

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20416

研究課題名(和文)低酸素シグナルによるT細胞分化調節を介した歯周病増悪メカニズムの解明

研究課題名(英文) Research on mechanism of periodontitis exacerbation via regulation of T cell differentiation by hypoxia signal

研究代表者

堀部 寛治 (Horibe, Kanji)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70733509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯周病の増悪と発生に低酸素誘導因子(HIF)、炎症性サイトカインIL-17とその産生細胞であるTh17の関係性に着目して策定したものである。

実験方法はマウスの上顎の大臼歯に絹糸を結紮することで歯周病発生を誘導するモデルを採用して行った。歯槽骨破壊の起きた歯周組織を免疫組織学的にHIF、IL-17、T細胞の局在を検討したが、健常歯肉組織と比較して明確な差は認められなかった。リアルタイムPCRではIL-17の遺伝子発現は上昇傾向を示した。また、IL-17AおよびIL-17Fのそれぞれの遺伝子欠損マウスと野生型マウスでは歯槽骨の破壊量に差はなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the relationship between hypoxia-inducing factor (HIF) and inflammatory cytokines IL-17 and Th17 in the onset and deterioration of periodontitis.

The experiment was carried out by adopting a model that induces the occurrence of periodontitis by ligating the silk thread to the molar of the upper jaw of the mouse. We examined the localization of HIF, IL-17, T cells immunohistologically on the periodontal tissue in which alveolar bone destruction occurred, but no clear difference was found compared with healthy periodontal tissue. Gene expression of IL-17 in periodontitis showed an upward trend in real time PCR. There was no difference in the amount of alveolar bone destruction in IL-17A and IL-17F gene-deficient and wild-type mice, respectively.

研究分野：組織学

キーワード：歯学 歯周病 免疫細胞 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周組織に強い炎症反応を伴い、歯槽骨の破壊、最終的には歯の脱落を引き起こす。歯周病によって引き起こされる機能喪失は、不可逆的である。そのため、歯周病の罹患防止、増悪の抑制は Quality of Life (QOL) の維持において非常に重要な課題である。歯周病は細菌成分による組織破壊、そしてそれによって刺激された宿主の組織や免疫細胞による炎症反応によって組織破壊が増悪する多因子性に進行する疾病である。我々は、炎症性のヘルパーT細胞(Th)である Th17 と、それが産生する炎症性のサイトカイン IL-17、そして様々な遺伝子の転写活性を制御するタンパク質、低酸素誘導性因子(hypoxia-inducible factor: HIF)の歯周病における関連を着目し、歯周病悪化のメカニズム解明を目的に本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

創傷や疾病にさらされている組織では一過性、または慢性的に低酸素の状態に陥る場合がある。低酸素ストレスに対して細胞は転写因子として機能するHIFの活性化を誘導する。HIFによる転写活性はHIF-1 $\alpha$ サブユニットとHIF-1 $\beta$ サブユニットのヘテロダイマーが標的遺伝子上流に存在するhypoxia-response element (HRE) に結合することで誘導される。HIFは様々な遺伝子の発現を誘導し、細胞・組織の糖代謝、血管新生、pH調整、増殖などを調節することで、低酸素環境に適応するように作用する。HIFは低酸素環境下での免疫細胞の浸潤、炎症反応の亢進についても密接に関与しており、様々な炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導することが知られている。Hif-1はヘルパーT細胞のTh17細胞の分化とIL-17産生を主要調節因子であるRAR-related orphan receptor (ROR)  $\gamma$  t と協調することで促進させることが示唆されている。IL-17は、細菌感染にたいして好中球の浸潤やB細胞の活性化を促し、免疫反応を活性化させることで感染防御に寄与する。一方でIL-17はTNFやIL-6などの炎症性サイトカイン産生を促し、炎症反応を亢進させてしまう。リウマチなどの関節炎の研究ではIL-17は炎症発生・増悪、そして骨破壊の重要な因子であることが知られている。また、歯周病においてもIL-17による歯肉組織での炎症亢進が病態悪化に関与することが示唆されている。実際に、重篤な歯周病患者の歯周組織や歯肉溝滲出液でのIL-17のレベルが上昇していることが報告されている。

我々の研究では、歯周病における炎症反応の増悪にTh17およびIL-17、そしてHIFによる関与を解明することを目的に研究計画を策定した。

## 3. 研究の方法

(1) 歯周病下でのマウス歯周組織の組織学的・免疫組織学的検討

野生型マウスの上顎右側第二臼歯に絹糸を結紮させることで、歯面へのプラーク沈着を促進させ歯周病を誘導させる歯周病モデル実験を行った。絹糸の結紮から一週間後に上顎骨サンプルを回収した。この際、歯面に絹糸が残留していないものは除外した。サンプルを4%パラホルムアルデヒドでの固定、10% EDTA 溶液による脱灰処理後、パラフィンブロック・切片を作成した。その後、H・E染色、TRAP染色による歯周組織の組織学的検討、またT細胞マーカーである抗CD4抗体、抗IL-17抗体、抗HIF-1抗体を用いて免疫組織学的に歯周病歯周組織におけるT細胞・HIF陽性細胞の局在を確認した。

(2) 歯周病モデルマウスの歯周組織におけるIL17遺伝子発現解析

マウスの上顎両側第二臼歯に絹糸結紮による歯周病を誘導する。一週間の絹糸結紮後に上顎第二臼歯の歯肉粘膜および歯槽骨を回収、リアルタイムPCR解析を行い、歯周組織におけるIL-17AおよびIL-17FのmRNA発現レベルの解析を行った。

(3) IL17 Knockout マウスを用いた歯周病誘導実験

野生型マウスおよびIL-17 family であるIL-17AおよびIL-17Fの遺伝子をそれぞれ単独で欠失させた遺伝子改変マウスの上顎第二臼歯に対して絹糸結紮による歯周病誘導を行い、一週間後に骨吸収量をマイクロCT撮影装置を用いて計測した。骨吸収量の評価は、同一マウスの右側(絹糸結紮側)と左側(非結紮側)でそれぞれ上顎第一・第二臼歯頰側部の各点におけるセメントエナメル境(CEJ: Cement Enamel Junction)と歯槽骨頂(ABC: Alveolar Bone Crest)間の距離(CEJ-ABC Distance)を計測し、絹糸結紮側誘導側と非結紮側の差を歯槽骨吸収量とした。

## 4. 研究成果

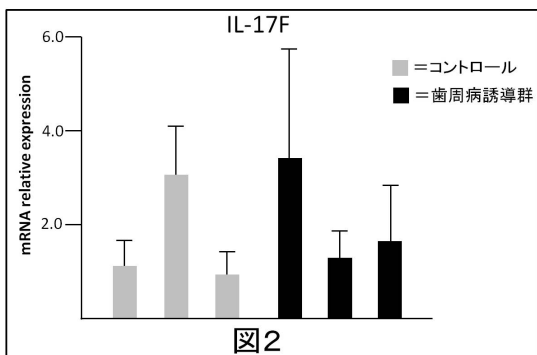
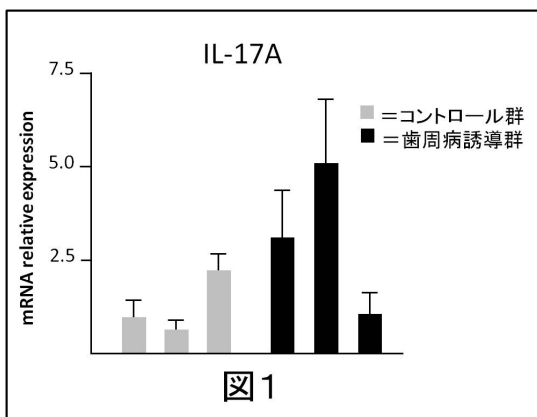
(1) 歯周病下でのマウス歯周組織の組織学的・免疫組織学的検討

絹糸結紮による歯周病誘導を行ったマウスの上顎第二臼歯の歯槽骨をH・E染色による組織学的検討を行ったところ、コントロールの非結紮群と比べて歯槽骨頂の高さが著しく低くなっており骨破壊が進行していることが判明した。それは、TRAP染色によりTRAP陽性の破骨細胞が歯槽骨表面に増加していたことも明らかであった。しかし、抗CD4抗体、抗IL-17抗体による免疫組織学的検討を行ったところ、CD4陽性のT細胞およびIL-17陽性細胞は歯周病群の歯周組織では、局在なし、もしくは1~2個程度の局在しか認められなかった。これはコントロール群と同様の結果であった。歯周病下の歯周組織でのT細胞浸潤は今回の実験では見出すことはできなかった。また、HIF-1陽性細胞に関しては、

歯周病群、コントロール群ともに細胞数のばらつきが大きく、歯周病発生との関連性を見出すことはできなかった。

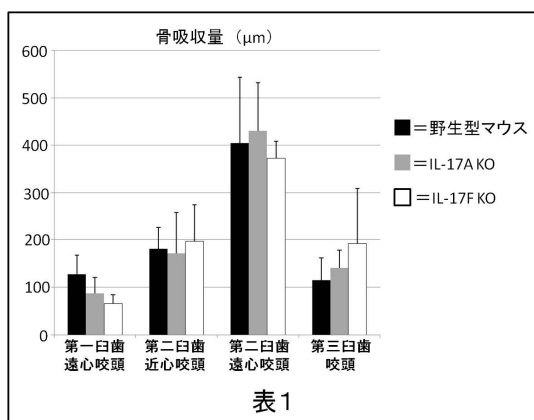
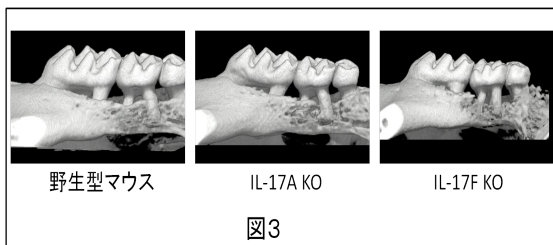
## (2) 歯周病モデルマウスの歯周組織における IL17 遺伝子発現解析

歯周病誘導後の歯周組織における IL-17 mRNA 発現レベルの比較を、健全なマウスの歯周組織との発現レベルを比較したところ、IL-17A は歯周病誘導群の歯周組織で発現レベルの上昇傾向は認められた。しかし、発現レベルは個体差が大きく、コントロールであっても歯周病を誘導したサンプルよりも IL-17 mRNA 発現が高いものも確認された。(図1) また、IL-17F は歯周病による発現上昇は認められなかった。(図2)

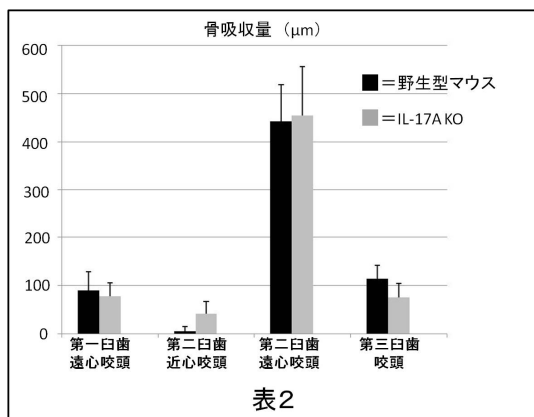
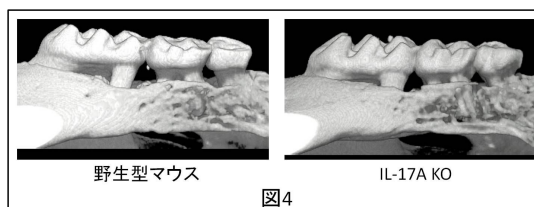


## (3) IL17 Knockout マウスを用いた歯周病誘導実験

8週齢の野生型マウス、IL-17A KO、IL-17F KO マウスにそれぞれ絹糸結紮による歯周病を誘導し、骨吸収量の差を比較した。事前の予測とは異なり、野生型マウスと IL-17A と F それぞれの KO マウスは、同程度の骨吸収を示した。(図3、表1)



また、今回の実験期間中にマウスの歯肉組織では IL-17A の発現レベルは加齢とともに増加し、炎症反応が進むという報告が出たことから、加齢により野生型マウスと IL-17A KO マウスで歯槽骨吸収に対する反応性が異なるかを検討するために、それぞれ6ヶ月齢で絹糸結紮による歯周病誘導実験を行った。しかし、有意な差は認められなかった。(図4、表2)



本研究結果から炎症性サイトカインの IL-17A および IL-17F はそれぞれ単独の欠失では炎症性の歯槽骨吸収を抑制することができず、相補的に作用していることが示唆された。それは、歯肉における IL-17A 発現量が増加する加齢マウスでも同様であった。このことから、IL-17 を歯周病の治療標的とする場合は広範な IL-17 family を対象とすることが重要であると考えられる。

## 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0件)

〔図書〕(計0件)

〔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

堀部 寛治 (HORIBE, Kanji)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70733509