

令和元年6月6日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06896

研究課題名（和文）根尖性歯周炎におけるIL-35による炎症制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of inflammation control mechanism by IL-35 in apical periodontitis

研究代表者

進藤 智（Shindo, Satoru）

広島大学・病院（歯）・助教

研究者番号：90806093

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では根尖歯周組織構成細胞の一つであるヒト歯根膜細胞を用いて、根尖性歯周炎において骨吸収に関与しているTh17細胞が産生するIL-17Aが誘導するIL-6およびIL-8産生に与える抗炎症性サイトカインIL-35の影響を明らかとすることを目的に実験を行った。その結果、IL-35はERKおよびNF- κ B p65リン酸化を阻害することでIL-17Aが誘導するヒト歯根膜細胞からのIL-6およびIL-8産生を抑制することが明らかとなった。これらのことから、IL-35はTh17細胞が誘導する根尖性歯周組織破壊を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、根尖性歯周炎における免疫応答メカニズムが明らかとなりつつある。しかしながら、根尖歯周組織構成細胞における制御性T細胞が産生する抗炎症性サイトカインであるIL-35の影響に関しては報告がない。本研究でIL-35がIL-17Aが誘導するヒト歯根膜細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制することを明らかとした。このことは、根尖性歯周炎病変における新たな炎症制御機構の発見となった。すなわち、根尖性歯周炎に対するIL-35を応用した新たな治療法の開発への橋渡し研究へと引き継がれ、国民ならびに社会への貢献も大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, We examined the effect of IL-35 on IL-6 and IL-8 production from IL-17A-stimulated human periodontal ligament cells. In the results, IL-35 inhibited IL-6 and IL-8 production from IL-17A-stimulated human periodontal ligament cells through suppression of ERK and NF- κ B p65 phosphorylation. These results suggested that IL-35 might inhibit progression of periapical periodontitis by IL-17A.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：根尖性歯周炎 Th17細胞 破骨細胞 IL-17A 制御性T細胞 IL-35

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎の発症および進行には免疫担当細胞と根尖歯周組織構成細胞の相互作用によってさまざまな炎症性物質を産生し破骨細胞の活性化を引き起こし歯槽骨吸収といった炎症性の破壊を惹起する。炎症性サイトカインであるIL-6は破骨細胞を活性化し骨吸収に関与することが報告されている。また、IL-8はCXCケモカインの一種であり、好中球をはじめとする白血球を炎症局所に浸潤・集積させる事により根尖歯周組織破壊に関与している事が示唆されている。分子生物学研究の発展により組織破壊に関わる宿主の免疫応答に関する病態解明がなされつつある近年、Th17 型ヘルパーT 細胞(Th17 細胞)が関節リウマチなどの炎症性疾患において interleukin-17A (IL-17A)を介して周囲の細胞のRANKL 発現を誘導し破骨細胞を活性化し、さらにTh17細胞自身がRANKL を高発現しており直接破骨細胞の活性化に関与していることが明らかとなっている。(Takayanagi ら, Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci .83(5):136-43,2007) 根尖性歯周炎病変局所においてもTh17細胞の浸潤およびIL-17Aが発現していることが報告されており、骨吸収の増悪に関与している可能性が考えられる。(Yang ら, J Endod. 40(1):56-62, 2014) 制御性T細胞(T reg)は免疫応答の抑制的制御や免疫の恒常性維持で重要な役割を果たしていることが知られている。根尖性歯周炎組織中にT regが存在していることがすでに報告されている(Colić Mら, J Dent Res.88(11):997-1002,2009)。近年、T regが産生する新たな抗炎症性サイトカインである interleukin-35(IL-35)が発見され、IL-35 がTh17細胞の増殖や活性化を抑制することが明らかとされている。(Niedbala W ら, Eur J Immunol.37(11):3021-9, 2007) しかし、根尖性歯周炎におけるIL-35の役割については不明な点が多い。また、根尖歯周組織構成細胞におけるIL-17AとIL-35の相互作用に関する報告は今のところない。

2. 研究の目的

本研究ではT regが産生する抗炎症性サイトカインであるIL-35が根尖性歯周炎における炎症反応を制御していると仮定し、根尖歯周組織構成細胞であるヒト歯根膜細胞におけるIL-17Aによって誘導されるIL-6およびIL-8産生に与えるIL-35の影響をシグナル伝達機構の詳細も含めて明らかとすることを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(1)HPDLC は Lonza 社より購入し、10%FBS を含む α -MEM 培地において 37℃、5%CO₂ 存在下のインキュベーター内で培養した。HPDLC は 5 継代から 10 継代のものを実験に用いた。

(2) (1)の条件で培養した HPDLC を IL-17A 存在下で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、ELISA 法にて IL-6 および IL-8 濃度を測定した。また、IL-35 およびシグナル伝達阻害物質 (SB2035080 : p38 MAPK inhibitor、SP600125:JNK inhibitor、PD98059:ERK inhibitor、SC514: NF- κ B inhibitor)存在下における IL-17A が誘導する IL-6 および IL-8 産生量を ELISA 法にて測定した。

(3) (1)の条件で培養した HPDLC を IL-17A または IL-35 単独刺激、あるいは IL-17A および IL-35 共刺激で 30 分、60 分で刺激した後、タンパク質を回収した。その後 western blot 法にて、

p38 MAPK、ERK、JNK および NF- κ B のリン酸化を解析した。

4 . 研究成果

(1) IL-35 が IL-17A 刺激 HPDLC の IL-6 および IL-8 産生に与える影響 : IL-17A 刺激により誘導された IL-6 および IL-8 産生は IL-35 により優位に抑制された。

(2) IL-17A が誘導する HPDLC における IL-6 および IL-8 産生に関するシグナル伝達経路の解析 : IL-17A によって誘導された IL-6 および IL-8 産生を SB2035080、PD98059 および SC514 が抑制した。すなわち、HPDLC において IL-17A が誘導する IL-6 および IL-8 産生には p38 MAPK、ERK および NF- κ B が関与していることが明らかとなった。

(3) IL-35 が IL-17A 刺激により活性化されるシグナル伝達経路に与える影響 : IL-17A 刺激により p38 MAPK、ERK および NF- κ B のリン酸化が誘導された。IL-35 によって ERK および NF- κ B のリン酸化が抑制された。

今回の結果より、IL-17A 刺激による IL-6、IL-8 産生が HPDLC に誘導されることで、歯周炎病変局所において破骨細胞活性化による歯槽骨吸収、ならびに好中球の遊走を引き起こす可能性が示された。また、IL-35 は NF- κ B および ERK を介するシグナル伝達経路を阻害することにより、IL-17A 刺激 HPDLC の IL-6 および IL-8 産生を抑制する事が明らかとなった。この結果より、制御性 T 細胞が産生する IL-35 は Th17 が産生する IL-17A によって促進される HPDLC からの IL-6 および IL-8 産生を抑制することで破骨細胞活性化および好中球の浸潤を制御し、歯周炎における炎症性骨吸収を制御している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Shindo S., Hosokawa Y., Hosokawa I., Shiba H. Interleukin (IL)-35 suppresses IL-6 and IL-8 production in IL-17A-stimulated human periodontal ligament cells:: Inflammation,1-6 頁(2018年) 査読あり doi: 10.1007/s10753-018-0938-9

Ishii T, Ruiz-Torruella M, Ikeda A, Shindo S, Movila A, Mawardi H, Albassam A, Kayal R. A, Al-Dharrab A. A, Egashira K, Wisitrasameewong W, Yamamoto K, Mira A. I, Sueishi K, Han X, Taubman M. A, Miyamoto T, Kawai T.: OC-STAMP promotes osteoclast fusion for pathogenic bone resorption in periodontitis via up-regulation of permissive fusogen CD9. The FASEB Journal, 32 巻 4016-4030 頁 (2018年) 査読あり doi: 10.1096/fj.201701424R.

Hosokawa Y., Hosokawa I., Shindo S., Ozaki K., Matsuo T.. Gomisin N Decreases Inflammatory Cytokine Production in Human Periodontal Ligament Cells. Inflammation. 40 巻 360-365 頁 (2017年) 査読あり doi: 10.1007/s10753-016-0482-4.

Hosokawa Y., Hosokawa I., Shindo S., Ozaki K., Matsuo T..IL-29 Enhances CXCL10 Production in TNF- α -stimulated Human Oral Epithelial Cells. Immunological Investigation. 46 巻 615-624 頁, (2017 年) 査読あり doi: 10.1080/08820139.

〔学会発表〕(計 11 件)

Satoru Shindo, Hideki Shiba. IL-35 suppressed IL-6 and CXCL10 productions in TNF- α -stimulated human periodontal ligament cells. 7th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2018

進藤 智、西藤法子、中西 惇、吉田和真、小武家誠司、本山直世、永安慎太郎、柴 秀樹:Semaphorin3A は TNF-a 刺激ヒト歯髄細胞の IL-6 および CXCL10 産生を抑制する：第 148 回日本歯科保存学会 2018 年度春季学術大会(横浜), 2018.

西藤法子, 進藤 智, 平田-土屋志津, 中西 惇, 吉田和真, 柴秀樹: ヒト歯髄細胞の炎症性サイトカイン発現に及ぼす Semaphorin7A の影響：第 39 回日本歯内療法学会学術大会(福岡), 2018

Satoru Shindo, Hideki Shiba. Semaphorin3A inhibits IL-6 and CXCL10 production from TNF- α -stimulated human dental pulp cells. IADR general session, London, England, 2018

西藤法子, 進藤 智, 平田-土屋志津, 中西 惇, 吉田和真, 本山直世, 柴 秀樹: Semaphorin7A は炎症時の歯髄細胞から炎症性サイトカインの分泌を促進する：第 149 回日本歯科保存学会 2018 年度秋季学術大会(京都), 2018.

本山直世、森田克也、永安慎太郎、平田-土屋志津、西藤法子、進藤 智、柴 秀樹、土肥俊博:血小板活性化因子(PAF)合成酵素 LPCAT2 阻害薬の難治性疼痛の発症と維持における役割第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会(京都), 2018.

進藤 智、吉田和真、中西惇、西藤法子、永安慎太郎、本山直世、柴 秀樹: IL-35 は IL-17A が誘導するヒト歯周靭帯細胞の IL-6 および IL-8 産生を抑制する：第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会(京都), 2018

小武家誠司, 永安慎太郎, 進藤 智, 柴 秀樹: 3 根管を有する下顎左側第一小白歯に対して感染根管治療を行った一症例：平成 30 年度中国・四国地区歯科医学大会(広島), 2018 .

進藤 智, 西藤法子, 柴 秀樹: Semaphorin3A は TNF-a 刺激ヒト歯髄細胞の IL-6 および CXCL10 産生を抑制する：平成 30 年度中国・四国地区歯科医学大会(広島), 2018 .

小園知佳, 應原一久, 北川雅恵, 小川郁子, 進藤 智, 西藤法子, 芥川桂一, 中岡美由紀, 水野智仁, 藤田 剛, 柴 秀樹, 栗原英見: 根尖性歯周炎の起炎菌の同定と抗菌薬感受性：平成 30 年度中国・四国地区歯科医学大会(広島), 2018

進藤 智、細川義隆、細川育子、尾崎和美、柴 秀樹、松尾敬志: IL-35 は TNF- が誘導するヒト歯根膜細胞の IL-6 および CXCL10 産生を抑制する、第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会(盛岡)、2017

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。