

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593137

研究課題名(和文) IL-1Ra欠損マウスを用いた歯周組織破壊におけるIL-1Raの影響

研究課題名(英文) Effect of IL-1Ra in periodontal tissue destruction with IL-1Ra-deficient mice

研究代表者

石原 裕一 (ISHIHARA, YUICHI)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50261011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：IL-1RaKOマウスは野生型マウスに比べ、炎症性サイトカインの有意に高いmRNA発現が認められたことから、IL-1RaKOマウスは野生型マウスに比べ、容易に歯周病を発症させることができるのではないかと考え、両マウスに実験的歯周炎を惹起し、比較検討を行った。A. actinomycetemcomitans 感染IL-1Ra KOマウスでは歯槽骨表面が粗造となり、下顎第二臼歯歯間部と歯根分岐部に歯槽骨吸収が観察された。また、IL-1RaKOマウスの骨芽細胞を歯周病細菌刺激したところ、骨吸収に働く遺伝子の発現は増加しており、骨形成に働く遺伝子の発現は低下していた。

研究成果の概要(英文)：The interleukin (IL)-1 receptor antagonist (Ra) binds to IL-1 receptors and inhibits IL-1 activity. However, it is unclear whether IL-1Ra plays a protective role in periodontal disease. This study was undertaken to compare experimental periodontitis induced by Aggregatibacter actinomycetemcomitans in IL-1Ra knockout (KO) mice vs wild type (WT) mice. Computed tomography (CT) analysis, and hematoxylin eosin (H&E) and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining were performed. Infected IL-1Ra KO mice exhibited bone loss in furcation areas and alveolar fenestrations. Considering from the all results, IL-1Ra inflammatory bone resorption in experimental periodontitis induced by A. actinomycetemcomitans down-osteoclast differentiation and up-osteoblast differentiation and calcification. In short, these data suggest that an IL-1Ra may serve as a potential therapeutic drug for periodontal disease.

研究分野：歯周治療系歯学

 キーワード：インターロイキン-1 歯周炎 炎症性骨吸収  
 インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト サイトカイン  
 遺伝子改変マウス 歯周治療薬 実験的

## 1. 研究開始当初の背景

近年、IL-1Raをはじめとする抗炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカイン抗体などは、生物学的製剤として、関節リウマチの治療に利用されている。関節リウマチは歯周病の病因と異なるものの、関節局所において歯周炎と類似した炎症性骨吸収が引き起こされる疾患である。しかし、局所の病態が類似した歯周病では、生物学的製剤の利用は、ほとんどされていない。そこで、抗炎症性に働くIL-1Raについて、当時東京大学岩倉研究室で開発されたIL-1Ra遺伝子欠損マウスは高度に進行した関節炎を起こすことが報告されていたが、歯周炎については調べられていなかったため、このマウスを利用してIL-1Raの歯周組織破壊におけるはたらきと治療薬の可能性について探ることとした。

## 2. 研究の目的

歯周炎の発症・進行にはIL-1が密接に関与していると考えられている。またIL-1はIL-1レセプターに拮抗的に結合するIL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)により活性調節されていることが*in vitro*の実験系で主に明らかとなっている。いずれの研究も臨床的にIL-1Raのマーカーとしての可能性を探る研究がほとんどであり、IL-1Raが炎症性歯槽骨吸収に対し抑制的に働いているかどうかなどを調べた研究はまだない。そこで、IL-1Ra遺伝子欠損マウスに実験的歯周炎を起こしてIL-1Raの歯周組織破壊における機能解析を行うことを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 腹腔Mからの炎症性サイトカイン産生に対する影響

13週齢のIL-1RaKOおよび野生型マウスにチオグリコレート培養液2ml(ニッスイ)を腹腔内注射し、3日後、腹腔マクロファージ(M)を腹腔内洗浄により回収する。得られた腹腔M  $1.0 \times 10^6$  cell/well は *A. actinomycetemcomitans* ATCC29524株LPS 200  $\mu$ g/wellで刺激後に細胞と培養上清を回収し、培養上清中のサイトカイン量はELISA(R&D)にて測定し、細胞中のサイトカインmRNA発現はRT-PCRまたはqPCR法にて測定する。

### (2) 骨芽細胞からの骨関連因子発現に対する影響

5日齢マウス頭蓋骨よりコラゲナーゼ1mg/ml(Wako #034-10533)処理にて骨芽細胞を採取し、増殖の安定した細胞株を保存し、

経代数3代の株を実験に使用する。細胞数を  $3.3 \times 10^5$  cell/well に調整後、*A. actinomycetemcomitans* ATCC29524株生菌(MOI=100)およびLPSで12時間刺激後、RNAを抽出にはTRIzol(invitrogen)を用い、骨吸収関連因子としてRANKL、M-CSF、骨芽細胞の分化に関してはRUNX2、ALP、OCN/BGP、およびBSPをqPCR法にて測定する。骨芽細胞の石灰化は培養20日目の骨芽細胞をアリザリンレッドS(sigma)にて染色し、比色により石灰化の程度を判定する。

### (3) 歯周病関連細菌単独感染による実験的歯周炎の形態学的(免疫組織学的)解析

IL-1RaKOおよび野生型マウスに *A. actinomycetemcomitans* 菌体浮遊液( $1 \times 10^{10}$  cells/ml)300  $\mu$ lを合計5回投与後6週で屠殺する。屠殺したマウスは通常法に従って頭部のみ10%中性ホルマリン溶液で固定後、10%EDTA・2NA溶液で脱灰を行った。次に上下顎骨をパラフィンにて包埋して、ミクロトームにて厚さ4  $\mu$ mの近遠心方向の連続切片を作成する。組織切片はH-E染色とTRAP染色後、光学顕微鏡で主に上顎第1臼歯と第2臼歯の歯周組織を検索する。また10%中性ホルマリン溶液で固定後には、Micro-focused Computed Tomography( $\mu$ -CT TRI/3D-BON)(所属機関保有設備)にて撮影を行い、画像構築用ソフトを使用し、3D画像での観察と残存骨量を計測・数値化する。

### (4) IL-1Raのヒト上皮細胞からの接着分子発現に与える影響について

ヒト歯肉上皮細胞(Ca9-22)に対し、Lipofectamine® RNAiMAXによりIL-1RaのmRNAをノックダウンし、その後qPCR法とウエスタンブロット法にて、IL-1Raノックダウンを検証したのち、PCRアレイにて、細胞外マトリックスと接着分子に関する半網羅的な遺伝子検索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 腹腔Mからの炎症性サイトカイン産生

qPCR法による各群の相対比較では、*A. actinomycetemcomitans* LPS刺激したIL-1RaKOマウスは野生型マウス腹腔マクロファージに比べてIL-1 mRNAは約1.6倍(図1A)、IL-1 mRNAは約3.5倍(図1B)、IL-6 mRNAは約2.2倍(図1D)と有意に高い発現を認めた。

また、*A. actinomycetemcomitans* LPS未刺激時でも、IL-1Ra欠損マウスは野生型マウスに比べて、炎症性サイトカインmRNAの有意に高い発現を認めた(図1A-D)。IL-1KOマウス

スでは野生型マウスに比べて炎症惹起時における TNF- $\alpha$  や IL-6 の産生が少ないことや、肺胞マクロファージからの IL-1 と TNF- $\alpha$  産生を IL-1Ra が抑制したこと、さらに、IL-1Ra KO マウスの肝細胞は未刺激でも高い NF- $\kappa$ B の転写活性を有していたことが報告されている。これらのことから、LPS あるいは IL-1, TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン刺激が細胞内の NF- $\kappa$ B 活性化を介して IL-1, TNF- $\alpha$ , および IL-6 mRNA の転写を互いに活性化し、これを IL-1Ra が制御しているのではないかと考えられた。したがって、IL-1Ra は IL-1 に特異的なインヒビターであるものの、間接的に TNF- $\alpha$  や IL-6 を顕著におさえる抗炎症性サイトカインであると考えられる。

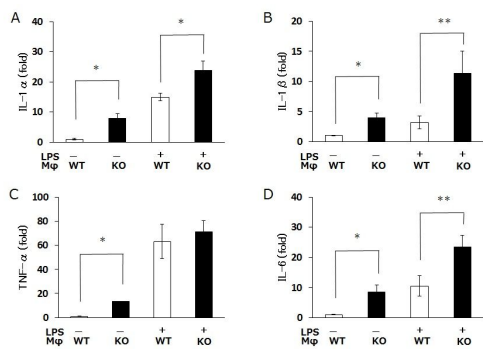
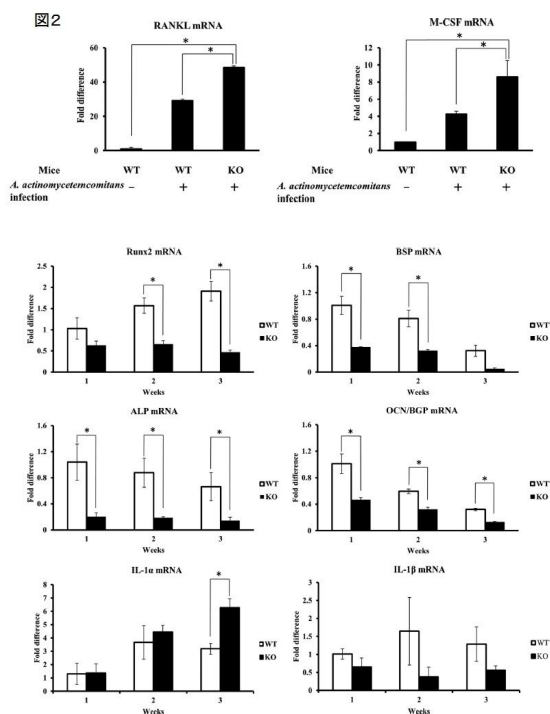


図1 Mizutani H et al J Periodontol Res. 48(6):748-756 2013.

## (2) 骨芽細胞からの骨関連因子発現

それぞれのマウスから採取した骨芽細胞を *A. actinomycetemcomitans* 菌刺激したところ、骨吸収に働く RANKL, M-CSF の発現は IL-1RaKO マウスで増加しており、骨形成に働く、RUNX2, ALP, OCN/BGP, および BSP 発現は低下していた (図2)。



## (3) 歯周病関連細菌単独感染による実験的歯周炎の形態学的(免疫組織学的)解析

13週齢 IL-1Ra KO マウスと野生型マウスの口腔内にカルボキシメチルセルロース溶液にて調製した *A. actinomycetemcomitans* (ATCC29524 株) 菌体浮遊液を1日おきに5回経口投与した。菌体浮遊液投与終了45日後に屠殺し、下顎骨を採取した。その後、歯槽骨破壊の程度を  $\mu$ CTにて確認した後、組織切片を作製し H-E 染色と TRAP 染色を行った。*A. actinomycetemcomitans* 血清抗体価は IL-1Ra KO マウスにおいて有意に増加しており、このことは局所型侵襲性歯周炎患者末梢血単球を Pokeweed mitogen で刺激した時 IgG2 産生が IL-1Ra によって抑制されていた。マイクロ CT による実験的歯周炎惹起後の歯槽骨変化を観察したところ、*A. actinomycetemcomitans* 感染 IL-1Ra KO マウスでは歯槽骨表面が粗造となり、歯槽骨頂部は歯槽骨吸収を伴う不整な形態が観察され、下顎第二臼歯の近遠心接触点下部の槽間中隔と根分歧部に明らかな歯槽骨の吸収が観察された (図3A)。さらに、下顎第二臼歯近心舌側の歯槽骨残存度を測定したところ、*A. actinomycetemcomitans* 感染 IL-1Ra KO マウスは未処置 IL-1Ra KO マウス、未処置野生型マウスおよび *A. actinomycetemcomitans* 感染野生型マウスと比較して約 30%、歯槽骨残存度が有意に低下していた。H-E 染色による実験的歯周炎惹起後の歯周組織変化を観察したところ、*A. actinomycetemcomitans* 感染野生型マウスでは、上皮突起の伸張や歯肉固有層での結合組織線維の走行の乱れや歯槽骨頂部における炎症性細胞浸潤は観察されなかったのに対し、*A. actinomycetemcomitans* 感染 IL-1Ra KO マウスでは歯肉頂部に辺縁不整な上皮と結合組織線維の走行の乱れ、上皮直下に炎症性細胞浸潤、付着の喪失が観察された (図3B)。*A. actinomycetemcomitans* 感染 IL-1Ra KO マウスは *A. actinomycetemcomitans* 感染野生型マウスと比較して歯肉固有層直下の骨頂部だけでなく、槽間中隔表層と根間中隔表層と骨髄側に TRAP 陽性細胞が観察された (図3C)。

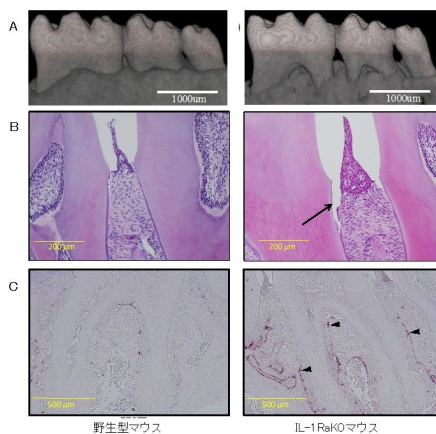


図3 Iizawa A et al Infect Immun 82:1904-1913 2014.

#### (4) IL-1Ra のヒト上皮細胞からの接着分子発現に与える影響

RNA 干渉による細胞増殖への影響について、位相差顕微鏡像と生細胞数をノックダウン群とコントロール群で調べたところ有意差は認められなかった。RNA 干渉による IL-1Ra 遺伝子発現は約 1/10 まで抑制されていた。PCR アレイを行ったところ、コントロール群と比較し、ノックダウン群においてマトリックスメタロプロテアーゼ 13 (以下、MMP-13) 遺伝子発現の増加が認められた。そこで、IL-1Ra 欠損マウス群と野生型マウス群に実験的歯周炎を惹起し、下顎骨を採取し、免疫組織学的観察と歯肉組織中の MMP-13 タンパク発現を ELISA 法で比較検討した。その結果、*A. actinomycetemcomitans* 感染 IL-1Ra 欠損マウスの接合上皮中の MMP-13 濃度は、*A. actinomycetemcomitans* 感染野生型マウスに比べ有意に高い発現増加が認められた(図 4)。

実験的歯周炎マウス歯肉組織でのMMP-13タンパク発現比較

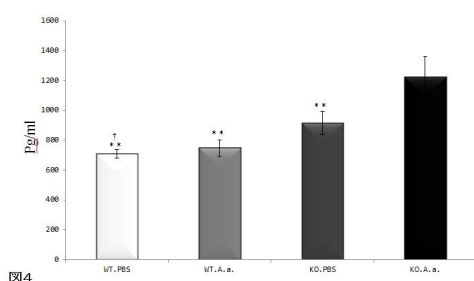


図4

以上の結果から、IL-1Ra が MMP-13 発現を抑制することにより、ラミニン 5 の分解を促進し、インテグリン 6 4 で形成されるヘミデスモゾーム結合の破壊し、上皮性付着の喪失抑制に関与している可能性が示唆された。

#### 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 8 件)

石原裕一, 亀井英彦, 神谷洋介, 伊澤有郎, 水谷大樹, 鈴木万里代, 野口俊英, 三谷章雄 IL-1 ファミリーと IL-1 受容体: 歯周病疾患マーカーや治療薬としての可能性 日歯周誌 査読無 56、2014、272-280

Kato Y, Hagiwara M, Ishihara Y, Isoda R, Sugiura S, Komatsu T, Ishida N, Noguchi T, Matsushita K TNF- $\alpha$  augmented Porphyromonas gingivalis invasion in human gingival epithelial cells through Rab5 and ICAM-1 BMC Microbiol. 査読有、Vol.14、2014、229  
Kamei H, Ishihara Y, Fuma D, Niwa T,

Kamiya Y, Yokoi T, Suzuki M, Izawa A, Mizutani H, Hayashi J, Sakaki Y, Noguchi T, Kojima T, Interleukin-1 receptor gene variants are associated with aggressive periodontitis in Japanese, Arch. Oral Biol., 査読有、Vol.59、2014、756-763

Takeda H, Kikuchi T, Soboku K, Okabe I, Mizutani H, Mitani A, Ishihara Y, Noguchi T, Effect of IL-15 and Natural Killer Cells on Osteoclasts and Osteoblasts in a Mouse Coculture, Inflammation, 査読有、Vol.37、2014、657-669

Kamiya Y, Ishihara Y, Kamei H, Ozawa Y, Mizutani H, Kubo K, Maeda H, Noguchi T, Modern Research in Inflammation, 査読有、Vol.3、2014、37-47

Izawa A, Ishihara Y, Mizutani H, Kobayashi S, Goto H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Sugita Y, Kubo K, Kamei H, Kikuchi T, Mitani A, Hayashi J, Nishihara T, Maeda H, Noguchi T. Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by *Aggregatibacter*

*actinomycetemcomitans* in IL-1Ra knockout mice, Infect Immun. 査読有、Vol.82、2014、1904-1913

Suga T, Mitani A, Mogi M, Kikuchi T, Fujimura T, Takeda H, Hishikawa T, Yamamoto G, Hayashi J, Ishihara Y, Noguchi T, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

lipopolysaccharide stimulated epithelial cells produce interleukin-15 that regulates T cell activation., Arch. Oral Biol., 査読有、Vol.58、2013、1541-1548

Mizutani H, Ishihara Y, Izawa A, Fujihara Y, Kobayashi S, Gotou H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Kamei H, Kikuchi T, Yamamoto G, Mitani A, Nishihara T, Noguchi T, Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* upregulates inflammatory cytokines, PGE<sub>2</sub> synthesis, and osteoclast formation in IL-1Ra deficient mice, J Periodont. Res., 査読有、Vol.48、2013、748-756

[学会発表](計 5 件)

後藤久嗣, 石原裕一, 伊澤有郎, 岡部栄治郎, 久保勝俊, 杉田好彦, 前田初彦, 野口俊英, 三谷章雄 Interleukin-1 receptor antagonist は歯肉上皮細胞からの Matorix metalloproteinase 13 発現を抑制する第 57 回 秋季日本歯周病学会学術大会 神戸国際展示場(兵庫) 2014 年 10 月 19 日

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教  
研究者番号： 50624326

小澤佑介, 石原裕一, 亀井英彦, 水谷大樹, 伊澤有郎, 岡部栄治郎, 後藤久嗣, 久野 茜, 須川雄司, 猪子将成, 神谷洋介, 野口俊英 末梢血血清中の可溶性インターロイキン-1 補助タンパクの歯周病マーカーとしての可能性第 8 回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会 松本歯科大学 (長野) 2013 年 10 月 6 日

後藤久嗣, 石原裕一, 伊澤有郎, 岡部栄治郎, 久保勝俊, 杉田好彦, 前田初彦, 野口俊英 IL-1Receptor antagonist の RNA 干渉がヒト歯肉上皮細胞の接着分子発現へ及ぼす影響第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会 前橋市民文化会館 (群馬) 2013 年 9 月 22 日

石原裕一, 水谷大樹, 伊澤有郎, 藤原祐子, 小澤佑介, 三谷章雄, 亀井英彦, 神谷洋介, 近藤久貴, 久保勝俊, 杉田好彦, 小林周一郎, 西原達次, 戸苅彰史, 前田初彦, 野口俊英

IL-1Ra 欠損マウスでの破骨細胞形成能と炎症性骨吸収亢進に関する研究第 22 回日本歯科医学会総会 大阪国際会議場 (大阪) 2012 年 6 月 29 日

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 *A. actinomycetemcomitans* 菌刺激した IL-1Ra 欠損マウス由来骨芽細胞の造骨系骨関連遺伝子発現 第 55 回春季日本歯周病学会学術大会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2012 年 5 月 18 日

〔図書〕(計 1 件)

石原裕一 医歯薬出版株式会社(東京)  
第 2 章 サイトカインを制御する関節リウマチの治療法から得るヒント 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ患者さんの生涯にわたる QOL に貢献するために 76-77、2014 年 2 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 裕一 (ISHIHARA, Yuichi)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号： 50261011

(2) 研究分担者

野口 俊英 (NOGUCHI Toshihide)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号： 50014262  
平成 26 年 3 月 18 日退職のため辞退

三谷 章雄 (MITANI Akio)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号： 50329611

小澤 佑介 (OZAWA Yusuke)