

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20599020

研究課題名(和文) 新規サイトカイン IL-35 の歯周病態への関与とその治療応用に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The effects of IL-35 on periodontal diseases

## 研究代表者

小越 菜保子 (KOGOE NAHOKO)

姫路獨協大学・薬学部・助手

研究者番号：60509115

研究成果の概要(和文)：インターロイキン(IL)-35の歯周病態への関与を明らかにするために歯周病巣および末梢血における遺伝子発現を調べた。その結果、歯周病患者の病巣部のEBI3およびIL12A遺伝子発現量は対象部歯肉に比較して高い傾向が見られた。さらに、患者の病巣由来T細胞と末梢血由来T細胞におけるEBI3およびIL12A発現パターンは、その活性化時に大きく異なった。これらの結果から、IL-35は歯周病の病態に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to elucidate the implication of IL-35, a recently identified member of the IL-12 family of cytokines, in the pathogenesis of periodontal diseases. Firstly, we examined the gene expression of IL-35 in periodontal lesions. IL-35 is a heterodimeric protein consisting of IL-12 $\cdot$  and IL-27 $\cdot$  chain, which are encoded by two separate genes called *IL12A* and *EBI3*, respectively. When comparing to gene expression levels of *EBI3* and *IL12A* in lesional sites and control sites, we found that the relative level of gene expression for *EBI3* and *IL12A* was significantly higher at lesional sites than at control sites. Moreover, we found that the relative gene expression ratio of *EBI3* to *IL12A* showed significant difference in Th cells derived from periodontal lesions and peripheral blood when activated with anti-CD3/CD28 beads. From these findings, IL-35 might be implicated in the pathogenesis of periodontal diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	0	1,200,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：歯周免疫病態学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学・歯周免疫機能学

キーワード：IL-35, 歯周病, 制御性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病巣局所に集積するヘルパーT(Th)細胞は、種々のサイトカインを産生することに

よって外来抗原に対する防御の司令塔的役割を果たす。これらTh細胞は、産生するサイトカインのプロファイルからTh1/Th2細胞に代表されるサブセットに分類され、歯周

病の病態形成に深く関わる。今まで、これら歯周病態における Th 細胞応答性の関与を歯周病病巣における Th1 と Th2 の動態、バランスを中心に説明付けることが試みられてきたため、その論は様々であった。しかし近年、これらの Th 細胞サブセットに加え、Th17 細胞、制御性 T 細胞 (Treg) などの新しいサブセットの存在が明らかとなり、これらの概念が大きく変わりつつある。

Th17 細胞は、種々の免疫関連疾患において見られる組織傷害に加担する細胞集団として知られており (Steinman L., *Nat Med.*, 2007), 特にこの Th17 細胞が破骨細胞誘導に関わる T 細胞群であることも明らかにされている (Sato K *et al.*, *J Exp Med.*, 2006)。これらのことは、Th17 細胞が歯周病の病態、特に組織破壊に深く関与することを示唆するものと考えられる。一方、Treg 細胞は、一旦始まった免疫応答を能動的に終結させる過程に関わる細胞集団であると考えられており、特に Th17 細胞分化を抑制すると考えられている (Ichiyama K *et al.*, *J Biol Chem.*, 2008)。以上のことを重ね合わせて考察すると、Th17 細胞および Treg 細胞の分化を人為的に調節することによって、歯周病病巣内における組織破壊を制御することが可能になると考えられる。

T 細胞分化を決定付ける最も重要な因子となり得るのは、免疫応答が繰り広げられる微小環境内におけるサイトカイン・プロファイルである。Th17 細胞、Treg 細胞ともに分化初期には、TGF- $\beta$  の存在が必須となるが、Th17 細胞の分化増殖には、インターロイキン (IL)-6, IL-23 および IL-21 が必須となる。Treg 細胞が分化増殖するうえで必須となるサイトカインの特定は未だ解決されていない領域が多々存在するが、その最右翼として IL-35 が挙げられる。

IL-35 は、Treg 細胞が産生するサイトカインとして最も新しく特定されたものであり、多くの免疫応答を抑制する働きを有する (Collison LW *et al.*, *Nature*, 2007)。また、IL-35 は Th17 細胞の分化を抑制し、Treg 細胞の分化増殖を誘導するという報告があり (Niedbala W *et al.*, *Eur J Immunol.*, 2007), リウマチに対する治療薬として脚光を浴びている。しかし、歯周病においては、この IL-35 が病態にどのように関わるのかについて全く分かっていない。

## 2. 研究の目的

本申請課題の最終的な目標は、リウマチ患者を対象に現在考えられつつある IL-35 を用いた免疫療法を歯周病患者に対して実践することの可能性を探ることにある。しかし、前述の通り、IL-35 の歯周病病巣内における免疫制御への関与については、その機序および程度を含め、まだ何も分かっていない。そこで、本申請課題における目標を以下の二点に絞った。

- (1) 様々な病型および様々な組織破壊程度の歯周病患者の病巣局所における IL-35 発現を量的に比較し、その発現部位および様式について *in situ* で明らかにする。
- (2) 歯周病患者において、病巣に集積する T 細胞と末梢血 T 細胞との間での IL-35 に対する反応性の違いおよび産生性の違いを明らかにし、その応答性を人為的に調整することの可能性について評価する。

## 3. 研究の方法

- (1) 歯周病病巣局所における IL-35 および関連サイトカイン遺伝子発現の定量解析

様々な病型の歯周病患者を対象として、炎症および組織破壊の程度が異なる歯周病病巣局所から歯肉サンプルを採取し、IL-35 遺伝子および Th17, Treg 細胞および Th1, Th2 細胞の分化誘導に関わるサイトカインの遺伝子発現を量的に比較した。

### ①歯肉サンプルの採取

倫理委員会の承認の方法により歯周外科手術実施時に歯周病病巣およびその周辺部から歯肉サンプルを採取した。mRNA 採取用歯肉サンプルは RNA later 液 (Ambion 社製)、に浸した状態で輸送および保存を行った。

### ②IL-35 および関連サイトカイン遺伝子発現の定量解析

歯肉サンプルにおける各遺伝子発現の定量はリアルタイム RT-PCR法を用いて行った。なお、IL-35 分子は Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) と IL-12 p35 の 2 量体からなるため、それぞれの分子を

ターゲットとして *EBI3*, *IL12A* 遺伝子の発現を定量解析した。また, Th17 および Treg 細胞への分化に関わるサイトカインとして *IL-23*, *IL-21* を, Th1 および Th2 分化誘導に関わるサイトカインとして *IL-12*, *IFN- $\gamma$* , *IL-4* をターゲットとした。

#### (2) 歯周病患者の歯周病巣および末梢血由来 T 細胞の *IL-35* 産生性の評価

歯周病患者から病巣部歯肉と末梢血を採取し, それぞれに含まれる T 細胞が産生する *IL-35* レベルを定量する実験系を確立した。すなわち, 倫理委員会承認の方法によって同意を得た歯周病患者から, 病巣部歯肉と末梢血を採取し, それぞれに含まれる単核球を分離し, 抗 *CD3* 抗体および抗 *CD28* 抗体を結合させたビーズを用いて *CD3<sup>+</sup>* T 細胞の活性を誘導した。48 時間後の *IL-35* 遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて定量解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 様々な病型の歯周病患者 15 名を対象として, 歯周外科手術実施時に炎症および組織破壊の程度が異なる歯周病巣局所から歯肉サンプルを採取し, *IL-35* 発現を定量した。その結果, 多くの歯周病患者の病巣部では健常部と比較して *EBI3*, *IL12A* とともにその発現量が高い傾向が見られた。このことから, *IL-35* が歯周病の病態に関与する可能性が示された。今後さらにサンプル数を増やすとともに, その局在を免疫組織学的に解析することによって, *IL-35* の歯周病態への関与および, 組織破壊あるいは防御に関わる免疫機構が明らかになると考えられる。

(2) 上述の歯周病歯肉で Th17, Treg 細胞および, Th1, Th2 細胞の分化誘導に関わるサイトカイン群の遺伝子発現プロファイルを調べた。その結果, Th17 細胞の誘導に関わる *IL-23* およびそのレセプターである *IL23R* の mRNA 発現が病巣部において健常部と比較して高いこと, Th1 細胞の誘導に関わる *IL-12* のレセプターである *IL12RB2* の発現が病巣部に比較して健常部で高いことが明らかとなった。このことは, Th17 細胞

が歯周病巣において組織破壊に関わる可能性を示唆している。

(3) *IL-35* は *IL-23* および *IL-12* のサイトカインファミリーの一つであるが, その産生細胞は抗原提示細胞のみでなく, T 細胞であることが明らかにされている。そこで歯周病の病巣局所において集積する T 細胞の *IL-35* 産生性を評価するために, 歯周病患者から病巣部歯肉と末梢血を採取し, それぞれに含まれる T 細胞が産生する *IL-35* レベルを定量する実験系を確立した。

この実験系を用いて, 歯周病患者の病巣局所に集積する T 細胞と末梢血 T 細胞との間で *IL-35* の産生性の違いを調べた。その結果, 末梢血から採取した T 細胞を活性化させた場合, *EBI3* 発現量は約 4 倍に増加するのに対して, *IL12A* 発現量は約  $1/10^6$  に減少した。一方, 歯肉から採取した T 細胞を活性化させた場合, *EBI3* 発現量の増加はわずかであり, また *IL12A* についても末梢血由来 T 細胞と異なり, その発現量が減少する傾向は見られなかった。Th1 タイプのサイトカインである *IFN- $\gamma$*  遺伝子については, 同刺激による遺伝子発現の上昇が, 歯肉および末梢血から採取した T 細胞のそれぞれにおいて大差なく観察されたことから, 歯周病局所に集積する T 細胞の *IL-35* 産生様態は末梢血由来 T 細胞のそれと異なる結果が示された。

以上の結果から, 歯周病の病巣局所に集積する T 細胞の活性化に伴って産生される *IL-35* は, 歯周病の病態に関わる可能性が示唆された。

#### 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 8 件)

① Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nishimura F, Meguro M, Yoshizawa S, Okada Y, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Higashi T, Terada N, Matsushita S., Fibroblasts stimulated via HLA-II molecules produce prostaglandin  $E_2$  and regulate cytokine production from helper T cells., Lab Invest. 査読有, 2010 Dec;90(12):1747-56.

② Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K,

Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N.,  
The involvement of IL-23 and the Th17  
pathway in periodontitis., J Dent Res.  
査読有 2009 Jul;88(7):633-8.

[学会発表] (計4件)

- ① 大山 秀樹, 小越 菜保子, 西村 英紀, 山根木 康嗣, 橋谷 進, 木崎 久美子, 歯周病病態形成における IL-23/IL-17 産生系の関与, 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会, 2009 年 5 月 15 日, 岡山
- ② 大山秀樹, 小越 菜保子, 目黒 道生, 吉澤 さゆり, 岡田 祐佳, 西村 英紀, クラス II HLA 分子を介した刺激を受けた歯肉線維芽細胞による Th 細胞応答性の制御, 第 129 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2008 年 11 月 7 日, 富山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小越 菜保子 (KOGOE NAHOKO)  
姫路獨協大学・薬学部・助手  
研究者番号: 60509115

### (2) 研究分担者

大山 秀樹 (OHYAMA HIDEKI)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90280685

寺田 信行 (TERADA NOBUYUKI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50150339

中正 恵二 (NAKASYO KEIJI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00217712

山田 直子 (YAMADA NAOKO)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10319858

山根木 康嗣 (YAMANEGI KOJI)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00434944