

## 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16日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792479

研究課題名（和文）歯周炎病変局所へのTh17細胞浸潤機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of Th17 cells migration in periodontally diseased tissues.

## 研究代表者

細川 義隆 (HOSOKAWA YOSHITAKA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90346601

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では歯周組織構成細胞の一つであるヒト歯肉線維芽細胞（HGFs）を用い、Th17細胞が産生するIL-17Aおよび新規サイトカインであるTWEAKに歯周炎病態形成に関与しているTh17細胞を浸潤させるCCL20を産生を誘導するかどうかを明らかにするため研究を行った。その結果、IL-17AとTWEAKはIL-1 $\beta$ が誘導したHGFsのCCL20産生を相乗的に増強する事が明らかとなった。これらのことより、IL-17AとTWEAKはHGFsのCCL20産生を誘導することによりTh17細胞浸潤を促進し、歯周炎の病態形成に関与していることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We examined the effect of IL-17A or TWEAK on CCL20 production from IL-1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts (HGFs) in this study. We found that IL-17A or TWEAK could synergistically enhance CCL20 production from IL-1 $\beta$ -stimulated HGFs. Therefore, IL-17A and TWEAK are involved in Th17 cells migration in periodontally diseased tissues to induce CCL20 production in HGFs. These results might explain that IL-17A and TWEAK are related to the exacerbation of periodontal disease.

## 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：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：歯周炎、Th17、ケモカイン、線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病はデンタルプラークを構成する歯周病関連細菌により惹起される慢性炎症性疾患であり、その発症・進行には宿主の免疫応答が関与していることが明らかとなっている。歯周病病変局所にはリンパ球をはじめとした様々な免疫担当細胞が認められ、歯周組織破壊に関与していると考えられている。

近年、Th17細胞と呼ばれる新たなhelper T細胞サブセットが存在することが明らかとなった。Th17細胞は特徴としてIL-17Aを産生し、ROR $\gamma$ Tと呼ばれる転写因子を発現し

ていることが報告されている（Ivanov et al., Cell 126(6) 1121-1133, 2006）。また、慢性関節リウマチマウスモデルにおいて、Th17細胞は他のhelper T細胞と比較し破骨細胞を増殖させることが出来るとともに、IL-17を産生することにより、滑膜細胞のRANKL産生を誘導することで破骨細胞がしやすい環境を作り出していることが明らかとなった（Satoら, J Exp Med., 203(12) 2673-2682, 2006）。歯周病は慢性関節リウマチと同様に骨吸収を主な症状とする疾患である。また、IL-17Aが歯周病病変局所に発現しているこ

とは明らかとなっており歯周炎の病態に関与している事は示唆されているが (Takahashi et al., J Clin Periodontol., 32(4), 369-374, 2005)、Th17 細胞の歯周病病変局所での存在、浸潤機構、活性化機構は明らかとされていない。

近年、Th17 細胞特異的に CC chemokine receptor の一つである CCR6 が発現していることが明らかとなった (Hirota et al., J Exp Med., 204(12), 2803-2812, 2007)。我々は、歯周炎において CD4 陽性 CCR6 陽性細胞が浸潤していること、また、歯周組織構成細胞の一つである歯肉線維芽細胞が proinflammatory cytokine である IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  刺激により CCR6 のリガンドのケモカインである CCL20 を産生しうること、歯周病病変局所に CCL20 が存在していることを報告している (Hosokawa et al., Clin Exp Immunol., 128(3), 548-554, 2002、Hosokawa ら, Clin Exp Immunol., 142(2), 285-291, 2005)。しかしながら、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  が誘導する CCL20 産生を他のサイトカインがどのように影響を与えるか不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究において、Th17 細胞が産生するサイトカインである IL-17A および新規の TNF superfamily サイトカインである Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) に着目し、IL-17A および TWEAK が IL-1 $\beta$  が誘導するヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) の CCL20 産生に与える影響を解析する事を目的とし、研究を行った。また、どのシグナル伝達経路に対して IL-17A や TWEAK が影響を及ぼすかに関して CCL20 産生に関与している事が明らかとなっている MAPK および NF- $\kappa$ B に着目し解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト歯肉組織試料の採取および HGFs の調整 : 矯正治療のための便宜抜歯を行う患者において、抜歯部位のポケット深さが 3mm 以下で BOP を認めないことを確認した後、抜歯時に得られた歯肉片を正常歯肉組織として採取した。採取した正常歯肉組織から outgrowth 法を用い、HGFs を得た。

(2) 歯肉線維芽細胞からの CCL20 産生の解析 : (1) の条件で採取した HGFs を IL-1 $\beta$  存在下あるいは非存在下で IL-17A あるいは TWEAK で 24 時間刺激した。その後、培養上清を採取し、ELISA 法にて CCL20 濃度を

解析した。シグナル伝達機構を確認する実験においては、SB203580 (p38 MAPK inhibitor)、PD98059 (MEK inhibitor)、SP600125 (JNK inhibitor) あるいは SC514 (NF- $\kappa$ B inhibitor) において 1 時間前処理した後、IL-1 $\beta$  と IL-17A あるいは IL-1 $\beta$  と TWEAK で刺激を行い、培養上清中の CCL20 濃度を ELISA 法を用い解析した。

(3) IL-1 $\beta$ 、IL-17A あるいは TWEAK 刺激により活性化されたシグナル伝達経路の解析 : (1) の条件で採取した HGFs を IL-1 $\beta$ 、IL-17A、TWEAK 単独刺激、IL-1 $\beta$  と IL-17A あるいは IL-1 $\beta$  と TWEAK 共刺激で 15 分、30 分あるいは 60 分刺激した後、タンパクを回収した。その後、western blot 法を用い、p38 MAPK、ERK、JNK あるいは I $\kappa$ B- $\alpha$  のリン酸化あるいは I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解を解析した。

## (4) HGFs の IL-17 receptor 発現の解析 :

(1) の条件で採取した HGFs を IL-1 $\beta$  で 24 時間処理した後、細胞を回収し、flow cytometry を用い、HGFs 表層の IL-17 receptor A (IL-17RA) あるいは IL-17 receptor C (IL-17RC) の発現を解析した。

## 4. 研究成果

(1) IL-17A および TWEAK が IL-1 $\beta$  刺激 HGFs の CCL20 産生に与える影響 : IL-1 $\beta$  により誘導された HGFs の CCL20 産生は IL-17A あるいは TWEAK 刺激により相乗的に増強された。

(2) IL-1 $\beta$  と IL-17A 刺激あるいは IL-1 $\beta$  と TWEAK 刺激 HGFs から産生する CCL20 産生に関与するシグナル伝達経路の解析 : IL-1 $\beta$  と IL-17A あるいは IL-1 $\beta$  と TWEAK 刺激により誘導された HGFs の CCL20 産生は p38 MAPK 阻害剤、ERK 阻害剤および NF- $\kappa$ B 阻害剤により有意に抑制された。ゆえに p38 MAPK、ERK、NF- $\kappa$ B を介するシグナル伝達経路が IL-1 $\beta$ /IL-17A あるいは IL-1 $\beta$ /TWEAK 誘導 CCL20 産生に関与している事が示された。

(3) IL-17A が IL-1 $\beta$  刺激 HGFs の MAPKs および NF- $\kappa$ B の活性化に与える影響 : IL-17A は IL-1 $\beta$  刺激 HGFs の ERK および I $\kappa$ B- $\alpha$  リン酸化と I $\kappa$ B- $\alpha$  分解をより増強した。ゆえに IL-17A は ERK と NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路をより活性化する事により CCL20 産生を増強している事が示された。

(4) TWEAK が IL-1 $\beta$  刺激 HGFs の MAPKs および NF- $\kappa$ B の活性化に与える影響 :

TWEAK は IL-1 $\beta$ 刺激 HGFs の ERK, JNK および I $\kappa$ B- $\alpha$ リン酸化をより増強した。ゆえに IL-17A は ERK, JNK および NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路をより活性化することにより CCL20 産生を増強している事が示された。

(5) IL-1 $\beta$ が IL-17 receptor 発現に与える影響: IL-1 $\beta$ 刺激により IL-17RA 発現は変化しなかったが IL-17RC 発現が抑制された。ゆえに IL-1 $\beta$ が IL-17RC 発現を亢進させることにより IL-17A の影響が増強され、CCL20 産生が増加している可能性が示された。

#### 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 3 件)

- ① Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis increases CC chemokine ligand 20 production in interleukin 1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts., *Human Immunology*, 73 巻、470-473 頁 (2012 年) 査読有  
DOI: 10.1016/j.humimm.2012.02.021.
- ② Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, Interleukin (IL)-17A synergistically enhances CC chemokine ligand 20 production in IL-1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts., *Human Immunology*, 73 巻、26-30 頁 (2012 年) 査読有  
DOI: 10.1016/j.humimm.2011.10.004.
- ③ Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Tadashi Nakanishi, Hideaki Nakae, Takashi Matsuo, Black tea polyphenol inhibits CXCL10 production in oncostatin M-stimulated human gingival fibroblasts., *International Immunopharmacology*, 11 巻、670-674 頁 (2011 年) 査読有  
DOI: 10.1016/j.intimp.2011.01.009.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo: The effect of adrenomedullin on human Th17 cells differentiation, 第 60 回国際歯科研究学会日本部会学術大会 (2012. 12. 14, 新潟コンベンションセ

ンター、新潟県)

- ② 細川義隆, 細川育子, 尾崎和美, 中江英明, 松尾敬志: IL-17A は TNF- $\alpha$ が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生を増強する, 第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2012. 11. 23, 広島国際会議場、広島県)
- ③ 細川育子, 細川義隆, 尾崎和美, 松尾敬志: Adrenomedullin が樹状細胞の Th17 細胞関連サイトカイン産生に及ぼす影響, 第 137 回日本歯科保存学会学術大会 (2012. 11. 23, 広島国際会議場、広島県)
- ④ 石川真琴, 吉田賀弥, 藤原奈津美, 細川義隆, 細川育子, 尾崎和美: 歯周病原性細菌 Porphyromonas gingivalis 感染が肝臓糖代謝に及ぼす影響, 第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2012. 11. 23, 広島国際会議場、広島県)
- ⑤ 細川義隆, 細川育子, 尾崎和美, 中西正, 中江英明, 松尾敬志: TNF- $\alpha$ と IL-4 刺激が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL11 産生に及ぼす緑茶カテキンの影響, 第 136 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2012. 6. 28, 沖縄コンベンションセンター、沖縄県)
- ⑥ 細川義隆, 細川育子, 尾崎和美, 中江英明, 松尾敬志: IL-22 は IL-1 $\beta$ が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生を増強する, 第 55 回日本歯周病学会春季学術大会 (2012. 5. 18, 札幌コンベンションセンター、北海道)
- ⑦ 細川義隆, 細川育子, 尾崎和美, 中江英明, 松尾敬志: TWEAK がヒト歯肉線維芽細胞の IL-1 $\beta$ 誘導 CCL20 産生に与える影響, 第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2011. 10. 20, 大阪国際交流センター、大阪府)
- ⑧ 細川義隆, 細川育子, 尾崎和美, 中西正, 中江英明, 松尾敬志: Theaflavin が TNFSF14 刺激ヒト歯肉線維芽細胞の IL-6 産生に及ぼす影響, 第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2011. 6. 9, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート、千葉県)
- ⑨ 尾崎和美, 藤原奈津美, 石川真琴, 細川育子, 細川義隆, 湯本浩通: う蝕関連細菌の家族内伝播と生活習慣による影響に関する検索一兄弟姉妹間の差異について一, 第 134 回日本歯科保存学会春季

学術大会 (2011.6.9, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート、千葉県)

- ⑩ 細川義隆、細川育子、尾崎和美、中江英明、松尾敬志: TLR3 ligand がヒト歯肉線維芽細胞の IL-1 $\beta$ 誘導 CCL20 産生に与える影響、第 54 回日本歯周病学会春季学術大会 (2011.5.27, 福岡国際会議場、福岡県)
- ⑪ 進藤智、細川義隆、細川育子、尾崎和美、中西正、中江英明、松尾敬志: Oncostatin M が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に及ぼす紅茶ポリフェノールの影響、第 54 回日本歯周病学会春季学術大会 (2011.5.27, 福岡国際会議場、福岡県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細川 義隆 (HOSOKAWA YOSHITAKA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号: 90346601

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし