

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19010

研究課題名(和文) 歯肉線維芽細胞とマクロファージに対するIL-35の免疫調節能としての影響

研究課題名(英文) Effect of IL-35 on gingival fibroblasts and macrophages as an immunomodulatory ability

研究代表者

岡田 康佑 (okada, kosuke)

愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員

研究者番号：00805343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス由来マクロファージ様細胞RAW264.7細胞およびマウス歯肉線維芽細胞を用いて、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によりさらに上昇した。本研究よりIL-35が炎症作用の増強に関与している可能性が考えられた。しかし現在報告されているIL-35の作用と逆の結果になっており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)：Using mouse-derived macrophage-like cells RAW264.7 cells and mouse gingival fibroblasts, Porphyromonas gingivalis-derived lipopolysaccharide (LPS) stimulation was performed to reproduce the pathological condition of periodontal disease, and IL-35 was added. As a result, the gene expression of inflammatory cytokines increased by stimulation with LPS was further increased by IL-35. From this study, it is possible that IL-35 is involved in the enhancement of inflammatory action. However, the result is the opposite of the currently reported action of IL-35, and further studies are considered necessary in the future.

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 (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、マクロファージや線維芽細胞は、歯周病原細菌の菌体成分や代謝産物の刺激により、炎症性サイトカインやプロスタグランジン、コラゲナーゼ等を産生し、上皮の付着破壊や、歯槽骨吸収を引き起こし、歯周組織の破壊に深く関与していることが知られている(Agarwal S et al. *J Dent Res.* 1995、Roitt I et al. *Immunology.* 1985)。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-12R₂ 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、過剰な炎症反応を抑制し、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過剰な炎症に反応して産生され、歯肉線維芽細胞やマクロファージに対して過剰な炎症反応を制御する免疫調整能の働きをしているのではないかと考え、本研究を着想するに至った。

また、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である。そこで、歯周病治療における免疫療法を模索する基礎的研究として、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。歯周病は生活習慣病であり、成人のおよそ 8 割が罹患しているだけでなく、その治療は長期間に及ぶのが一般的である。超高齢社会において、免疫の低下した高齢者や、糖尿病などの全身疾患を有する患者に対するより効果的な治療の開発も急務である。本課題研究の遂行により、歯周病治療期間短期化の一助となるばかりでなく、超高齢社会の我が国の急務である健康寿命の延伸、国の医療費削減にも大きく貢献出来ると思われ、非常に意義深いものであると考える。

2. 研究の目的

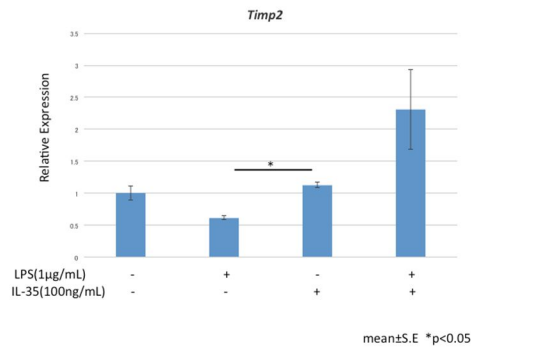
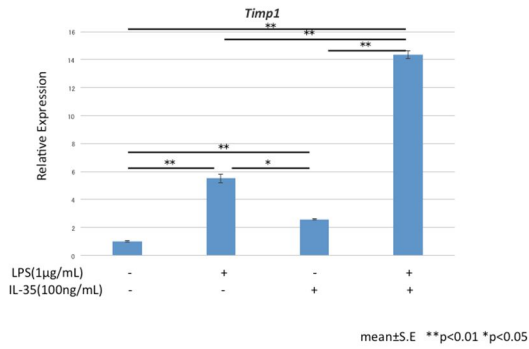
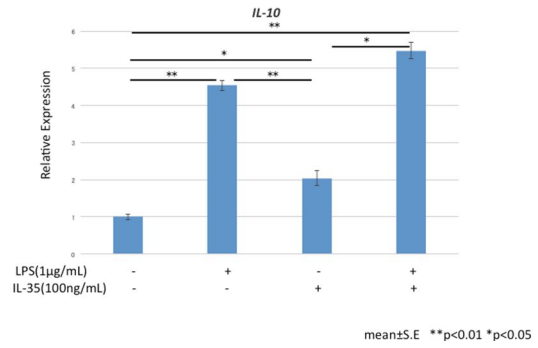
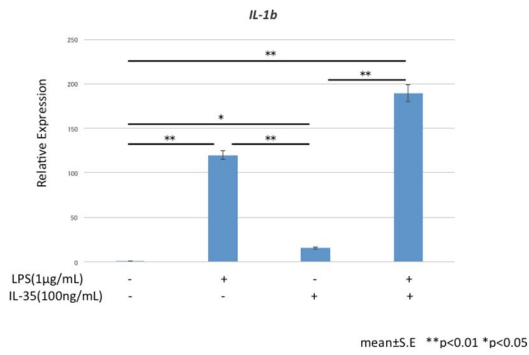
IL-35 が歯周病病態における線維芽細胞やマクロファージにどのような影響を与えているか検討するため、研究期間内に IL-35 存在下での *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激による歯肉線維芽細胞の組織代謝、炎症性サイトカイン産生の検討および、IL-35 存在下での *P.g* 由来 LPS 刺激によるマクロファージの組織代謝、炎症性サイトカイン産生の検討を実施した。これらの結果により、歯周病のメカニズムの解明および、サイトカイン療法等の免疫療法の一助となることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

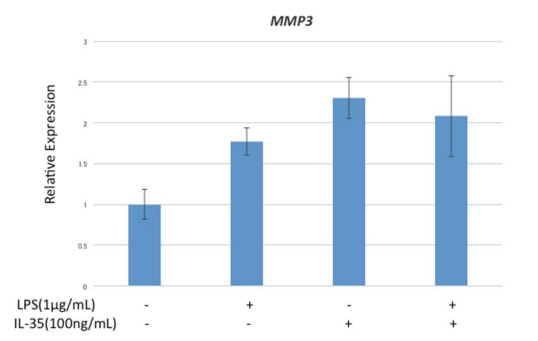
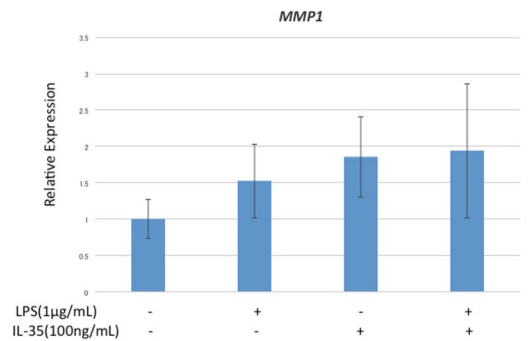
IL-35 がマクロファージおよび歯肉線維芽細胞に与える影響をマウス由来マクロファージ様細胞(RAW264.7 細胞)およびマウス歯肉線維芽細胞を用い、組織学的解析を行った。具体的には、培養した RAW および MGF に *P. gingivalis* 由来 LPS および rIL-35 を添加し、共培養後、回収した。回収した細胞を用いて RNA 抽出後、cDNA に逆転写を行い、歯周組織破壊および組織代謝に関連する各種サイトカインの遺伝子発現量を qPCR 法で測定および、細胞上清を用いて ELISA 法にてタンパク質産生の検討を行った。

4. 研究成果

RAW264.7 細胞およびマウス歯肉線維芽細胞に *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、RAW264.7 細胞において LPS 刺激によりサイトカインである IL-1b、IL-10、Timp1 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、Timp1 の遺伝子発現が有意に上昇した。



しかし、歯肉線維芽細胞においては有意な差は認められなかった。



これらの結果から IL-35 は直接的にマクロファージに対して細胞接着因子に対して何らかの影響を与えているが、歯肉線維芽細胞には影響を及ぼしていない可能性が考えられた。今後はマクロファージを中心に IL-35 の直接的影響をさらに検討していく予定である。

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〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------