

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18520

研究課題名（和文）Ebi3<sup>-/-</sup>マウスを用いた実験的歯周炎におけるIL-35の付着上皮への影響研究課題名（英文）Effect of IL-35 on attached epithelium in experimental periodontitis in Ebi3<sup>-/-</sup> mice.

研究代表者

後藤 久嗣 (Goto, Hisashi)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：10783037

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）：本研究では、Ebi3ノックアウト（KO）マウスを用いて実験的歯周炎におけるIL-35の役割を検討した。KOマウスの結紮側では進行した歯槽骨吸収が認められWTマウスよりも顕著であった。KOマウスの結紮側歯肉ではWTマウスと比較してIL-17Aの発現量が有意に高かった。IL-10の発現量は、KOマウスではWTマウスに比べて有意に低下した。さらに、RANKL/OPG比はKOマウスでWTマウスに比べて有意に増加した。以上より、Ebi3欠損マウスではTh17細胞が実験的歯周炎を増悪させIL-35が歯周組織破壊の抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は歯の喪失原因の第1位であり、その患者数は高齢層を中心に増加している。現在、有効な歯周病治療薬はなく、病態に直接作用する歯周病治療薬の開発が望まれている。IL-35は抗炎症作用ならびに骨吸収に対して抑制的に働くことで歯周病の進行抑制に関与していると考えられるが詳細については不明であり、検討が必要である。本研究では、IL-35のサブユニットの1つであるEbi3の欠損マウス(Ebi3<sup>-/-</sup>マウス)に実験的歯周炎を惹起させ、歯周病病態の比較検討を行う。このような基礎的研究を基盤とし歯周病治療薬を開発することで、健康寿命を延伸するという超高齢社会のニーズに答えていきたいと考える。

研究成果の概要（英文）：Here, we investigated the role of IL-35 in experimental periodontitis using Ebi3 knockout (KO) mice. Histological staining and micro-computed tomography scanning revealed that the ligatured side of Ebi3 KO mice showed intense alveolar bone resorption surrounding the entire periapical area, and this tissue destruction was substantially more pronounced than in WT mice. Quantitative real-time PCR and immunofluorescence staining showed that IL-17A expression was significantly higher in the gingiva of the ligatured side of Ebi3 KO mice compared with WT mice. IL-10 expression levels was significantly lower in Ebi3 KO mice than in WT mice. The RANKL/OPG ratio was significantly increased in Ebi3 KO mice compared with WT mice. Together, these findings suggest that Th17 cells exacerbate experimental periodontitis in mice lacking Ebi3, and that IL-35 plays a critical role in inhibiting periodontal tissue destruction.

研究分野：保存治療系歯学関連

キーワード：IL-35 Ebi3 IL-17 ノックアウトマウス 歯周病

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌感染を主とした慢性炎症性疾患であり、病的な骨吸収が認められる。歯周炎の局所において、T細胞を中心とした免疫応答が惹起されており、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞およびTreg細胞の関与を示唆する様々な報告がなされてきた。Treg細胞から産生されるIL-35は抑制性サイトカインであり免疫寛容の誘導・維持や過剰な免疫反応の制御に重要な役割を担っていると考えられており、抗炎症性サイトカインとしての生体内の過剰な免疫反応の抑制効果がある。それに加えて生体外からの刺激に対し最表層かつ最前線においてバリアー機能を有し、抵抗作用を担っている上皮細胞間および上皮細胞とエナメル質間の付着の破壊抑制が可能であれば、歯周組織の恒常性維持や歯周組織破壊の抑制およびその収束につながる重要な因子として捉えることができ、将来的には治療薬として活用できる可能性が高いと考えた。現在まで、申請者の研究室では歯周病における破骨細胞活性化機構(Izawa A et al. *Infect Immun.* 2014)や、歯周病の発症および進行に関わる因子、特に上皮付着の破壊に関する解析(Goto H et al. *PLOS ONE.* 2015)をしてきており、さらに歯周病患者と健常者ではIL-35発現/産生に差があることを報告している(Mitani A et al. *J Periodontol.* 2015)。したがって、これら一連の流れを踏まえ、本研究計画においても意義のある結果が得られると考えられる。

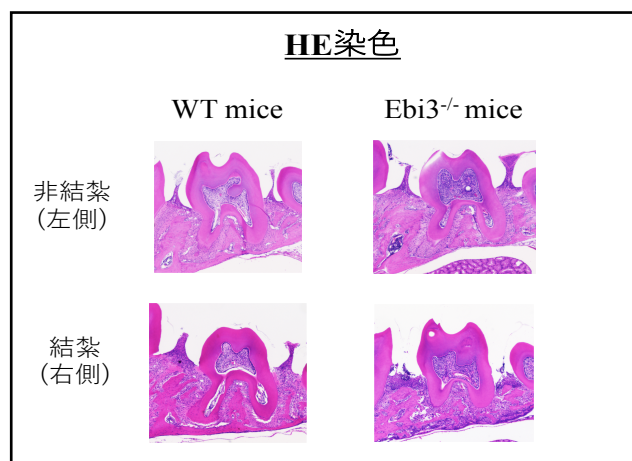
Abeらによって絹糸を結紮する実験的歯周炎モデルが確立され、多くの研究機関で実験的歯周炎をマウスに起こすことが可能となった(Abe et al. *J Immunol Methods.* 2013)。申請者はすでに絹糸を結紮する実験的歯周炎モデルの手技を会得しており、申請者の研究施設ではEbi3<sup>-/-</sup>マウスを現在繁殖飼育している。また申請者は、すでに歯周病モデルを検討するための連続切片の作製、染色、組織中の遺伝子発現の測定や細胞内伝達物質の解析に必要な手技も会得しており、新たに習得しなければならない実験手技はない。したがって Ebi3<sup>-/-</sup>マウスを用いて前述の実験計画を実践すれば、内因性のIL-35の影響を排除して歯周病におけるIL-35の働きを解明できると確信し今回の着想に至った。

### <これまでの研究活動>

2019年4月～2020年3月；

愛知学院大学歯学部歯周病学講座 助教

引き続き、絹糸結紮による実験的歯周炎モデルを用いた、IL-35の影響に関する研究を行っている。各群におけるヘマトキシリン・エオシン(HE)染色を行った。

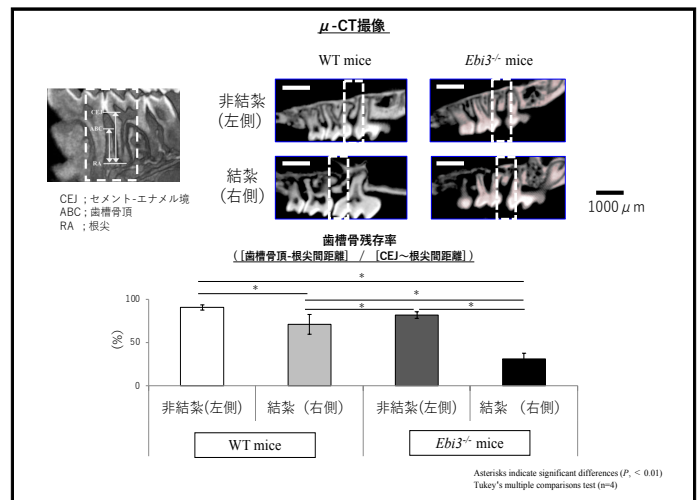


2016年4月～2019年3月；

愛知学院大学歯学部歯周病学講座 非常勤講師

絹糸結紮による実験的歯周炎モデルを用いて、IL-35の影響に関する条件の検討を

行ってきた。Ebi3<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスを用い上顎臼歯部に5-0絹糸を結紮し、実験的歯周炎を惹起させたところ、歯槽骨吸収に関し歯周炎非惹起群において野生型マウス群と比較し、Ebi3<sup>-/-</sup>マウス群の骨吸収は促進しており、さらに実験的歯周炎を惹起させたEbi3<sup>-/-</sup>マウス群において、歯周炎惹起野生型マウス群と比べ有意な骨吸収の促進を認めた。



## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、歯周病治療薬の開発である。これまでの研究において、Ebi3<sup>-/-</sup>マウスを用い実験的歯周炎を惹起させ、形態学的解析を行い IL-35 の骨吸収抑制作用があることを明らかにした。その結果を踏まえ本研究では、**IL-35 が恒常的及び炎症下において歯周組織に与える作用について検討することを目的とする。**

## 3. 研究の方法

### (1) 実験的歯周炎惹起

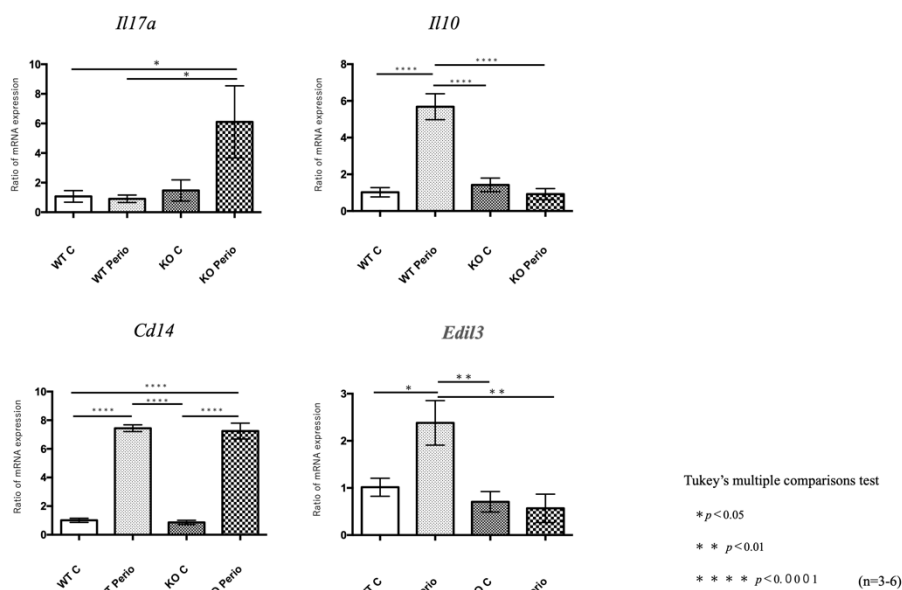
Ebi3<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの上顎右側第二臼歯歯頸部に5-0絹糸を結紮し、各サンプル回収のタイミングにて屠殺する。なお、上顎左側第二臼歯をコントロール側とする。

### (2) 歯周組織サンプルの回収と解析

絹糸結紮3日後で屠殺し、歯肉上皮層を採取し totalRNA を抽出後に IL-10、IL-17A、CD14、Del-1、RANKL、OPG(標的分子)の遺伝子発現を qPCR にて解析する。絹糸結紮5日後で屠殺し、上顎骨を採取し、連続切片を作成後に標的分子の免疫染色を行う。このことにより、IL-35 による歯周組織における作用の比較として、コントロール側から恒常性の維持に関する評価ができ、さらに結紮側を含めることで炎症下における評価が可能である。また、組織染色によりその局在を病理組織学的に解析し、歯周組織局所における IL-35 の作用が評価できる。

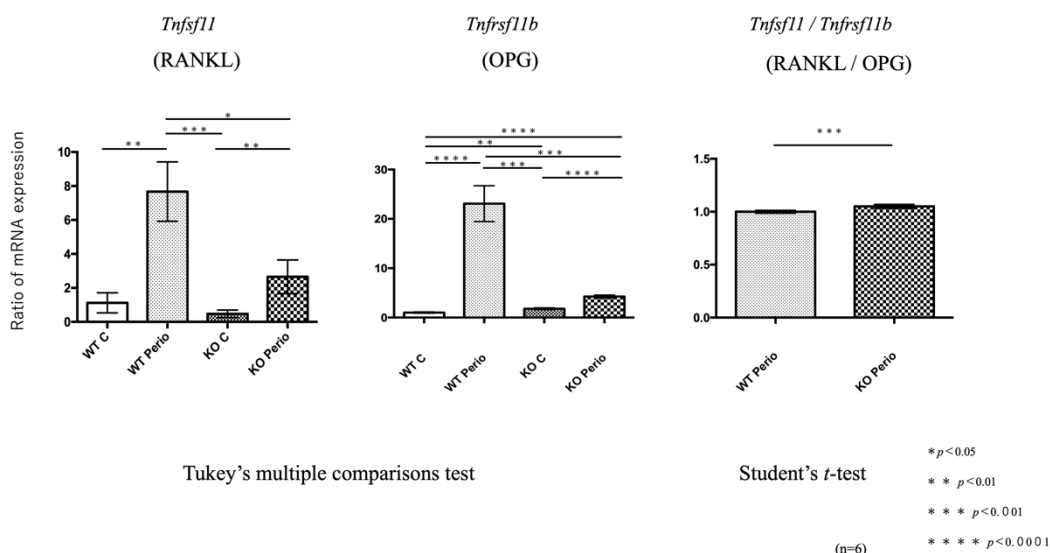
#### 4. 研究成果

##### 歯肉上皮層における遺伝子発現



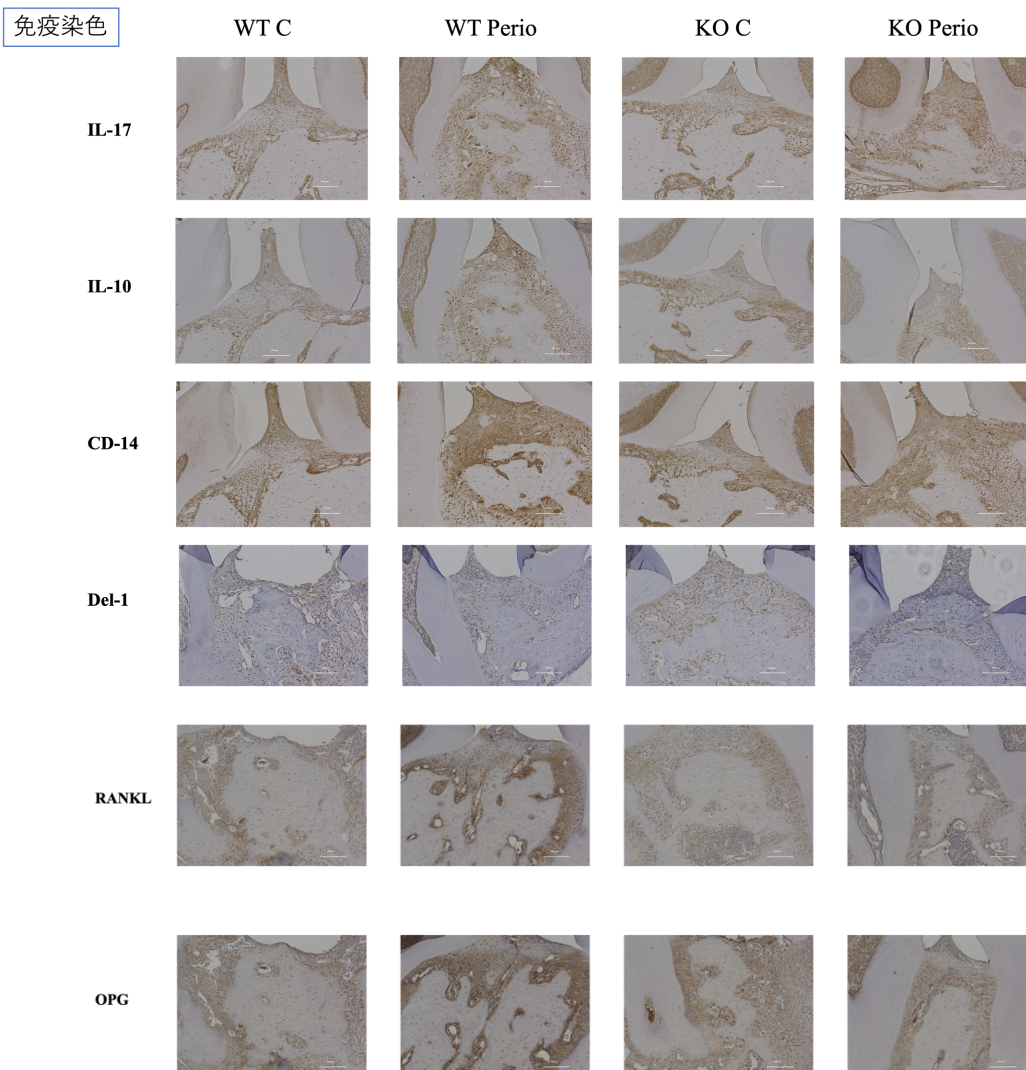
IL-17 の遺伝子発現は、ノックアウトマウスの歯周炎群において野生型マウスの同群と比較して、有意な遺伝子発現の増加が認められた。また、IL-10 の遺伝子発現は、ノックアウトマウスの歯周炎群において野生型マウスの同群と比較して、有意な遺伝子発現の低下が認められた。このことは、IL-35 を発現する Treg 細胞の免疫機能が低下し、IL-35 と拮抗する炎症性サイトカインである IL-17 の発現が優位になったと考えられ、歯周病における過剰な炎症状態における IL-35 の抑制作用が示された。

なお、細菌感染すると発現増加する CD14 において、本実験における歯周炎群では、非歯周炎群と比較し有意な発現増加を示したことは、歯周病を発症させる初発因子である細菌感染を、本研究でも模倣した実験的歯周炎惹起モデルマウスであることが証明された。



RANKL、OPG の結果は、免疫応答とともに骨代謝が低下していると考察でき、RANKL/OPG 比において、ノックアウトマウスの歯周炎群において野生型マウスの同群と比較して、有意な増加が認められた。このことは、IL-35 が抑制されると骨代謝が低下することに加え、骨吸収をより促進する方向に向かっていることが示唆された。

## 組織学的解析



IL-10、IL-17、CD14、Del-1 は歯肉上皮層における局在を、RANKL、OPG は骨表面における局在を確認したところ、前述の遺伝子発現の結果に則した各実験群での染色像が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Goto Hisashi, Kikuchi Takeshi, Takayanagi Yuhei, Kamiya Yosuke, Suzuki Yuki, Kawamura Shotaro, Sawada Noritaka, Hayashi Jun ichiro, Mitani Akio | 4. 巻<br>50                |
| 2. 論文標題<br><i>Ebi3</i> knockout aggravates experimental periodontitis via Th17 polarization   | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Periodontology  | 6. 最初と最後の頁<br>1406 ~ 1418 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/jcpe.13859   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>後藤久嗣、菊池毅、高柳結平、鈴木祐希、川村翔太郎、澤田憲孝、林潤一郎、三谷章雄 |
| 2. 発表標題<br>Ebi3ノックアウトマウスではTh17への分極化により実験的歯周炎が増悪する  |
| 3. 学会等名<br>日本歯科保存学会                                |
| 4. 発表年<br>2022年                                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|