

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592638

研究課題名（和文）歯周病関連細菌感染モデルマウスに対する IL-1 タイプ II レセプターの影響

研究課題名（英文）Effect of the IL-1 type II receptor to a experimental periodontitis infected with periodontal bacterium

研究代表者

石原 裕一（ISHIHARA YUICHI）

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：50261011

研究成果の概要（和文）：平成 21, 22 年度は実験動物をマウスからラットに変更し、臼歯に歯周病細菌を浸漬させた縫合糸を結紮することにより、実験的歯周炎を惹起させたところ、実験側では炎症性サイトカインの産生亢進と破骨細胞を伴う炎症性骨吸収が観察された。ラット骨芽細胞を用いて破骨細胞分化因子の発現に IL-1R2 や IL-1Ra は抑制的に働いていることが示唆された。平成 23 年度は IL-1Ra 遺伝子欠損マウスを用いて研究を進展させている。

研究成果の概要（英文）：Experimental periodontosis model animal was changed to a rat from a mouse, and experimental periodontosis was induced by periodontal bacterium-adhered ligature onto the molars at 2009 and 2010. The experimental site observed the high levels of inflammatory cytokine production, the inflammatory bone resorption with osteoclast formation and IL-1R2 and IL-1Ra inhibited the osteoclast differentiation factors from rat osteoblast. The research will be developed in 2011 using an IL-1Ra gene deficient mouse.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学、インターロイキン-1、実験的歯周炎、インターロイキン-1 タイプ II レセプター、インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト

## 1. 研究開始当初の背景

IL-1 ファミリーは局所の炎症性骨吸収に強く関連することが報告されている。IL-1 のレセプターには IL-1 レセプター type I（IL-1RI）と IL-1 レセプター type II（IL-1RII）が存在し、細胞内ドメインを有する IL-1RI は、IL-1 $\alpha$  および IL-1 $\beta$  と結合することにより、細胞内へのシグナルを伝達

する。しかし、IL-1RII は細胞内領域が極めて短いために、IL-1 のシグナル伝達にほとんど関与していない。そのため IL-1RII は decoy receptor として働き、IL-1 の活性を抑制している。

歯周組織における IL-1RII 発現の調節に関していくつかの報告はみられるものの、IL-1RII の産生の詳細なメカニズムが明らか

にされているわけではない。そこで、本研究では、歯周組織のどの細胞に IL-1RII が局在しているかを調べたのち、局在していた組織と同系統の細胞を用いて、各種のサイトカイン刺激により IL-1RII mRNA 発現、IL-1RII 産生がどのように制御されているかをヒト歯肉上皮細胞を用いて検討した。

今回、ヒト歯肉上皮において IL-1RII 発現が認められ、マウス株化歯肉上皮細胞 (GE1 細胞) において IL-1RII mRNA 発現、IL-1RII 発現が認められた。これまでに歯周病患者の歯肉溝滲出液 (GCF) 中に IL-1 $\beta$  とともに可溶性 IL-1RII が検出されることを確認し、臨床所見と比較したところ、歯周病が進行した部位で sIL-1RII 産生の亢進が認められたとしている。これらのことから、IL-1RII は歯肉上皮から産生され、GCF へ浸出している可能性が示唆された。また、歯肉上皮は IL-1RII を産生することで IL-1 の活性を抑制し、過度な炎症を制御する役割を担っていることが示唆された。

さらに、GE1 細胞を IL-4、IL-13 刺激した場合、IL-1RII mRNA 発現、IL-1RII 産生が増加し、IFN- $\gamma$  刺激した場合、IL-1RII mRNA 発現、IL-1RII 産生が抑制された。歯周炎患者において、非外科的歯周治療前後の GCF を採取し、IL-4 と IFN- $\gamma$  の変化を調べたところ、治療後には歯周組織の炎症の改善と共に IFN- $\gamma$  の総量が減少し、IL-4 濃度の増加が認められたと報告されている。このことから、歯周炎においては、IL-4 産生が歯周組織の炎症に抑制的に働くことが示唆される。IL-4、IL-13 は TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、および IL-6 のような炎症性サイトカインの産生を抑制することが知られており、IL-1 $\beta$  などの産生抑制と共に、IL-1RII 産生を増加させることで、IL-1 による歯周組織破壊を制御しているのではないかと考えられる。

IFN- $\gamma$  は単球において、リポ多糖によって誘導された NF- $\kappa$ B 活性や TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、および IL-12 のようなサイトカイン産生を増強させる。また、歯周炎患者の GCF 中から Th1 型のサイトカインである IFN- $\gamma$  濃度が IL-4、IL-6 濃度より高く検出され、IFN- $\gamma$  が IL-1 産生を促進させることにより歯槽骨破壊に関与していることが示唆されている。これより、IFN- $\gamma$  には IL-1RII 産生を抑制することで IL-1 $\beta$  などによる歯槽骨破壊をさらに促進させる可能性が示唆された。

IL-4 レセプターには I 型受容体と II 型受容体が存在し、II 型受容体は IL-13 レセプターとしても機能することが知られている。また、IL-4 と IL-13 のシグナル伝達経路は、レセプターに特異的なリガンドが結合することで JAK ファミリーにより STAT6 がチロシンリン酸化される。そして、チロシンリン酸化し

た STAT6 は二量体を形成して、核内へと移行し転写因子として働くことが知られている。今回、GE1 細胞において IFN- $\gamma$  添加による前処理後に、IL-4 を添加するとチロシンリン酸化 STAT6 発現が抑制された。これより、IFN- $\gamma$  による IL-1RII 産生の抑制には STAT6 のチロシンリン酸化の抑制が関与していることが示唆された。

そこで、sIL-1RII の歯周炎に対する抑制作用については明らかとなっておらず、マウスでの歯周病関連細菌単独感染による実験的歯周炎モデルも用いて調べるよう試みた。しかし、マウスでの歯周炎は確立できなかった。そのため、実験動物をラットとし、以下の研究を実施した。

## 2. 研究の目的

炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン-1 (IL-1) は、破骨細胞の分化・活性化に直接関わるということが明らかとなっており、関節リウマチや歯周病の発症や進行に密接に関連している。1990 年に IL-1 レセプターに結合するがシグナル伝達を起こさない IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) が発見され、IL-1 の 100 倍濃度の IL-1Ra で胸腺細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞に対する IL-1 の活性を 50% まで抑制することが明らかとなった。リウマチ患者に IL-1Ra 投与したところ症状が改善することが明らかとなっているが、歯周病に対する抑制効果については不明である。

ラット歯周組織はヒトと臼歯部の解剖学的形態やプラークの発育形式および歯周炎の病態が類似しているという研究上の利点から、病態の解明、予防や治療法の開発および効果の判定に用いられてきた。ラットに歯周病関連細菌浸漬結紮糸による実験的歯周炎を惹起した時の IL-1 動態を生化学的に定量し、炎症の程度、歯槽骨吸収を形態学的に観察ならびに歯周病関連細菌刺激したラット骨芽細胞に IL-1Ra を添加した場合の骨関連遺伝子発現を qPCR で定量的に評価することにより、IL-1Ra が関節リウマチと同様に歯周病においても抑制効果があるか否かを探ることを目的に実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) P. gingivalis の培養方法

P. gingivalis (ATCC 33277) を 37°C、嫌気条件下にて培養し、1 週間ごとに新たな培地に継代保存を行った。液体培地にて培養した細菌数は、0. D. 600nm 値にて分光光度計を用いて測定、吸光度から換算した。

### (2) 実験動物と実験方法

実験動物には、生後 6 週齢雄 Wistar 系ラットを用いた。全身麻酔下で、上顎右側第二臼歯の歯頸部に P. gingivalis 浸漬ナイロン

糸を結紮し実験側とした。上顎左側第二臼歯は無処置で対照側とした。

### (3) マイクロ CT

実験的歯周炎惹起 4 日目に採取した上顎骨をマイクロ CT 撮影し、上顎第二臼歯周囲の歯槽骨吸収を頰側から観察した。

### (4) 組織学的解析

マイクロ CT 撮影後、通法に従ってパラフィンブロックを作製した。組織切片は、H-E 染色と TRAP 染色で染色し、光学顕微鏡下で観察した。

### (5) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) 解析

実験的歯周炎惹起後 0, 1, 2, 3, 4, 5 日目で屠殺し、実験側および対照側の周囲歯肉組織を採取した。採取した歯肉をホモジナイズし、上清を ELISA kit を用いて IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, sIL-1RII を測定した。歯肉組織サンプル中の IL-1 産生量は BSA 重量あたりの濃度 (pg/mg) で換算した。

### (6) ラット頭蓋冠由来骨芽細胞培養

ラット頭蓋冠由来骨芽細胞 (rat calvaria cells : RC 細胞) は、Bellows らの方法などを参考に、生後 2 日齢の Wistar 系ラットの頭蓋冠から採取し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。実験には、継代して 3 代目のものを用い、セミコンフルエントになった細胞を供した。

### (7) real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

骨芽細胞 (1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/well) にラット IL-1Ra, ヒト sIL-1RII, マウス sIL-1RII, リン酸緩衝生理食塩水をそれぞれ添加し、1 時間培養後、60°C で 30 分間加熱した。

P. gingivalis の死菌で刺激 (MOI=100) を行い、刺激後 0, 4 時間後における RANKL, OPG, Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) の遺伝子発現について qPCR 解析を行った。

### (8) 統計学的分析

qPCR での RANKL, OPG, M-CSF mRNA 発現比における P. gingivalis 刺激後 4 時間でのラット IL-1Ra 群, ヒト sIL-1RII 群, マウス sIL-1RII 群, PBS(-) 群の差の検定と、結紮周囲歯肉組織における IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, sIL-1RII タンパク産生量の差の検定には one-way ANOVA と Bonferroni t tests にて統計学的に検討し、危険率は P<0.01, P<0.001 をもって有意とした。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロ CT による実験的歯周炎惹起後の歯槽骨変化の観察

P. gingivalis 浸漬結紮糸を用いた実験的歯周炎 4 日目に於いて、対照側では第二臼歯近遠心歯槽骨に骨吸収は認められず、根分岐部の骨縁上露出は観察されなかったが、実験

側では第二臼歯近遠心歯槽骨頂部は粗造となり、約 320 $\mu$ m の水平的骨吸収像と根分岐部の骨縁上露出が認められ、Seto らが結紮糸のみで惹起させた実験的歯周炎 20 日目と同程度の歯槽骨吸収が観察することができた。

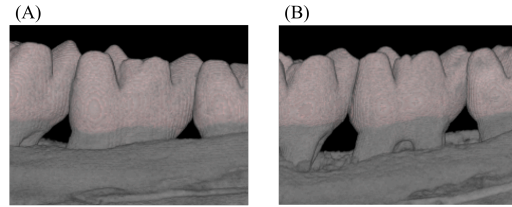


図5 マイクロCTによる実験的歯周炎惹起後の歯槽骨変化の観察

A: 対照側, B: 実験側

### (2) H-E 染色による実験的歯周炎惹起後の歯周組織変化の観察

対照側では、上皮突起の伸張や歯肉固有層での結合組織繊維の走行の乱れや歯槽骨頂部に炎症性細胞浸潤は観察されなかった。一方、実験側では歯肉頂部にプラークの蓄積を疑わせる辺縁不整な上皮と結合組織繊維の走行の乱れ、上皮直下に炎症性細胞浸潤が観察された。しかし、対照側でも実験側でもヒトでの慢性歯周炎のような付着の喪失は観察されなかった。

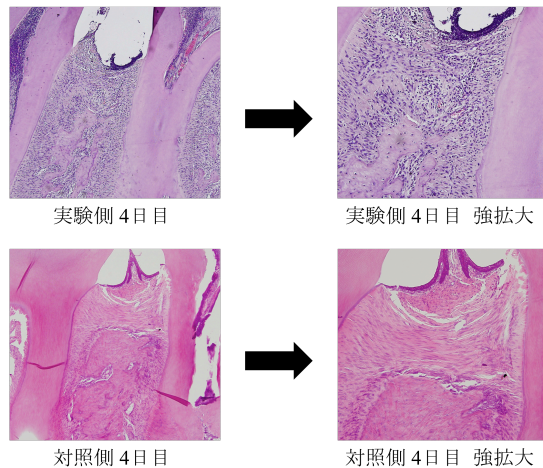


図6 H-E染色による実験的歯周炎惹起後の組織学的変化

### (3) TRAP 染色による実験的歯周炎惹起後の組織学的変化の観察

対照側では TRAP 陽性多核の破骨細胞は観察されなかったのに対し、実験側では歯肉固有層直下の骨頂部だけでなく、歯根膜に隣接する歯根中央部においても破骨細胞が観察された。

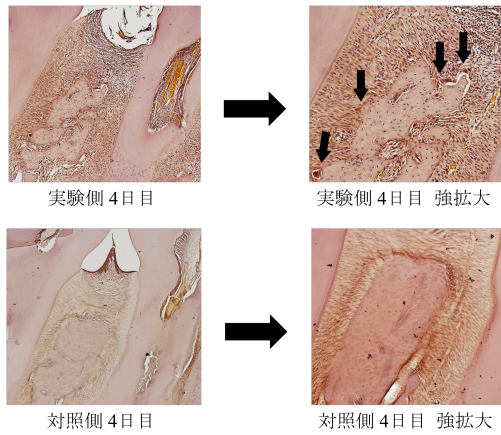
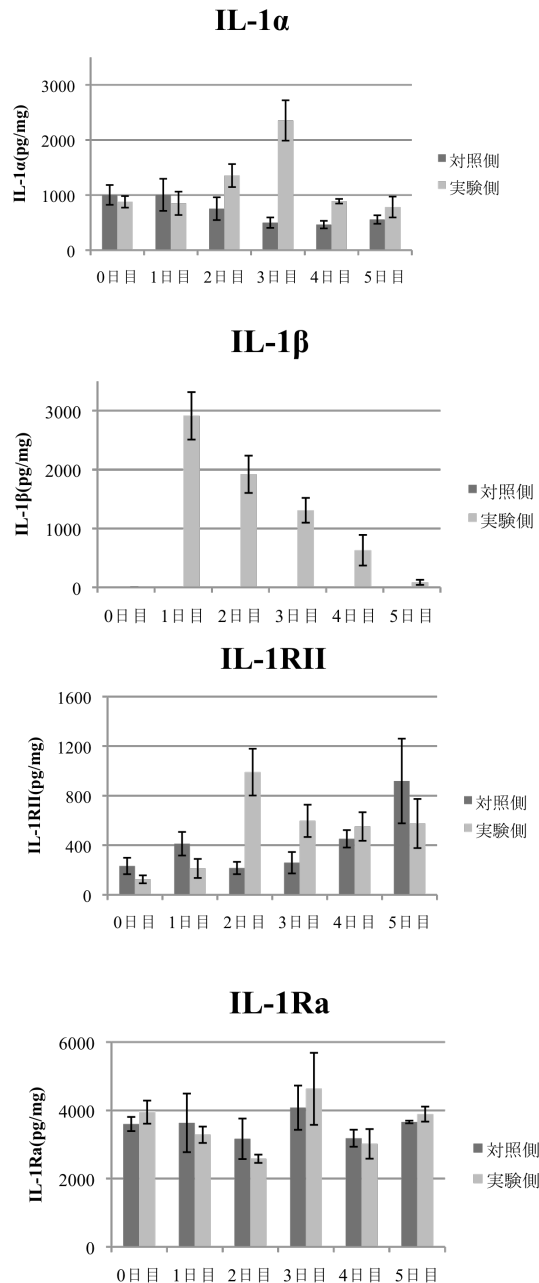


図7 TRAP染色による実験的歯周炎惹起後の組織学的変化  
実験側 4 日目強拡大での矢印は TRAP 陽性細胞を示す。

#### (4) ラット実験的歯周炎惹起周囲歯肉組織中の IL-1 の動態

実験側周囲歯肉組織の IL-1 $\alpha$  は、対照側と比較して 2 日目から産生が対照側に比べ増加傾向を示し、3 日目に約 4.7 倍に有意に増加した ( $P < 0.01$ )。その後 4, 5 日目には産生は減少し、対照側と同程度になった。IL-1 $\beta$  は対照側では全く産生されず、実験的歯周炎惹起後 1 日目に実験側で IL-1 $\beta$  は約 2900pg/mg に増加し、その後経時的に減少し 5 日目には対照側と同程度となり IL-1 $\beta$  の産生はなくなった。このことから、IL-1 $\beta$  はラットにおいて恒常的な産生はなく、*P. gingivalis* 感染と縫合糸結紮刺激に反応した急性炎症ではないかと考えられた。sIL-1RII は、2 日目に対照側に比べ実験側において産生が 4.5 倍有意に増加し、その後、IL-1 $\beta$  と同様に徐々に減少することが明らかとなった ( $P < 0.01$ )。IL-1Ra は、実験期間を通じて実験側と対照側でその産生に違いは認められなかったが、3 日目に IL-1 $\alpha$  と同様に高い IL-1Ra 産生の傾向が認められた。IL-1 の活性は 100 倍濃度の IL-1Ra により 50%抑制されることから推察すると、実験的歯周炎惹起 1 日目から 4 日目までに産生された IL-1Ra と sIL-1RII 量が IL-1 活性抑制を生じさせるほど十分でなかったことが、実験的歯周炎惹起 4 日目から 7 日目において高頻度に破骨細胞出現が観察されるという結果の要因の一つになっている可能性が示唆された。

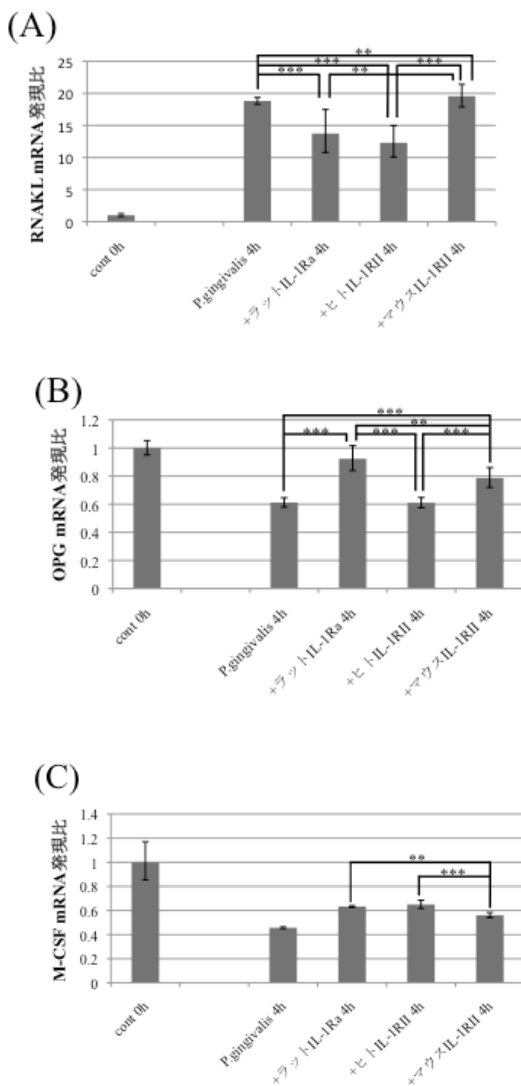


実験的歯周炎惹起歯肉組織中の IL-1 の動態  
\*\*: $P < 0.01$

#### (5) ラット骨芽細胞に対する IL-1 インヒビター (IL-1Ra, sIL-1RII) の影響

骨芽細胞は破骨細胞分化と密接な関係があることが知られており、骨芽細胞から産生される破骨細胞分化因子の動態を調べることは、炎症性骨吸収抑制のメカニズム解明に有効であると考えられるため、本研究を行った。4 時間後のラット骨芽細胞 RANKL mRNA の発現強度は、*P. gingivalis* 刺激 1 時間前にラット IL-1Ra 添加、ヒト sIL-1RII 添加したもので抑制された ( $P < 0.001$ )。OPG mRNA の発現強度は、未刺激に比べ *P. gingivalis* 単独刺激により 0.6 倍まで抑制されたのに対し、

ラット IL-1Ra 添加, マウス sIL-1RII で有意に増加した ( $P < 0.001$ ). M-CSF の発現強度は, *P. gingivalis* 単独刺激により抑制された M-CSF の発現強度を増加させる傾向は認められたが, 有意差は観察されなかった. RANKL mRNA の発現強度からラット IL-1Ra とヒト sIL-1RII をラット実験的歯周炎に抗炎症性サイトカインとして用いれば, 骨吸収の抑制に効果的である可能性が示唆された. また, Polzer らによると炎症性骨吸収には TNF のシグナルだけでなく, IL-1 のシグナルが必須であることが報告されていることから炎症性骨吸収の改善には IL-1 の活性抑制が非常に重要であり, 歯周病治療における炎症性骨吸収に対しても IL-1Ra や sIL-1RII を用いることの有用性が示唆された.



ラット骨芽細胞に対する IL-1 インヒビター + *P. gingivalis* 刺激 (MOI=100) による qPCR での mRNA 発現 \*\*: $P < 0.01$  \*\*\*: $P < 0.001$

しかし, ラットでの in vivo 実験系に IL-1

インヒビターを用いるには, 使用するインヒビターが大量に必要であり, IL-1Ra の欠損マウスを利用することにより IL-1 インヒビターの歯周炎における抗炎症作用を検討するよう実験計画を変更し, いくつかの知見を得ることができ現在研究を継続中である.

#### 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 3 件)

- ① Niedbala W, Alves-Filho JC, Fukada SY, Vieira SM, Mitani A, Sonogo F, Mirchandani A, Nascimento DC, Cunha FQ, Liew FY Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有, 108:2011, 9220-9225
- ② Matsumura Y, Mitani A, Suga T, Kamiya Y, Kikuchi T, Tanaka S, Aino M, Noguchi T Azithromycin may inhibit interleukin-8 through suppression of Rac1 and a nuclear factor-kappa B pathway in KB cells stimulated with lipopolysaccharide. J Periodontol. 査読有, 82:2011, 1623-1631
- ③ Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Kato Y, Mizutani H, Kawahara K, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K Valproic Acid increases susceptibility to endotoxin shock through enhanced release of high-mobility group box 1. Shock 査読有, 36:2011, 494-500

[学会発表] (計 7 件)

- ① 石原裕一, 水谷大樹, 伊澤有郎, 三谷章雄, 黒須康成, 川瀬仁史, 稲垣幸司, 野口俊英 IL-1Ra 欠損マウスの破骨細胞形成能と実験的歯周炎について 第135回日本歯科保存学会秋季学術大会 2011年10月21日 大阪
- ② 伊澤有郎, 石原裕一, 水谷大樹, 小林周一郎, 小澤佑介, 神谷洋介, 久保勝俊, 杉田好彦, 前田初彦, 野口俊英 IL-1Ra 欠損マウスを用いた *A. actinomycetemcomitans* 単独感染による実験的歯周炎の病態と骨関連分子の遺伝子発現 第54回秋季日本歯周病学会 2011年9月24日 下関
- ③ 水谷大樹, 石原裕一, 藤原祐子, 伊澤有郎, 小澤佑介, 神谷洋介, 近藤久貴, 西原達次, 戸刈彰史, 野口俊英 IL-1RaKO マウス腹腔マクロファージを用いた破骨細胞形成能と骨吸収活性の解析 第54回秋季日本歯周病学会 2011年9月24日 下関
- ④ 水谷大樹, 石原裕一, 伊澤有郎, 小澤佑介, 神谷洋介, 亀井英彦, 田中繁寿, 三谷章雄, 久保勝俊, 西原達次, 前田初彦, 野口俊英

IL-1Ra 欠損マウス腹腔マクロファージにおける骨吸収活性の解析 第3回口腔先端応用医学研究会 2011年1月22日 東京

⑤ 小澤佑介, 石原裕一, 水谷大樹, 伊澤有郎, 亀井英彦, 田中繁寿, 林 潤一郎, 三谷章雄, 神谷洋介, 西原達次, 前田初彦, 野口俊英 ラット実験的歯周炎における破骨細胞形成と IL-1 ファミリーの動態 第53回秋季日本歯周病学会 2010年9月19日 高松

⑥ 水谷大樹, 石原裕一, 伊澤有郎, 小澤佑介, 相野 誠, 神谷洋介, 亀井英彦, 田中繁寿, 三谷章雄, 西原達次, 前田初彦, 野口俊英 IL-1RaKO マウス腹腔マクロファージからの IL-1 産生亢進 第53回秋季日本歯周病学会 2010年9月19日 高松

⑦ Y. Ishihara, Y. Kamiya, Y. Ozawa, A. Nagahara, H. Mizutani, S. Tanaka, H. Kamei, T. Noguchi : Interleukin-1 receptor type2 production from mouse gingival epithelial cell. The 95th annual meeting of the American Academy of Periodontology (Sep 14. 2009, Boston, USA)

[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 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 裕一 (ISHIHARA YUICHI)  
愛知学院大学・歯学部・准教授  
研究者番号 : 50261011

### (2) 研究分担者

三谷 章雄 (MITANI AKIO)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号 : 50329611  
亀井 英彦 (KAMEI HIDEHIKO)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号 : 50421243

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :