

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 18 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792291

研究課題名（和文） Th-17 が抜歯窩の治癒およびオッセオインテグレーションに与える影響

研究課題名（英文） Effects of proinflammatory cytokines derived from Th-17 cells in healing of tooth extraction sockets and osseointegration

研究代表者

丸尾 勝一郎 (MARUO KATSUICHIRO)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：60593639

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、T細胞サブセットであるTh-17細胞（以下Th-17）およびTh-17から産生される炎症性サイトカインであるインターロイキン-17（以下IL-17）が抜歯窩の治癒およびインプラントと骨との結合すなわちオッセオインテグレーションへ及ぼす影響を検討することである。In vitro研究において、マウス由来骨芽細胞株化MC3T3-E1細胞（以下MC3T3-E1）を用いてIL-17の骨分化に及ぼす影響を分析したところ、特定の骨マーカーにおけるmRNA発現量の有意な増加が認められた。しかしながらラットを用いた動物実験において、ラット抜歯窩におけるTh-17およびIL-17の局在を分析したところ、両者ともほとんど発現が認められなかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to examine of the influence of Th-17 cell, one of the T-cell subsets (Th-17), and interleukin-17 (IL-17) that is a kind of proinflammatory cytokines produced by Th-17 cells on the healing process following tooth extraction and the osseointegration of dental implants. In vitro study, the effect on osteogenic differentiation of IL-17 using a mouse-derived osteoblastic cell lines, MC3T3-E1 cells (MC3T3-E1), were analyzed and identified a significant increase in mRNA expression in specific bone marker. However, in vivo study using rat models, the expression of both Th-17 and IL-17 were rarely observed when we conducted the analysis of the localization of rat extraction sockets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：Th-17, IL-17, 抜歯窩, インプラント, オッセオインテグレーション

## 1. 研究開始当初の背景

骨とチタン製インプラントが結合するオッセオインテグレーションが発見されて以来、インプラント治療は目覚ましい発展を遂げた。これまで様々な骨移植法や骨補填材が開発され、またインプラント材料の進歩によりその適応症も拡大している。しかし一方で、薬剤の進歩が局所の治癒阻害をもたらすこともある。骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネート服用患者における外科処置後の

顎骨壊死（通称 BRONJ）がそれにあたる。インプラント治療において骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨代謝疾患は十分に留意すべき疾患である。また、それら骨代謝疾患に対する治療薬を服用している患者の骨代謝状態を術前に十分に把握することは重要である。なぜなら薬剤服用中の患者へのインプラント治療において、抜歯後の治癒不全やインプラントのディスインテグレーションおよび周囲骨の異常反応を未然に防止すること

ができるからである。

近年、活性化 T 細胞が特異的に産生する炎症性サイトカインインターロイキン-17 (以下 IL-17) が関節リウマチや多発性硬化症などの骨を標的とする自己免疫疾患に深く関与する事が明らかにされた。そしてこの IL-17 を多く産生する CD4+T 細胞は 1 型ヘルパー T 細胞 (以下 Th1), 2 型ヘルパー T 細胞 (以下 Th2) および制御性 T 細胞のいずれのサブセットにも属さない Th-17 細胞 (以下 Th-17) として注目され, その分化・増殖を制御するサイトカイン (IL-6, TGF- $\beta$ , IL-23p19, IL12p35) や細胞表面マーカーなどの存在 (CCR4, CCR6) も明らかにされてきた。また, TH1 が産生する IFN- $\gamma$  や Th2 が産生する IL-4 は Th-17 の産生を阻害する事も明らかになっている。これらの発見によって Th-17 は関節リウマチや多発性硬化症など骨破壊性自己免疫疾患のみならず, 潰瘍性大腸炎やクローン病, アレルギーの新規治療ターゲットとして, あるいは感染症治療薬として大いに注目を集めている。Nam, Dら (2012) によれば, Th-17 の産生するサイトカインである IL-17 (IL-17F) は骨芽細胞の骨分化能を亢進し, 初期の骨修復に関与することが示されている。

これまで Th1 または Th2 のみが免疫活性に関わっていると考えられていた免疫学の分野において, Th-17 の発見が大きなパラダイムシフトを起こしたことは明らかである。これにより今後関節リウマチなど骨破壊を起こす様々な自己免疫疾患が解明されることが予想される。

Th-17 は歯科領域において, 局所的な慢性疾患である歯周病との関連について報告されている。歯周病患者の歯肉組織において Th-17 関連分子および IL-17 の遺伝子発現が上昇するという報告がある。しかし, 一方で IL-17 レセプターを欠くマウスにおいて歯周病による骨量減少が進行したという報告もある。つまり, 歯周病と Th-17 や IL-17 との関連は未だ明らかとなっていない。また, 抜歯窩の治癒やインプラントと骨が結合するオッセオインテグレーションとの関連についての研究は現段階で全く行われていない。

当初における我々の仮説は, Th-17 を抑制したラットにおいて抜歯窩の治癒遅延とインプラント-骨界面面積の減少することであった。これは Th-17 の抑制によって, 抜歯窩の治癒過程とそれと同じ動態で起きるオッセオインテグレーションの獲得において必須である好中球が抑制されるためである。すなわち Th-17 の全身的な動態と局所的な動態は異なることが明らかにされると我々は推測した。

今後, Th-17 関連分子および IL-17 をター

ゲットとした新薬が開発される可能性は非常に高い。顎骨は抜歯やインプラント埋入によって骨が一時的に生体外に暴露され, 感染のリスクが非常に高い。それら新薬の効果が顎骨という特殊な環境において, 抜歯窩の治癒およびオッセオインテグレーションになんらかの影響を与えることは十分に考え得る。これらの関連を調べることは将来的に臨床において抜歯やインプラント治療などの外科処置における術前のリスク診断を可能にすると考えている。

また我々はラットにおける抜歯窩の治癒を評価するモデルを以前に確立しており, その高い有用性を確認している。(下図 1) このモデルを用いて抜歯窩の評価を行っている研究は極めて少ない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は, 今後さらなる発展が予想される Th-17 関連因子を中心とする骨免疫学的見地から, Th-17 の促進および抑制が抜歯窩の治癒およびオッセオインテグレーションにどのような影響を及ぼすかを調べることである。

in vivo において, ラット抜歯窩モデルを用い, その抜歯窩の治癒と IL-17 関連サイトカインの発現の関係を調べた。また抜歯後にチタン製ピンを顎骨に埋入しオッセオインテグレーションの達成を調べた。

一方, in vitro において, IL-17 の骨芽細胞の分化・増殖に与える影響を, 骨代謝マーカーを用いて調べた。

## 3. 研究の方法

初年度には, 各種実験器具および機材の整備および以下の前実験をおこなった。新規に購入した機材として Real-Time PCR を導入した他, 実験に必要な試薬や動物用の手術器具などを購入した。

前実験として, Th-17 から産生される炎症性サイトカインである IL-17 が生体の抜歯後の治癒組織内に存在するか否かを in vivo にて調べた。Wistar 系雄性ラット (8 週齢) (n=4 or 5 or 6) の右側上顎第一臼歯を抜歯し歯周パックにて抜歯窩を閉鎖し, 1, 3 日, 1, 2, 3, 4 週の抜歯窩より採取された硬・軟組織を採取した。組織より mRNA を抽出し, 逆転写反応 (RT) より cDNA を合成し, Real-time PCR にて IL-17A および F の発現量を測定した。対照群として, 反対側同名歯牙の周囲組織を採取し, 同様の分析を行った。また抜歯窩へチタン製ピンを埋入し, そのオッセオインテグレーションを評価した。

次年度では骨免疫学的見地から IL-17 に着目し、これらサイトカインの骨分化に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。マウス由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞 (以下 MC3T3-E1) を IL-17A, IL-17F 単独 20 ng/ml で添加した骨分化誘導培地 (100 nM デキサメタゾン, 50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸, 10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸および 10% FBS を含む  $\alpha$ MEM) にて培養し、1, 3, 5, 7 日における骨分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて分析・検討した。骨分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼ (ALP), I 型コラーゲン (Col 1), 骨シアロプロテイン (BSP), Runx-2, オステオカルシン (OCN), オステリックス (Osx) を用いた。さらに MC3T3-E1 を各サイトカイン単独添加した骨分化誘導培地で 1 週間培養し、細胞数の変動を評価した。培養は無血清下および 2.5% ウシ胎児血清 (以下 FCS) 存在下において行われた。

#### 4. 研究成果

図 1 にラットの抜歯時のおよび抜去歯の写真を示す。複根であっても慎重に抜歯を行えば、根を破折することなく抜歯が可能である。

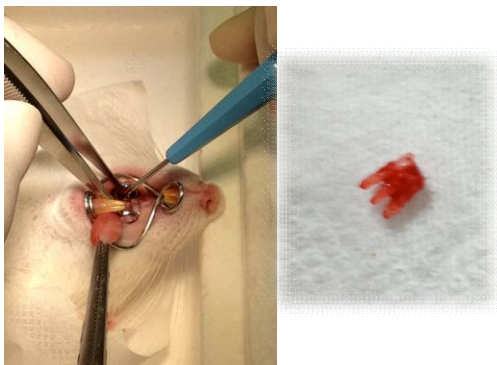


図 1 ラット抜歯時の様子および抜去歯

ラットモデルを用いた *in vitro* 研究では、抜歯窩の治癒過程初期において IL-17A の発現が上昇する傾向が観察されたが、発現量は非常に低い値を示した。一方で対照群である反対側同名歯牙の周囲組織からは、IL-17A および F はほとんど検出されなかった。

抜歯窩へのチタン製ピンの埋入実験では、数日でほとんどのラットでチタン棒が脱落したため、十分な結果を得るにはいたらなかった。

MC3T3-E1 の骨分化マーカーの変動については、無血清培養では IL-17 添加により I 型コラーゲンの発現が修復初期から上昇し、Runx2 発現、OCN 発現も遅れて (抜歯後 5 から 7 日目に) 上昇傾向を示した。しかし、ALP,

BSP, Osx については IL-17 添加による顕著な発現誘導は観察されなかった。一方、2.5% FCS 存在下での培養では、いずれの骨分化マーカーについても IL-17 無添加群と比較して著明な変動は観察されなかった。培養後 1, 3, 5, 7 日後の各骨代謝マーカーの発現を図 2 に示す。

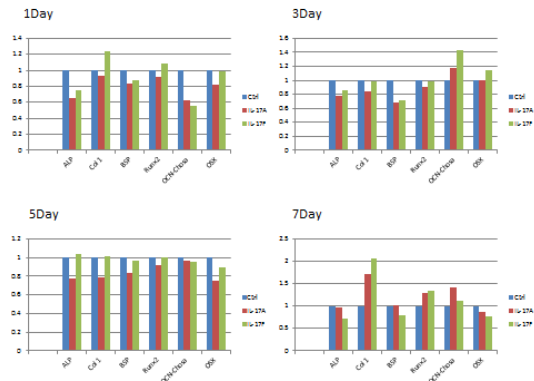
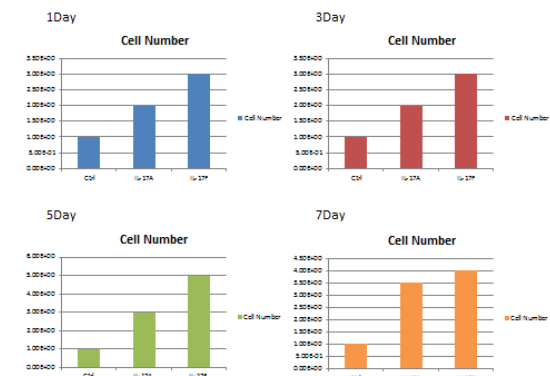


図 2 各骨マーカーの mRNA 発現量の比較

IL-17 添加後の MC3T3-E1 細胞数について検討した結果、無血清培養系では IL-17 添加の有無にかかわらず細胞増殖は見られなかったが、2.5% FCS 存在下では細胞増殖が認められ、IL-17 添加群でさらに亢進していた。その mRNA 発現量の有意な増加が認められた。サイトカイン非添加に比べ IL-17 単独添加で細胞数の増加が認められた。培養後 1, 3, 5, 7 日後の細胞数を図 2 に示す。

図 3 マウス由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞



数の比較

以上の結果よりラットはイヌやブタと比較して、多数のサンプルを扱うことが出来るだけでなく、様々な疾患モデルがあるため、今後抜歯窩の治癒の評価やソケットプリザベーションあるいは抜歯即時インプラントなど様々な研究の評価においても応用可能であり、本実験モデルの高い有用性が示された。

インプラントと骨結合すなわちオッセオ

インテグレーションについての影響は、チタン製ピンの脱落により十分な結果が得られなかった。現在、資料および実験モデルの改良を行い再度同様の実験を予定している。

全身的疾患のない健康なラットにおける健全抜歯窩からは IL-17A の発現が上昇傾向を示したが、発現量は非常に低く全身的・局所的に健全な抜歯窩からは IL-17 関連因子はほとんど検出されないことが示唆された。しかしながら、今後リウマチなど骨代謝に関わる自己免疫疾患など全身疾患、あるいは、歯周炎などによる局所的な炎症を有するモデルにおいて、同様の実験を行い IL-17 の発現を調べる予定である。

興味深い点としては、in vitro 研究におけるマウス由来の骨芽細胞に対して、IL-17 が 3 日後におけるオステオカルシンの発現を有意に増加させた。これは早期における骨形成を促進させる可能性があることが示唆され、IL-17 の骨伝導能の潜在の可能性を示しており、このような報告は他に例をみない。今後、IL-17 の骨伝導能については注意深く調べて行く必要がある。一方で細胞数は増加していることから、IL-17 が細胞増殖を促進していることも示唆され、すなわち骨芽細胞の分化を抑制している可能性がある。今後、IL-17 を亢進させた培地において、骨芽細胞および破骨細胞の分化・増殖についても評価する予定である。

今後、Th-17 および IL-17 と抜歯窩の治療およびオッセオインテグレーションについての検討を引き続き行って行きたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

なし

2013 年度内に論文投稿予定

2013 年度内に国内学会にて口頭発表予定

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸尾 勝一郎 (MARUO KATSUICHIRO)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：60593639