

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463219

研究課題名(和文) 歯周炎病変局所におけるTh17細胞浸潤・活性化機構の解析

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

## 研究代表者

細川 義隆 (HOSOKAWA, Yoshitaka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：90346601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト歯根膜由来細胞(HPDLC)とヒト歯肉線維芽細胞(HGFs)を用い、歯周炎病変局所で発現している報告があるサイトカインのIL-1 $\beta$ 、IL-6ならびにIL-22が炎症性骨吸収に関与しているTh17細胞を浸潤させるCCL20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-6とIL-22はIL-1 $\beta$ が誘導したHPDLCあるいは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-6とIL-22は歯周組織構成細胞CCL20産生を増強することによりTh17細胞浸潤を促進し、歯周炎の炎症性骨吸収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-6 and IL-22 on CCL20 production from IL-1 $\beta$ -stimulated human periodontal ligament cells (HPDLC) or human gingival fibroblasts (HGFs) in this study. We found that IL-6 and IL-22 could synergistically increase CCL20 production from IL-1 $\beta$ -treated HPDLC or HGFs, respectively. Therefore, IL-6 and IL-22 are related to Th17 cells accumulation in periodontally diseased tissues to induce CCL20 production in periodontal resident cells. These results might explain that IL-6 and IL-22 are involved in the destruction of alveolar bone in periodontally diseased tissue.

研究分野：歯周病態学分野

キーワード：歯周炎 Th17細胞 CCL20 IL-6 IL-22 歯肉線維芽細胞 歯根膜由来細胞

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は歯肉や歯槽骨など歯を支える歯周組織の破壊を特徴とする慢性炎症性疾患であり歯を喪失する主な原因となっている。歯周炎の発症には歯周病原菌が必要であるが、様々な研究により細菌に対する炎症性免疫応答が歯周組織破壊に重要である事が報告されている。

近年、免疫担当細胞の中でも Th17 細胞と呼ばれる helper T 細胞サブセットと Th17 細胞が産生する IL-17 が関節リウマチ (Lubberts et al., *Immunopathology.*, 32, 43-53, 2010、Miossec et al., *Nature Reviews Drug Discovery.*, 11, 763-776, 2012) や歯周炎 (Cheng et al., *J Clin Periodontol.*, 41(6), 541-549, 2014) の骨破壊に積極的に関与している事が明らかとなった。また、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も報告され、そのリガンドである CC chemokine ligand 20 (CCL20) が Th17 細胞浸潤・集積・活性化に関与している事も明らかとなっている (Hirota et al., *J Exp Med.*, 204(12), 2803-2812, 2007)。我々は、すでにヒト歯周炎組織において CD4 陽性 CCR6 陽性細胞が存在していること、また、歯周組織構成細胞の一つである歯肉線維芽細胞が IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  刺激により CCL20 を産生しうること、ヒト歯周病病変局所に 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、他のヒト歯周炎組織に存在するサイトカインが CCL20 産生に関与しているかどうか、また、HGFs 以外の歯周組織構成細胞が CCL20 を産生しうるかどうかについては不明な点が多かった。

### 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の一つである IL-22 および Th17 細胞分化への関与が報告されている IL-6 に着目し、IL-22 および IL-6 が IL-1 $\beta$  が誘導するヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) あるいはヒト歯根膜細胞 (HPDLC) 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-22 や IL-6 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 MAPKs, NF- $\kappa$ B ならびに IL-6 が強く活性化する事が明らかとなっている STAT3 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 および HPDLC 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。HPDLC は TaKaRa 社より購入した。

### **(2) HGFs および HPDLC からの CCL20 産生の解析:**

(1) の条件で採取した HGFs あるいは購入した HPDLC を IL-1 $\beta$  存在下あるいは非存在下で IL-22 あるいは IL-6 および soluble IL-6 receptor (sIL-6R) 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)、SC514 (NF- $\kappa$ B inhibitor)、Bay11-7085 (NF- $\kappa$ B inhibitor) あるいは 5,15 DPP (STAT3 inhibitor) において 1 時間前処理した後、IL-1 $\beta$  と IL-22 あるいは IL-1 $\beta$  と IL-6/sIL-6R 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-22 あるいは IL-6/sIL-6R 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 あるいは購入した HPDLC を IL-1 $\beta$ , IL-22, IL-6/sIL-6R 単独刺激、IL-1 $\beta$  と IL-22 あるいは IL-1 $\beta$  と IL-6/sIL-6R 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, STAT3 および 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-22 receptor (IL-22R, IL-10R2) 発現の解析:**

無刺激の HGFs から RNA を抽出し RT-PCR 法を用いて IL-22R および IL-10R2 の mRNA 発現を解析した。

### **(5) HPDLC の IL-6 receptor (IL-6R, gp130) 発現の解析:**

無刺激の HPDLC を回収し、flow cytometry を用い、HPDLC 表面の IL-6 receptor ならびに gp130 の発現を解析した。

### 4. 研究成果

**(1) IL-22 および IL-6/sIL-6R が IL-1 $\beta$  刺激 HGFs あるいは HPDLC 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-22 により相乗的に増強された。また、IL-1 $\beta$  により誘導された HPDLC の CCL20 産生は IL-6/sIL-6R により相乗的に増強された。

**(2) IL-1 $\beta$  と IL-22 刺激 HGFs から産生する CCL20 産生に関するシグナル伝達経路**

**の解析:** IL-1 $\beta$ と IL-22 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-22 誘導 CCL20 産生に關与している事が示された。

**(3) IL-22 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-22 は IL-1 $\beta$ 刺激 HGFs の JNK 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。JNK は CCL20 産生に關与していなかったことより、IL-22 は 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) IL-6/sIL-6R が IL-1 $\beta$ 刺激 HPDLC の MAPKs, NF- $\kappa$ B および STAT3 の活性化に与える影響:** IL-6/sIL-6R は IL-1 $\beta$ 刺激 HPDLC の MAPKs リン酸化および I $\kappa$ B- $\alpha$ 分解に影響を与えなかった。しかしながら、STAT3 のリン酸化が亢進されていた。

**(5) IL-1 $\beta$ と IL-6/sIL-6R 刺激 HPDLC から産生する CCL20 産生に關与するシグナル伝達経路の解析:**(4)の結果より STAT3 が CCL20 産生の増強に關与している可能性が示唆されたため STAT3 阻害剤を用いて STAT3 の關与を調べた。その結果、STAT3 阻害剤は IL-1 と IL-6/sIL-6R が誘導する CCL20 産生を有意に抑制した。ゆえに STAT3 を介するシグナル伝達経路が IL-1 $\beta$ /IL-6/sIL-6R 誘導 CCL20 産生に關与している事が示された。

**(6) HGFs の IL-22 receptor 発現および HPDLC の IL-6 receptor の発現:** HGFs は無刺激の状態では IL-22R および IL-10R2 の mRNA を発現していた。また、HPDLC は細胞表面に gp130 発現は認められたが、IL-6R 発現は認められなかった。ゆえに HPDLC は IL-6 刺激を受け入れるために sIL-6R が必要 (trans-signaling) であることが分かった。

#### 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 7件)

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Calcitriol suppressed inflammatory reactions in IL-1-stimulated human periodontal ligament cells, *Inflammation*, 38 巻、2252-2258 頁 (2015 年) 査読有  
DOI: 10.1007/s10753-015-0209-y

Satoru Shindo, Yoshitaka Hosokawa,

Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Genipin inhibits MMP-1 and MMP-3 releases from TNF- $\alpha$ -stimulated human periodontal ligament cells, *Biochimie*, 107 巻、391-395 頁 (2014 年) 査読有  
DOI: 10.1016/j.biochi.2014.10.008

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, IL-22 enhances CCL20 production in IL-1-stimulated human gingival fibroblasts, *Inflammation*, 37 巻、2062-2066 頁 (2014 年) 査読有  
DOI: 10.1007/s10753-014-9939-5

Yoshitaka Hosokawa, Satoru Shindo, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, IL-6 trans-signaling enhances CCL20 production from IL-1-stimulated human periodontal ligament cells, *Inflammation*, 37 巻、382-386 頁 (2014 年) 査読有  
DOI: 10.1007/s10753-013-9750-8

Satoru Shindo, Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Genipin inhibits IL-1-induced CCL20 and IL-6 production from human periodontal ligament cells, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33 巻、357-364 頁 (2014 年) 査読有  
DOI: 10.1159/000356675

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits CC chemokine ligand 11 production in human gingival fibroblasts, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31 巻、960-967 頁 (2013 年) 査読有  
DOI: 10.1159/000350114

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, TLR3 agonist enhances CC chemokine ligand 20 production in IL-1-stimulated human gingival fibroblasts, *Cellular Immunology*, 283 巻、8-11 頁 (2013 年) 査読有  
DOI: 10.1016/j.cellimm.2013.05.005

[学会発表](計 13件)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、松尾敬志: Alkannin はヒト歯根膜由来細胞の CCR5 ligand 産生を抑制する、第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会(2015. 11. 12, 文京シビックホール、東京都文京区)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、松尾敬志:IL-4 がヒト歯根膜由来細胞の CCL11 および CCL20 産生に及ぼす影響、第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会 (2015.9.12, アクトシティ浜松、静岡県浜松市)

細川義隆:歯周炎病変局所へのリンパ球浸潤機構の解析、第 58 回春季日本歯周病学会 (2015.5.15, 幕張メッセ、千葉県千葉市)

Satoru Shindo, Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo: The effect of genipin on dendritic cells activation, 93<sup>rd</sup> General Session & Exhibition of the IADR (2015.3.13, Boston, USA)

Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo: Melatonin inhibits inflammatory mediators productions in human periodontal ligament cells, 93<sup>rd</sup> General Session & Exhibition of the IADR (2015.3.12, Boston, USA)

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo: IL-4 modulates chemokine productions from IL-1 $\beta$ -stimulated human periodontal ligament cells, 93<sup>rd</sup> General Session & Exhibition of the IADR (2015.3.12, Boston, USA)

進藤智、細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志 Shikonin がヒト歯根膜由来細胞の IL-6 および IL-8 産生に与える影響、第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2014.10.31, 山形テルサ、山形県山形市)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、松尾敬志: 活性型ビタミン D は IL-1 $\beta$  刺激ヒト歯根膜細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制する、第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2014.6.20, 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール、滋賀県大津市)

進藤智、細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志: Genipin は E.coli LPS が誘導するヒト歯根膜細胞の IL-6 および IL-8 産生を抑制する、第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2014.6.20, 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール、滋賀県大津市)

北中祐太郎、細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、松尾敬志: genipin は TNF- $\alpha$  が誘導するヒト歯根膜由来細胞

の IL-6 産生を抑制する、第 57 回春季日本歯周病学会学術大会 (2014.5.23, 長良川国際会議場、岐阜県岐阜市)

Satoru Shindo, Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Takashi Matsuo: The effect of genipin on MMP-1 and MMP-3 expression in IL-1 $\beta$ -stimulated human periodontal ligament cells, The 13<sup>th</sup> Joint Scientific Meeting of JSCD-KACD (2013.11.23, Gyeongju, 韓国)

進藤智、細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志: Genipin は IL-1 $\beta$  が誘導するヒト歯根膜細胞の CCL20 および IL-6 産生を抑制する、第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2013.10.18, 秋田県総合生活文化会館、秋田県秋田市)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、松尾敬志: IL-6 は IL-1 $\beta$  が誘導するヒト歯根膜由来細胞の CCL20 産生を増強する、第 56 回春季日本歯周病学会学術大会 (2013.6.1, タワーホール船堀、東京都江戸川区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細川 義隆 (HOSOKAWA, Yoshitaka)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号: 90346601

### (2) 研究分担者

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号: 0021777