

令和元年6月11日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07218

研究課題名（和文）IL-35が歯肉上皮細胞に与える影響

研究課題名（英文）Effect of IL-35 on gingival epithelial cell

研究代表者

岡田 康佑（kosuke, okada）

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：00805343

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）：ヒト歯肉上皮癌株化細胞であるCa9-22細胞を用いて、歯周病病態を再現するため Porphyromonas gingivalis由来リポ多糖体（LPS）刺激を行い、IL-35を添加した。結果、LPSで刺激したことにより上昇した炎症性サイトカインの遺伝子発現がIL-35により抑制された。しかしながら本研究ではタンパク質産生での有意な差は検出されなかった。今後さらなる検討が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の歯周病治療は、細菌除去が主目的として行われ、宿主の免疫機構による組織の治癒・再生・修復を獲得するものである。他の医学分野ではサイトカイン療法をはじめとした免疫療法が行われているが、歯周治療の分野では再生療法でのみサイトカインを用いた手法があるだけにすぎない。そこで、歯周病治療における免疫療法を模索する研究として、本研究を行い、将来の歯周病治療さらにはリウマチ性疾患のような慢性の炎症性疾患の治療にフィードバックすることを目標とする。本研究により、歯周病のメカニズムの解明の一助となるばかりでなく、将来的にはサイトカイン療法等の免疫療法開発の一助となると考える。

研究成果の概要（英文）：Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide (LPS) stimulation was performed to reproduce periodontal disease using Ca9-22 cells, which are human gingival epithelial cancer cell lines, and IL-35 was added. This result, gene expression of inflammatory cytokines elevated by LPS stimulation was significantly suppressed by IL-35. However, no differences in protein production were detected in this study. Further studies are required to confirm effect of IL-35.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 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

歯周病は、歯周病原細菌感染を引き金に、宿主の過剰な免疫応答により、歯周組織の破壊を引き起こし、最終的には歯の喪失をきたす慢性炎症性疾患である(Heath et al. *Calcif Tissue Int.* 1985, Listgarten et al. *J Periodontal Res.* 1987)。その中で、歯肉上皮細胞は生体防御の最前線であり、歯周病原細菌の菌体成分や代謝産物の刺激により、IL-1、IL-6、IL-8を含む炎症性サイトカインを産生し、マクロファージやリンパ球を含めた免疫細胞、破骨細胞や線維芽細胞を活性化することで上皮の付着破壊や、歯槽骨吸収を引き起こし、歯周病病態の進行に関与していることが知られている(Lundqvist et al. *J Immunol.* 1994, Sandros et al. *J Dent Res.* 2000)。

制御性 T (Treg) 細胞より産生される新規の抗炎症性サイトカインである IL-35 は、Epstein-Barr virus-induced gene 3 (Ebi3)と IL-12 のサブユニットである p35 のヘテロダイマーであり(Collison et al. *Nature.* 2007)、その受容体は IL-12R β 2 と gp130 という 2 つのタンパクによって構成されると考えられている(Vignali et al. *Nat Immunol.* 2012)。また、Foxp3 を発現しない IL-35 産生性の iT_{R35} が見いだされるなど(Collison et al. *Nat Immunol.* 2010)、免疫制御において非常に注目されている。さらに、IL-35 が Th17 細胞分化を抑制し、コラーゲン誘導性関節炎を抑制することや(Niedbala et al. *Eur J Immunol.* 2007)、慢性関節リウマチ患者において血清中 IL-35 濃度が低い患者ほど症状が重度であること (Nakano et al. *Rheumatology.* 2015)が報告されており、慢性炎症性疾患において、過剰な炎症反応を制御し、組織破壊の抑制に関与しているのではないかと考えられている。また、申請者のグループは歯周病患者において健常者と比較し、歯肉溝滲出液中の IL-35 濃度が有意に増加しており、歯周病の重症度と正の相関を示すことを報告している (Mitani et al. *J Periodontol.* 2015)。このことから IL-35 は、歯周病病態においては過剰な炎症に反応して産生され、歯肉溝滲出液等を介して歯肉上皮細胞に何らかの影響を与えているのではないかと考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病病態において IL-35 が歯肉上皮細胞に対して炎症性サイトカインの産生を抑制し、歯周病病態における過剰な炎症反応の制御に影響をおよぼしているかを検討した。

3. 研究の方法

IL-35 が歯肉上皮細胞に与える影響を確認するために、ヒト歯肉上皮癌株化細胞である Ca9-22 細胞を用い、組織学的解析を行う。具体的には、培養した Ca9-22 細胞に *P. gingivalis* 由来 LPS および rIL-35 を添加し、共培養後、回収する。回収した細胞を用いて RT-PCR を行い遺伝子発現の検討、細胞上清を用いて ELISA 法にてタンパク質産生の検討を行う。

4. 研究成果

Ca9-22 細胞に *P. gingivalis* 由来の LPS 刺激を行うことにより、歯周病病態を再現した。結果は、炎症性サイトカインである IL-8、IL-6、TNF- α の遺伝子発現が有意に上昇した。また、LPS と rIL-35 を添加することにより LPS 単独刺激をした群と比較して、IL-8、IL-6、TNF- α の遺伝子発現が有意に低下した。(図 1-3)

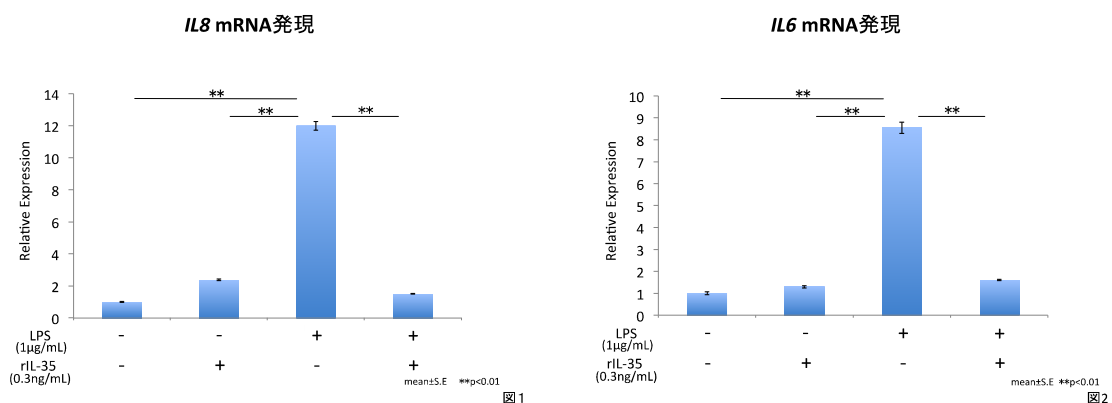
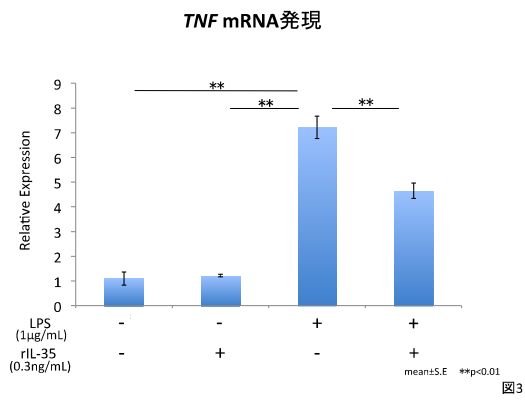
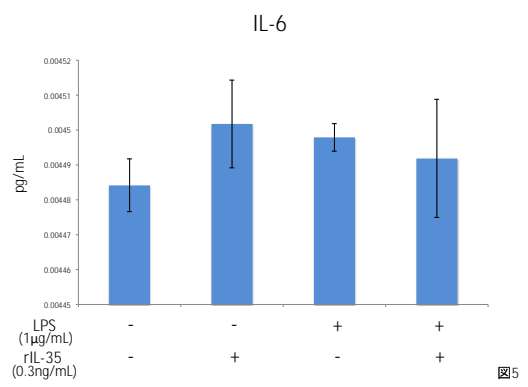
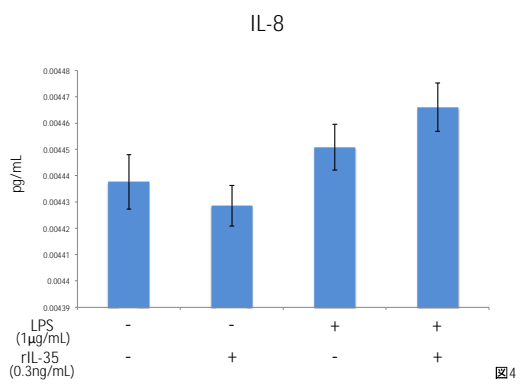


図1

図2



しかしながら、ELISA 法にてタンパク質産生を検討したところ、LPS 単独刺激をした群および LPS と rIL-35 を添加した群で比較したときに有意な差は認められなかった。(図 4-5)



5 . 主な発表論文等

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：菊池 毅、後藤 久嗣

ローマ字氏名：KIKUCHI Takeshi、GOTO Hisashi

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。