

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10470

研究課題名(和文) 免疫制御を応用した新規歯周病予防法の開発

研究課題名(英文) The development of a new preventive method for periodontitis by immune regulation

研究代表者

佐藤 武則 (Sato, Takenori)

神奈川県立歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40638904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は歯周病の進行に關与するIL-17に対する特異抗体(抗IL-17抗体)を用いて、歯周病原細菌の増殖と歯槽骨吸収の抑制効果について検討した。その結果、抗IL-17抗体は歯周病原細菌の増殖を抑制したほか、歯肉の炎症に關わる好中球と、歯槽骨吸収を行う破骨細胞の減少が認められ、抗IL-17抗体投与が歯周組織の炎症抑制につながると示唆された。したがって本研究で用いた抗IL-17抗体は歯周病予防に貢献するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗IL-17抗体が歯周病原細菌の感染抑制と歯周組織への炎症波及の軽減につながれば、歯周病予防に貢献するものと考えられる。また歯周病が全身疾患と關連性と深くIL-17の關与が指摘されている事から、本研究成果は口腔と全身の免疫力向上による健康増進につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-17 (IL-17) is one of the inflammatory cytokines on periodontal disease. The present study was evaluated the bacterial growth inhibitory effect of anti-IL-17-receptor antibody against periodontal bacteria. Moreover, we investigated the influence of anti-IL17-receptor antibody on alveolar bone resorption. As a result, the anti-IL-17-receptor antibody was inhibited the growth of periodontal bacteria in vitro. In an animal model, this antibody was decreased neutrophils and osteoclasts of periodontal tissue and inhibited alveolar bone resorption. These results indicated that the administration of anti-IL-17-receptor antibody inhibited inflammation of periodontal tissue. Therefore, we suggest promote the prevention of periodontal disease.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯周病 サイトカイン 歯槽骨吸収抑制 細菌 破骨細胞 抗体

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は歯肉の炎症や歯槽骨吸収などの歯周組織破壊を病態とする炎症性疾患で、*Porphyromonas gingivalis* (Pg) に代表される歯周病原細菌が産生する病原因子が発症や進行に関与していることが明らかになっている。歯周炎はこれまで口腔内に限局した炎症性疾患として位置づけられていたが、最近ではペリオドンタルメディシンと呼ばれるように糖尿病や虚血性心疾患などの全身疾患がリスクファクターとなることや、血液中のインターロイキン (IL) や腫瘍壊死因子などの炎症性サイトカインが上昇することが知られ、病原因子と宿主の間で生じる免疫応答が歯周組織破壊に影響を及ぼすことが報告されている。

IL-17 は 2005 年に新規ヘルパー T (Th) 細胞として同定された Th17 細胞が産生する炎症性サイトカインで、破骨細胞の分化誘導を促進することや歯肉線維芽細胞の炎症性サイトカインの産生を促進し、歯周炎発症に関与すると考えられている。また Pg が Th17 細胞の分化を促進することも報告されていることから歯周病原細菌の感染が IL-17 の産生を誘導し歯周炎発症につながっていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、IL-17 を産生誘導する歯周病原細菌からの感染予防と宿主の免疫力活性化による歯周組織の改善効果を期待する目的で、抗 IL-17 抗体を用いた研究計画を立案した。すなわち抗 IL-17 抗体の歯周治療への有効性を検討する目的で歯周病原細菌の増殖抑制効果について *in vitro* で検討し、さらにマウス実験的歯周炎モデルを用いて歯槽骨吸収抑制効果を評価した。

3. 研究の方法

(1) 抗 IL-17 抗体の Pg 増殖抑制効果

供試菌株は Pg ATCC33277 株をイーストエキストラクト、ヘミンおよび ビタミン K₁ を添加したブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地を用いて 37、18 時間嫌気培養したものを使用した。Pg 菌液を抗 IL-17 抗体含有 BHI 液体培地に接種後、嫌気培養し経時的にルミノメーターを用いて培地中のアデノシン三リン酸 (ATP) 活性を測定し、抗 IL-17 抗体が Pg の増殖に与える影響について検討した。

(2) 実験的歯周炎モデルを用いた 抗 IL-17 抗体の歯槽骨吸収抑制効果

実験動物には生後 3 週齢、BALB/c 系雄性マウスを用いて行った。マウスの健康状態を観察後、サルファメトキサゾールとトリメトプリムの合成抗菌薬を 4 日間与えて口腔常在菌を減少させた後、経口的に細菌感染を行った。細菌感染は、Pg を遠心集菌し (4 °C、8,000 rpm、20 分)、5% カルボキシメチルセルロース溶液で調製したもの (細菌数: 1.2×10^{11} CFU/ml) を小動物用経口ゾンデを用いて 1 日毎に計 3 回、マウス 1 匹あたり 0.1 ml を経口接種して行い、実験的歯周炎を誘導した。Pg 感染終了後から異なる濃度に調整した抗 IL-17 抗体を 2 日おきに腹腔内に継続投与し、感染開始から 30 日後に上顎骨を摘出した。その後辺縁歯槽骨吸収量を評価するため、実体顕微鏡下でオートクレーブ処理した上顎骨の軟組織を除去して乾燥顎骨標本を作製後にマイクロ CT 撮影を行った。歯槽骨吸収量は撮影した CT 画像上で歯槽骨頂からセメント・エナメル境の距離の 7 点を測定し、その平均値を個体当たりで評価した。また周囲歯周組織中の好中球浸潤や破骨細胞の出現を解析するため、10%ホルマリンで固定した上顎骨を EDTA 溶液により脱灰後、通法に従い連続パラフ

イン切片を作製しヘマトキシリンエオジン(HE)染色と酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色を行った。

4. 研究成果

(1) 抗 IL-17 抗体の Pg 増殖抑制効果

抗 IL-17 抗体を添加して培養した場合には抗体未添加で培養した場合と比較して Pg の増殖速度の遅延が見られ、Pg 接種開始から 48 時間後では抗 IL-17 抗体添加群では未添加群の 1/4 程度の ATP 量を示した。

(2) 実験的歯周炎モデルを用いた 抗 IL-17 抗体の骨吸収抑制効果

Pg 感染後に抗 IL-17 抗体を投与すると、Pg 感染群に比べて辺縁歯槽骨吸収量が減少し、抗体濃度の増加により骨吸収量の有意な減少が認められた。病理組織学的解析で HE 染色標本を用いて歯肉縁から歯槽骨頂周辺にかけての好中球の浸潤状態について評価したところ、Pg のみの感染では好中球が最も多く認められたが、抗体濃度の増加に伴い好中球の減少が認められた。また TRAP 染色標本を用いて破骨細胞の出現を評価した場合においても、同様に Pg のみの感染群では破骨細胞が最も多く認められたが、抗体濃度の増加に伴い破骨細胞の減少が認められた。

以上の結果、本研究で用いた抗 IL-17 抗体は歯周病原細菌 Pg の発育阻害と歯槽骨破壊を抑制することから、歯周病原細菌からの感染予防と宿主の免疫力活性化による歯周組織の改善効果が期待でき、歯周病予防に利用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato T, Fujimaki R, Suzuki J, Hamada N, Tani-Ishii N, Handa K	4. 巻 15(3)
2. 論文標題 Bactericidal Effect of a Novel Alkaline EDTA Root Canal Cleaning Solution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Dentistry	6. 最初と最後の頁 546-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0041-1723067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Katayama T, Sato T, Hamada N, Goda Seiji, Yamaguchi T, Tsukinoki K, Handa K	4. 巻 16(4)
2. 論文標題 Effects of <i>Jixueteng</i> on Experimental Periodontitis During Orthodontic Tooth Movement in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1934578X211002419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ozaki Y, Morozumi T, Watanabe K, Toyama T, Sasaki H, Sato T, Yamamoto Y, To M, Inaba K, Tsukinoki K, Hamada N, Minabe M	4. 巻 62(3)
2. 論文標題 Inhibitory effect of omega-3 fatty acids on alveolar bone resorption and osteoclast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 298-302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnugd.19-0267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ozawa R, Saita M, Sakaue S, Okada R, Sato T, Kawamata R, Sakurai T, Hamada N, Kimoto K, Nagasaki Y	4. 巻 110
2. 論文標題 Redox injectable gel protects osteoblastic function against oxidative stress and suppresses alveolar bone loss in a rat peri-implantitis model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 82-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2020.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hasegawa T, Sato T, Kimoto K	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Antimicrobial effects of sodium chlorite gel for the cleaning of oral appliances.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Sports Dentistry	6. 最初と最後の頁 28-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hidaka K, Mikuni-Takagaki Y, Wada-Takahashi S, Saita M, Kawamata R, Sato T, Kawata A, Miyamoto C, Maehata Y, Watabe H, Tani-Ishii N, Hamada N, Takahashi SS, Deguchi S, Takeuchi R	4. 巻 45
2. 論文標題 Low-Intensity Pulsed Ultrasound Prevents Development of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw-Like Pathophysiology in a Rat Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ultrasound in Medicine & Biology	6. 最初と最後の頁 1721-1732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 倉橋 絢子, 渡辺 清子, 佐藤 武則, 佐々木 悠, 浜田 信城
2. 発表標題 脂肪酸塩の口腔内細菌に対する殺菌効果およびバイオフィルムに対する影響
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾崎 悠, 両角 俊哉, 渡辺 清子, 遠山 歳三, 佐々木 悠, 佐藤 武則, 山本 裕子, 東 雅啓, 稲葉 啓太郎, 槻木 恵一, 浜田 信城, 三辺 正人
2. 発表標題 オメガ3脂肪酸の歯槽骨吸収および破骨細胞分化誘導に対する抑制効果の研究
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉橋 絢子, 渡辺 清子, 佐藤 武則, 稲葉啓太郎, 佐々木 悠, 浜田 信城
2. 発表標題 脂肪酸塩の抗菌効果とS. mutansバイオフィルム形成抑制効果に関する研究
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会第55回総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kurahashi A, Watanabe K, Sato T, Inaba K, Sasaki H, Hamada N
2. 発表標題 The effects of fatty acid salts against Streptococcus mutans biofilm
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katayama T, Sato T, Hamada N, Goda S, Yamaguchi T
2. 発表標題 Effect of Jixueteng on Experimental Periodontitis During Orthodontic Tooth Movement in Rats
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato T, Inaba K, Watanabe K, Hamada N.
2. 発表標題 Photocatalytic effect of a solar-powered titanium dioxide semiconductor on oral biofilm
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology (APSP) Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	浜田 信城 (Hamada Nobushiro) (20247315)	神奈川歯科大学・歯学部・教授 (32703)	
研究 分担者	渡辺 清子 (Watanabe Kiyoko) (70148021)	神奈川歯科大学・歯学部・准教授 (32703)	
研究 分担者	合田 征司 (Goda Seiji) (70351476)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------