯肉上皮細胞には IL-17C とそのレセプターである IL-17RE が発現していること、細菌抗原刺激により IL-17C の遺伝子発現が上昇したこと、TLR2,3,4,5 リガンド刺激により IL-17C の遺伝子発現が上昇したことから歯肉上皮細胞においても IL-17C が自然免疫応答に機能している可能性があることが示唆された。

## 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1件)

Nakajima T, Okui T, Ito H, Nakajima M, Honda T, Shimada Y, Tabeta K, Akazawa K, Yamazaki K: Microbiological and Clinical Effects of Sitafloxacin and Azithromycin in Periodontitis Patients Receiving Supportive Periodontal Therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Jan 4;60(3):1779-87. (査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

山崎恭子, 中島貴子, 高橋直紀, 宮沢春菜, 皆川高嘉, 佐藤圭祐, 伊藤晴江, 山崎和久: 歯周炎患者腸内細菌叢における口腔内由来細菌の比率. 第147回日本歯科保存学会秋季学術大会, 盛岡, 2017年10月27日, プログラムおよび講演抄録集: 88頁, 2017.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 晴江 (ITO HARUE)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 30397145

(2)研究分担者

中島 貴子 (NAKAJIMA TAKAKO)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号: 40303143