

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463216

研究課題名(和文) IL-10応答を中心とした歯周病原細菌感染に対する慢性炎症成立機構の基盤解明

研究課題名(英文) The role of IL-10 in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease

研究代表者

中島 貴子 (Nakajima, Takako)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：40303143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗炎症性サイトカインIL-10を中心とした歯周炎の発症・進行抑制に対する効果を検討した。ヒト歯周炎患者の歯肉病変部では歯肉炎に比較してIL-10が有意に高いレベルで検出された。マウス絹糸結紮歯周炎モデルにおいて、口腔細菌の増加、歯肉の著明な炎症、歯槽骨吸収と同時に、歯肉でのIL-10発現の上昇を認めた。このモデルにおいて歯肉局所にIL-10を直接投与すると炎症、骨吸収の抑制作用は認められなかったが、腹腔投与すると歯肉の炎症性サイトカインは抑制しないが歯槽骨吸収は抑制傾向が認められた。歯周炎の骨吸収は局所の炎症のみでなく、全身性に制御されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effect of anti-inflammatory cytokine, IL-10, on inhibition of periodontitis was analyzed. Higher level of IL-10 gene expression was observed in human periodontitis tissues compare to gingivitis tissues. Ligature-induced periodontitis mice model demonstrated both gingival inflammation and bone resorption. Intraperitoneal injection of IL-10 but not direct injection of IL-10 into gingiva protected alveolar bone resorption in this mice model. However systemic IL-10 had no effect on inflammatory cytokine level in gingival tissues. Not only periodontal inflammation but also systemic responses may control periodontal bone resorption.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 IL-10 マウス 抗炎症

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は感染症であるが、感染の排除は難しく、慢性炎症の持続という経過をたどる。ヒト歯周炎歯肉組織では IL-4 や IL-10 という Th2 サイトカインの産生と NKT 細胞、制御性 T 細胞といった免疫調節性細胞の浸潤が認められる。マウスに歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* を経口感染させた歯周炎モデルでは、血中の抗 *P. gingivalis* 特異抗体レベルが上昇し、肝臓や脾臓において Th2 免疫応答が誘導され、*P. gingivalis* には慢性炎症を引き起こす性質があることが示唆されている(Aoki-Nonaka et al. 2014)。IL-10 の転写因子である E4BP4 は Th1 細胞に強制発現させることにより IL-10 を産生するようになることが報告された。IL-10 は代表的な抗炎症性サイトカインであり、慢性炎症の成立・維持に欠かせないものとして重要視されている。

2. 研究の目的

歯周炎の慢性化機構解明を目指し、代表的な歯周病原細菌である *P. gingivalis* に対する IL-10 を中心とした免疫応答を歯周組織局所レベル、全身応答レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ヒト歯周炎歯肉組織の IL-10 発現解析: 歯周炎歯肉組織での IL-10 およびその転写因子 E4BP4 の発現を RT-PCR 法にて解析した。
- (2) *P. gingivalis* 刺激による免疫担当細胞からの IL-10 産生の解析: マウス単球細胞株 THP-1 ならびに Raw cell を *P. gingivalis* LPS にて刺激培養し IL-10 の発現を RT-PCR 法にて解析した。
- (3) マウス *P. gingivalis* 経口感染歯周炎モデルの解析: 6 週齢の C57BL/6 マウスに *P. gingivalis* W83 株 1×10^9 colony-forming units をフィーディングニードルにて口腔から投与した。1 週間に 2 回、合計 10 回投与後に安楽死させ、歯肉組織、腸管における IL-10 を含めた炎症関連分子の発現を RT-PCR 法にて解析した。

(4) マウス絹糸結紮歯周炎モデルの解析: 著明な歯肉炎症を伴う歯槽骨吸収モデルとして、6 週齢の C57BL/6 マウスの臼歯歯頸部に絹糸を結紮する歯周炎モデルを作成した。

炎症性骨吸収の評価: 歯槽骨吸収をマイクロ CT にて、歯肉の炎症を歯肉組織の炎症性サイトカイン発現を指標に RT-PCR 法にて解析した。

IL-10 投与の効果: IL-10 が炎症性骨吸収の進行期に抑制作用を発揮するかを調べる目的で、結紮と平行して IL-10 の歯肉局所投与ならびに腹腔からの全身投与を行った。歯肉投与群ではマウス第二臼歯口蓋側歯肉に、腹腔投与群では腹腔から、IL-10 を結紮開始時(0 日目)と 2 日目に注入した。3 日目にマウスを安楽死させ、歯肉の炎症性サイトカイン発現および歯槽骨吸収量を解析した。

全身応答の評価: 結紮期間を 2 週間とし、歯肉、血清、肝臓、腸管における炎症関連分子等の発現を RT-PCR 法等にて解析した。

4. 研究成果

- (1) ヒト歯周炎歯肉組織における IL-10 発現: ヒト歯肉炎(N=8)および歯周炎(N=9)患者歯肉における IL-10 mRNA 発現は歯周炎で歯肉炎よりも高い傾向が認められたが有意差はなく、転写因子 E4BP4 の発現にも両群間に有意差はなかった。
- (2) 免疫担当細胞による IL-10 産生: THP-1 と Raw cell を *P. gingivalis* LPS にて刺激したさいの IL-10 mRNA 発現が確認された。
- (3) マウス *P. gingivalis* 経口感染歯周炎モデル: 10 回感染後に有意な歯槽骨吸収を認めたが、ヒト歯周炎歯肉での傾向とは異なり歯肉での IL-10 mRNA 発現は有意に減少していた。また、このモデルでは歯肉の炎症反応そのものが軽微であった。一方で、血清中、肝臓、腸管、脂肪組織など全身臓器に軽微な炎症を生じており(Maekawa et al. 2011)、さらには脂質・糖代謝関連分子にも変動をきたしていた(Arimatsu et al. 2014)。腸管

では炎症性サイトカイン IL-6、IL-17 の mRNA 発現が有意に上昇していた。抗炎症性サイトカイン IL-10 は有意差はないものの上昇傾向、TGF- β は有意な上昇を認めた。

(4) マウス絹糸結紮歯周炎モデル

炎症性骨吸収の評価: *P. gingivalis* 経口感染モデルとは異なり、IL-6 等の炎症性サイトカインの発現上昇と歯槽骨吸収に一致して歯肉の IL-10 mRNA 発現が有意に上昇していた。結紮を撤去すると、10~14 日で歯槽骨レベルの有意な回復と歯肉 IL-6 mRNA 発現の有意な減少を認められたが、歯肉 IL-10 mRNA の発現は結紮撤去後も変化しなかった(図 1)。結紮撤去後の炎症消退期にも IL-10 レベルが維持された。

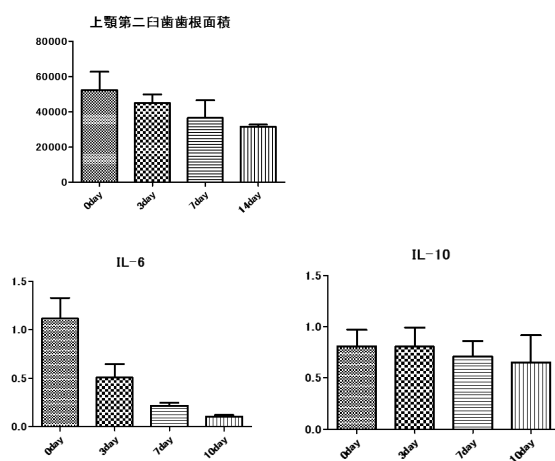


図 1. 結紮を撤去した後の歯槽骨レベルの回復(露出歯根面積の減少)と歯肉の IL-6、IL-10 mRNA 発現の変化

IL-10 の抗炎症、抗歯槽骨吸収効果: IL-10 を歯肉から投与した群では炎症性サイトカイン IL-6 と TNF- α の mRNA 発現ならびに歯槽骨吸収量のいずれも、コントロールの PBS 歯肉注入群に比較して有意差を認めなかった(図 2)。局所投与自体の効果がないのか、マウス歯肉への IL-10 の注入(注射)がうまくいっていない可能性が考えられた。一方、腹腔投与群では歯槽骨吸収は PBS 注入群に比較して抑制される傾向を認めた(図 2)。しかしながら、歯肉における IL-6 と TNF- α の mRNA 発現は IL-10 腹腔投与群で PBS 投与群よりも高い傾向にあった。このことは、

全身循環性の IL-10 は歯肉局所の炎症には有効ではないが、歯槽骨吸収は抑制することを示唆し、歯槽骨吸収は歯肉局所の炎症由来と全身性の炎症由来の 2 つの経路から制御されていると考えられた。

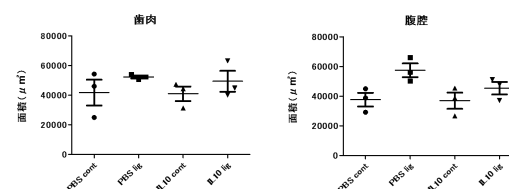


図 2. 歯肉または腹腔からの IL-10 投与が結紮誘導性歯槽骨吸収に及ぼす影響

全身応答の評価: 我々の研究グループは、*P. gingivalis* 経口感染歯周炎モデルでは歯肉の炎症は著明でないが歯槽骨吸収をきたし、同時に全身の炎症、代謝に変動が認められ、それは腸内細菌叢の変化によるリーキーガットの結果の内毒素血症によるという仮説を提唱した(Arimatsu et al. 2014)。そこで、歯肉の強い炎症と *P. gingivalis* 以外の口腔細菌の蓄積が全身に及ぼす影響を調べた。

16S rRNA の定量解析から、絹糸結紮後は口腔内細菌量の有意な増加が示され、歯肉組織では IL-1 の有意な発現上昇を認めた。血清中では IL-6 の有意な増加がみられたものの、エンドキシンのレベルには変化を認めなかった。肝臓において IL-6 をはじめとする炎症性サイトカインの発現増強は認められなかった。肝臓における糖新生や脂肪酸合成に関わる分子の発現上昇を認めたが *P. gingivalis* 経口感染マウスで認められた脂質代謝、糖代謝に関する幅広い分子群の変動は見られなかった。さらに、腸管上皮のタイトジャンクションを担う occludin、tight junction protein の発現は低下傾向、IL-17 はわずかに上昇傾向にあったが、これも *P. gingivalis* 経口感染モデルのように明らかな変動ではなかった。そして腸内細菌叢にも有意な変動はみとめなかった。

当初の研究計画では、*P. gingivalis* 経口感染歯周炎マウスモデルでの実験を中心に考えていたが、より歯肉の炎症が顕著なモデルが必要となり、絹糸結紮誘導性歯周炎マウスモデルを用いた解析を重点的に実施するように計画を変更した。その結果、歯周局所の細菌感染の結果生ずる歯肉の炎症病変では、炎症性サイトカインの増加に呼応して抗炎症性サイトカイン IL-10、TGF- β が産生され、それが炎症の慢性化のメカニズムの一端と考えられた。また、歯周組織破壊の本質である歯槽骨吸収の制御には局所の炎症制御だけでなく、口腔から全身へ波及した炎症の影響が大きく、そのためにも歯周組織、口腔の細菌感染・炎症の制御が重要であることが示唆された。

<引用文献>

Maekawa T, Takahashi N, Tabeta K. et al. Chronic oral infection with *Porphyromonas gingivalis* accelerates formation by shifting the lipid profile. PLoS One. 6: e20240; 2011.

Arimatsu K, Yamada H, Yamazaki K. et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. Sci Rep. 4, 4828; DOI:10.1038/srep04828, 2014.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計7件)

Nakajima T, Okui T, Ito H, Nakajima M, Honda T, Shimada Y, Tabeta K, Akazawa K, Yamazaki K.. Microbiological and clinical effects of sitafloxacin and azithromycin in periodontitis patients receiving supportive periodontal therapy. Antimicrob Agents Chemother. 60(3): 1779-1787; 2016. doi: 10.1128/AAC.02575-15. (査読有)

Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Sato K, Ohno H, Yamazaki K. Ligature-induced periodontitis in

mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissue. J Periodont Res. in press. 2016. doi: 10.1111/jre.12344. (査読有)

Minagawa T, Okui T, Takahashi N, Nakajima T, Tabeta K, Murakami S, Yamazaki K. Resveratrol suppresses the inflammatory responses of human gingival epithelial cells in a SIRT1 independent manner. J Periodont Res. 2014 Oct 14. doi: 10.1111/jre.12238. (査読有)

Yamada H, Nakajima T, Honda T, Yamazaki K. Endoplasmic reticulum stress response and bone loss in experimental periodontitis in mice. J Periodont Res. 50(4): 500-508; 2015. doi: 10.1111/jre.12232. (査読有)

Takahashi N, Matsuda Y, Yamada H, Tabeta K, Nakajima T, Murakami S, Yamazaki K. Epithelial TRPV1 signaling accelerates gingival epithelial cell proliferation. J Dent Res. 93(11):1141-7; 2014. doi: 10.1177/0022034514552826. (査読有)

Domon H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Age-related alterations in gene expression of gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res. 49(4): 536-43; 2014. doi: 10.1111/jre.12134. (査読有)

Aoki-Nonaka Y, Nakajima T, Miyauchi S, Miyazawa H, Yamada H, Domon H, Tabeta K, Yamazaki K. Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res 49(1):69-76, 2014. doi: 10.1111/jre.12080. (査読有)

(学会発表) (計4件)

松田由実、高橋直紀、有松圭、中島麻由佳、佐藤圭祐、多部田康一、中島貴子、山崎和久。歯周組織局所の炎症および *P. gingivalis* による

腸内細菌叢の変動が全身に及ぼす影響とその分子機構の比較. 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会. 2015 年 9 月 12 日. アクトシティ浜松 (静岡県浜松市).

Matsuda Y, Arimatsu K, Takahashi N, Miyazawa H, Yamada H, Minagawa T, Nakajima M, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Effect of Local inflammation of periodontal tissues on metabolic diseases. 93rd General session of International Association for Dental Research. Mar 13, 2015. Boston (USA).

松田由実、山田ひとみ、高橋直紀、有松圭、皆川高嘉、中島麻由佳、多部田康一、中島貴子、山崎和久. 結紮誘導歯周炎モデルマウスにおける全身への影響とその分子機構の解析. 第 57 回秋期日本歯周病学会学術大会. 2014 年 10 月 19 日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).

Nakajima T. Regulatory cell subsets in the pathogenesis of periodontitis. 2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Resion (IADR-APR) Aug 21, 2013. Bangkok (Thailand). (招待講演)

{その他}

ホームページ

歯周 - 全身プロジェクト 山崎研究室

http://www.dent.niigata-u.ac.jp/yamazaki_lab/

/

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 貴子 (NAKAJIMA, Takako)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号: 40303143

(2)研究分担者

多部田 康一 (TABETA, Koichi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 20401763

伊藤 晴江 (ITO, Harue)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 30397145

(3)研究協力者

山崎 和久 (YAMAZAKI, Kazuhisa)

山田 ひとみ (YAMADA, Hitomi)

松田 由実 (MATSUDA, Yumi)