

## 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23年5月15日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792470

研究課題名（和文） IL-17と歯周病原細菌との相互作用から探る歯周炎病態メカニズム

研究課題名（英文） The role of interactions between IL-17 and periodontopathic bacteria in the pathogenesis of periodontitis

研究代表者

本田 朋之（HONDA TOMOYUKI）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：30447635

研究成果の概要（和文）：

ヒト歯肉上皮細胞 Epi4 において、IL-17 刺激により CXCL8 等の炎症性サイトカイン・ケモカイン産生が上昇した。IL-17 は TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインと同様に、歯肉上皮細胞に作用し自然免疫系の活性化に寄与していると考えられる。歯周病原細菌や新規炎症性サイトカイン IL-17C と IL-17A との相互作用については今後更に検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

In human gingival epithelial cell lines, Epi4 cells, IL-17 up-regulated inflammatory cytokines and chemokines including CXCL8. IL-17, as well as TNF- $\alpha$ , is involved in the regulation of the innate immune response in gingival epithelial cells. Further studies are needed to examine the roles of interactions among periodontopathic bacteria, IL-17A and IL-17C in the pathogenesis of periodontitis.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：歯肉上皮細胞, IL-17, IL-17R, *Porphyromonas gingivalis*

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎はプラーク細菌に起因する慢性感染症であるが、組織破壊の主体は宿主の免疫応答にある。歯周組織における様々なサイトカインが炎症・免疫反応を増強あるいは制御し病態形成に至る。今回注目する「IL-17」は比較的近年に同定された炎症性サイトカインであり、主に活性化 T 細胞が産生する (Yao et al. J Immunol. 1993)。我々はこれまでに、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の単核球への刺激により IL-17 発現が上昇すること、また歯周炎組織においてその発現を認めることから歯周炎における IL-17 の関与を最初に報告した (Oda et al. Oral Microbiol Immunol. 2003)。さらに我々は、歯周炎組織より樹立

した T 細胞クローンのプロファイル解析から IL-17 陽性率が高いこと (Ito, Honda et al. Oral Microbiol Immunol. 2005)、歯肉炎に比較して歯周炎組織において IL-17 遺伝子発現量が上昇していることを報告した (Honda et al. Clin Chim Acta. 2008)。

IL-17 が疾患に及ぼす影響は、モデル動物における検証を主体として慢性関節リウマチでは炎症性の結合組織・骨破壊に直接的に関与することが示されている。一方で、肺・消化管における細菌感染症では食細胞による排除機構を活性化する防御的な関与が示され、IL-17 は二面性をもつことが知られている。近年では主要な産生細胞が Th17 として認識されるに至ったが (Wynn TA. Nat Immunol. 2005)、IL-17 が関連疾患に影響す

る直接的なメカニズムは、未だ不明な部分が多く、歯周炎に対してはほとんど明らかになっていない。前述した通り我々は歯周炎において IL-17, Th17 が関与し得る多くの報告を行ってきたが、次の段階として、IL-17 が病態形成に及ぼす詳細なメカニズムを解明する必要があると考える。

IL-17 はこれまでの解析から、他の炎症性サイトカインに比較すると活性が低いが、他の炎症性サイトカインとの相乗作用により強力な炎症促進作用を発揮することが示されている(Shimada et al. J Immunol. 2002). Toll-like receptor (TLR) に認識される病原体成分との間にも同様の相互作用を認める(Ruddy et al. J Leukoc Biol. 2004). 一方で IL-17 の作用を減弱させる病原体成分の存在も報告されている(Wolf et al. Cell Microbiol. 2009). いずれにせよ IL-17 シグナル伝達系と他のサイトカインシグナルあるいは TLR シグナルがクロストークしている結果と示唆されるが、その詳細は明らかになっていない。歯周炎においては、IL-17 の単独での作用に加え、IL-17 と歯周病原細菌との相互作用に着目することが真のメカニズム解明に繋がると考える。

歯周ポケット内バイオフィームに対峙する歯肉上皮は、単に物理的なバリアーとしてだけではなく、バイオフィーム細菌に対して自然免疫の発動、獲得免疫の誘導という機能を担う。我々はこれまでに、歯肉上皮細胞において *P. gingivalis* の作用により TLR シグナル伝達系の負の制御因子である IRAK-M の発現上昇を介して最終的にケモカイン産生が抑制されることを報告した (Domon, Honda et al. J Leukoc Biol. 2008, Takahashi, Honda et al. J Periodontal Res. 2010). そして、*P. gingivalis* が宿主の免疫機構から回避する特性を発揮し、さらにこれが感染の持続に関与している可能性を考察した。

## 2. 研究の目的

本研究では IL-17 と歯周病原細菌との相互作用に着目し歯周炎の病態形成に至るメカニズムを解明する。具体的には、歯肉上皮細胞において、IL-17A, *P. gingivalis* の認識に関わる IL-17R および TLR2 の各シグナル伝達経路を明らかにするとともに、両シグナルのクロストークに関わる分子も検索していく。また、両者の相互作用により発現変動する炎症関連因子も明らかにする。

## 3. 研究の方法

ヒト歯肉上皮細胞として simian virus 40 T 抗原を遺伝子導入した不死化細胞株 Epi4 を Humedia-KG2 培地にて継代培養し実験に供した (大阪大学大学院歯学研究科口腔治

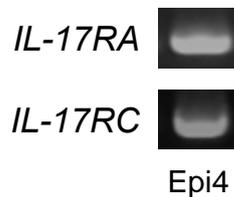
療学教室の村上伸也教授より供与)。Epi4 に対して rh-IL-17 (IL-17A/F, 100ng/mL) および *P. gingivalis* (生菌, MOI:50 ; LPS, 1 μg/ml) を用いて各単独刺激または共刺激した (12 時間)。刺激後に total RNA を抽出し、また培養上清を回収した。シグナル分子、炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現変化を Real-time PCR 法にて、培養上清中のケモカインの変化を ELISA 法にて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) IL-17 の作用

IL-17 の認識には IL-17RA および IL-17RC のヘテロダイマー受容体が関与する。Epi4 において IL-17RA および IL-17RC が恒常的に発現していることを RT-PCR 法にて確認した (図 1)。これらの受容体については、IL-17 刺激および *P. gingivalis* 刺激により遺伝子発現に変動は認められなかった。

図 1.



Epi4 に対して IL-17 を用いて刺激すると、IL-1β, IL-6, TNF-α, CXCL8 の遺伝子発現が上昇したが、CCL2 発現に変化は認められなかった(図 2)。一方、Epi4 に対して TNF-α を用いて刺激すると、これらの炎症性サイトカイン・ケモカインはいずれも上昇した。

図 2.

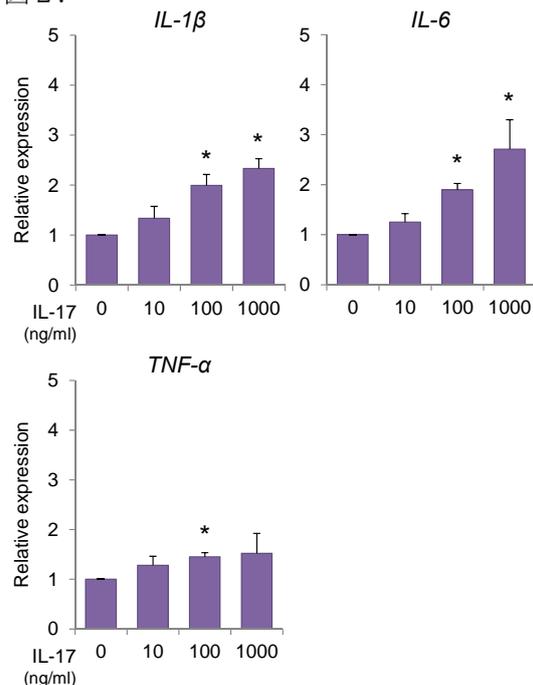
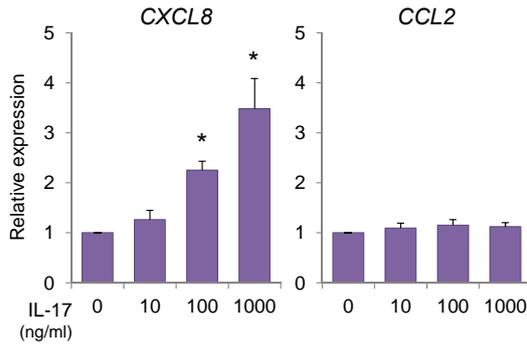


図2 (つづき)



\*:  $p < 0.05$  vs. control (unpaired t-test)

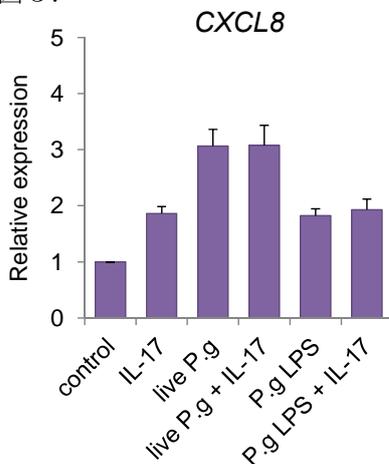
IL-17 刺激により CXCL8 発現が他の炎症性サイトカイン・ケモカインに比較して最も高く誘導された. CXCL8 の誘導は ELISA 法にてタンパクレベルでさらに確認した. そして IL-17 刺激が IL-17R を介した作用であることを中和抗体を用いて確認しており, IL-17 刺激により誘導された他の炎症関連因子による二次的な作用ではないと考える. また, CXCL8 を誘導するシグナルに NF- $\kappa$ B が関与していることを NF- $\kappa$ B の阻害剤である BAY11-7082 を用いて明らかにした.

以上の結果から, IL-17 は TNF- $\alpha$  と同様に, 歯肉上皮細胞に作用し自然免疫系の活性化に寄与していると考えられる. 歯周炎組織において上昇している IL-17 について, 歯肉上皮細胞を介した機能的な関与が明らかとなった.

### (2) IL-17A と *P. gingivalis* の相互作用

Epi4 において IL-17 と *P. gingivalis* 生菌または同菌由来 LPS を用いて共刺激し, 炎症性サイトカイン・ケモカインに及ぼす影響を検討した. その結果, 現在まで明らかな相乗効果は確認できておらず (図3), 刺激条件等に関して今後より詳細な検討が必要と考える.

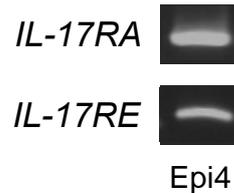
図3.



### (3) IL-17C の作用

最近, 上皮系細胞において特異的に産生され, そして上皮系細胞をターゲットとして作用する IL-17C の存在が報告された (Song et al. Nat Immunol. 2011, Ramirez-Carrozzi et al. Nat Immunol. 2011). IL-17C の認識には IL-17RA および IL-17RE のヘテロダイマー受容体が関与する. Epi4 において IL-17RA および IL-17RE が恒常的に発現していることを RT-PCR 法にて確認した (図4).

図4.



今後は, IL-17C の歯肉上皮細胞への作用も検討するとともに, IL-17A や他の炎症性サイトカイン, 細菌因子との相互作用にも着目していく予定である.

### 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6件)

(1) Okui T, Aoki Y, Ito H, Honda T, Yamazaki K. The presence of IL-17<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> double-positive cells in periodontitis.

J Dent Res. 91: 574-579, 2012. (査読あり)

DOI : 10.1177/0022034512446341

(2) Honda T, Takahashi N, Miyauchi S, Yamazaki K. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces miR-146a without altering the production of inflammatory cytokines. Biochem Biophys Res Commun. 420: 918-925, 2012. (査読あり)

DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.03.102

(3) Miyashita H, Honda T, Maekawa T, Takahashi N, Aoki Y, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K. Relationship between serum antibody titres to *Porphyromonas gingivalis* and hs-CRP levels as inflammatory markers of periodontitis. Arch Oral Biol. 57: 820-829, 2012. (査読あり)

DOI : 10.1016/j.archoralbio.2011.11.008

(4) Miyazawa H, Honda T, Miyauchi S,

Domon H, Okui T, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K. Increased serum PCSK9 concentrations are associated with periodontal infection but do not correlate with LDL cholesterol concentration. Clin Chim Acta. 413: 154-159, 2012. (査読あり)  
DOI : 10.1016/j.cca.2011.09.023

(5) Takahashi N, Okui T, Tabeta K, Yamazaki K. Effect of interleukin-17 on the expression of chemokines in gingival epithelial cells. Eur J Oral Sci. 119: 339-344, 2011. (査読あり)  
DOI : 10.1111/j.1600-0722.2011.00842.x

〔学会発表〕 (計 9 件)

(1) Honda T, Miyauchi S, Ozawa M, Murakami S, Yamazaki K. Periostin up-regulated by Th2 cytokines promotes periodontal inflammation. 91st General Session & Exhibition of the IADR, Seattle, USA, 2013 年 3 月 23 日.

(2) 本田朋之, 高橋直紀, 宮内小百合, 奥井隆文, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久.  
*Porphyromonas gingivalis* LPS が microRNA 発現に及ぼす影響. 第 135 回日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会, 大阪, 2011 年 10 月 21 日.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

本田 朋之 (HONDA TOMOYUKI)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号 : 3 0 4 4 7 6 3 5

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

高橋 直紀 (TAKAHASHI NAOKI)  
新潟大学大学院医歯学総合研究科  
宮内 小百合 (MIYAUCHI SAYURI)  
新潟大学大学院医歯学総合研究科  
奥井 隆文 (OKUI TAKAFUMI)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員