

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463150

研究課題名(和文) IL-1ファミリーに属する新規サイトカインの歯周病態への関与とその治療応用

研究課題名(英文) Potential role of IL-1 family cytokines in periodontal diseases

研究代表者

大山 秀樹 (Ohyama, Hideki)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90280685

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)：歯周病患者の歯周組織においてIL-1ファミリーの新規サイトカインの発現を広く調べた結果、歯肉上皮においてIL-36の発現が強いことが明らかになった。そこで歯肉上皮細胞におけるIL-36の発現に着目した。IL-36の発現は、IL-1、TNF-、IL-17、Porphyromonas gingivalis存在下で誘導されること、さらに歯肉上皮細胞の分化に伴って増強することがわかった。これらの結果は、分化した歯肉上皮細胞がPorphyromonas gingivalis感染によってIL-36を産生し、歯周病態に関わる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the expression of IL-1 family cytokines in the periodontal tissue of periodontitis patients. We focused on the expression of IL-36 as it was found to be highly expressed in the gingival epithelium. We found that the expression of IL-36 in gingival epithelial cells was significantly induced by IL-1, TNF-, IL-17, and Porphyromonas gingivalis. In addition, the IL-36 expression level increased with differentiation of gingival epithelial cells. These results suggest the potential role of IL36 in periodontal diseases.

研究分野：歯周病態学

キーワード：IL-36 歯肉上皮細胞 歯周病

## 1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学的研究の技術的な進歩は、新規サイトカインの発見とその機能の解明に拍車を掛けた。その流れは、既存分子の新たな生物活性の発見に繋がり、それによって既存分子が新規サイトカイン分子として再分類されることもしばしばある。インターロイキン-1ファミリー (IL-1F) は、ヒトおよびマウスにおいて 11 種の遺伝子によってコードされるサイトカイン群 (IL-1F1~IL-1F11) である。最初に発見された分子は IL-1 $\alpha$  および IL-1 $\beta$  であり、様々な炎症反応の最右翼の仲介分子として知られる。その他、抗炎症性に働く IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) や IL-18 などそれぞれ IL-1F3, IL-1F4 として同ファミリーに属する。

近年、IL-1F5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 のそれぞれは、それら分子が示す生物学的活性およびレセプター分子の共通性等の観点から、IL-36Ra, IL-36 $\alpha$ , IL-37, IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , IL-38, IL-33 と新たなサイトカイン分子として登録された。これらのサイトカイン群は、生体防御における自然免疫系のみならず、ヘルパーT (Th) 細胞応答を中心とした獲得免疫系の制御にも深くかかわる。この観点から、様々な疾患との関係が広く調べられ、その病態への関与が明らかとなってきた。特に、関節リウマチについては、多くのことが明らかになってきており、新規サイトカインの免疫病態におけるネットワークの様相が明らかになりつつある (Clavel G *et al.*, *Joint Bone Spine.*, 2013.)。

近年、関節リウマチ等の免疫疾患における Th17 細胞の病態への関与についての理解が深まってきたと同時に、歯周病についてもその範疇から外れることなく、多くのことが明らかとなってきた。我々も、歯周病巣局所における Th 細胞応答に関わるサイトカイン及びそのレセプター遺伝子の発現を調べた結果、Th17 細胞誘導性のサイトカインパターンである IL-23 / IL-17 経路に関わる分子の遺伝子発現が、重度歯周病巣局所において有意に高いことを明らかにしてきた (Ohyama H *et al.*, *J Dent Res.*, 2009)。これらの結果は、IL-23 / IL-17 経路が歯周組織の破壊に関与することを示唆するものであり、Th17 細胞の

分化を人為的に調節することができれば、歯周病巣内における組織破壊を制御することが可能になると考えられる。

近年、乾癬の皮膚病巣において、上皮細胞が産生する IL-36 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  が IL-6, IL-23 および IL-17 等の Th17 サイトカイン産生を誘導すること、さらに、これらの炎症性サイトカインが上皮細胞の IL-36 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  産生を誘導し、パラクライン的なフィードバック・ループが形成されるという病態が紹介された (Carrier Y *et al.*, *J Invest Dermatol.*, 2011)。

その一方で、IL-1 ファミリーの中には、IL-1Ra 以外にも免疫・炎症反応に対して抑制的に働く分子も存在する。すなわち、①IL-36Ra および IL-38 分子は、IL-36 分子と拮抗することによって Th17 誘導を抑制すること、また、②IL-37 分子は、IL-1 ファミリーに属するサイトカインや TNF 産生を抑制することにより、自然免疫を中心とした炎症反応を制御することが示された。

以上のことから、①IL-36 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  が Th17 関連疾患の治療におけるターゲット分子になりうること、さらに、②IL-36Ra, IL-38 および IL-37 等の IL-1 ファミリーに属する抑制性の新規サイトカインがその治療薬になり得ることが提唱されている。しかし、歯周病においては、病巣局所におけるこれら IL-1 ファミリーに属する新規サイトカインの発現様態をはじめ病態への関わりについては何もわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、歯周病病巣局所における IL-1 ファミリーに属する新規サイトカインの発現様態を調べるとともに、IL-36Ra, IL-38 および IL-37 等の免疫抑制性のサイトカインを用いた免疫療法の可能性を探ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯肉サンプルの採取

兵庫医科大学倫理委員会の承認を得た計画に従い、患者に対して十分な説明を行い、同意を得た上で、歯周外科手術実施時に歯周病病巣およびその周辺部から歯肉サンプル

を採取した。病巣から採取した歯肉サンプルは mRNA 採取用サンプルと免疫組織化学用サンプルとに分割し、それぞれ RNA later 液 (Ambion 社製)、および Zamboni 固定液に浸した状態で輸送、保存した。

(2) 歯周病巣局所における IL-1 ファミリーおよび関連分子の遺伝子発現の定量解析

採取した歯肉を被験サンプルとして、① IL-1 ファミリーに属するサイトカイン群、② Th17/Treg 細胞誘導に関わるサイトカイン群 (IL-6, TGF- $\beta$ , IL-21, IL-23, IL-35), および、③ 古典的 Th サブセットである Th1, Th2 細胞誘導に関わるサイトカイン群 (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 等)の各遺伝子発現を定量的にリアルタイム RT-PCR 法を用いて広く検出した。すなわち、歯肉サンプルから全 mRNA を回収した後、オリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応を行うことによって cDNA を合成し、それらを鋳型としてターゲット分子に対して特異的な TaqMan プロブを用いて増幅を行ない、ABI 社製 Sequence Detection System 7900HT を用いて蛍光強度をリアルタイムに測定することによって行なった。各歯肉サンプル群間で、歯周病巣局所における IL-1 ファミリーに属するサイトカイン群の発現パターンと Th 細胞応答に関わるサイトカイン群の遺伝子発現パターンとを比較することによって、歯周組織破壊およびその防御に関わる免疫機構について考察した。

(3) 歯周病巣局所におけるサイトカイン発現の免疫組織学的解析

歯周病巣局所における上記サイトカイン産生の局在性および産生細胞を明らかにするために、Zamboni 固定した歯肉サンプルを用いた免疫組織化学的解析を行なった。なお、上記サイトカインに対する特異抗体にあわせて、CD3, CD4, CD45RO, CD69, CD14, Pan keratin などの種々の細胞表面マーカーと多重染色を行なうことによって、産生細胞の特定を行ない、各サイトカインの局在との相関を組織学的に検索した。

(4) 培養細胞における IL-1 ファミリー新規サイトカイン産生性の評価

IL-36, IL-36Ra, IL-37, IL-38 の主な産生細胞は、上皮細胞および形質細胞を含む B 細胞系のリンパ球あるいは単球系の細胞であることが明らかとなっている。しかし、歯周組織を構成する細胞のそれらサイトカイン産生性については明らかになっていない。

そこで、歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞を対象として、その産生性を評価した。また、種々の炎症性サイトカイン、LPS あるいは歯周病原細菌等で前述の細胞を刺激することによるこれらのサイトカインの産生性の変化を遺伝子および蛋白レベルで評価した。

4. 研究成果

#### 4. 研究成果

(1) 歯周病患者の歯周組織における IL-1 ファミリー新規サイトカイン群の発現

①遺伝子発現：兵庫医科大学倫理委員会の承認を得た計画に従い、進行度の異なる歯周病患者の歯周外科手術時に得られた歯肉をサンプルとして採取した。採取した 12 の歯肉サンプルについて、IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , および IL-36Ra の各遺伝子の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法を用いて定量解析した。その結果、多くの歯周病の病巣部において各遺伝子の発現が確認された (図 1)。このことは、IL-36 が歯周病の病態に関与する可能性を示唆しており、今後さらにサンプル数を増やし詳細な検討を行う必要がある。

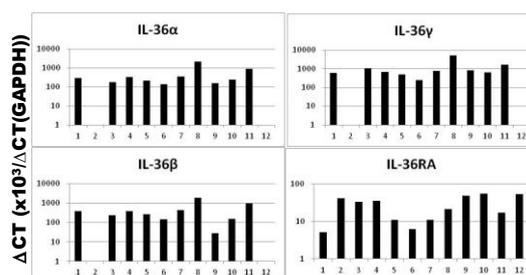


図 1 歯周組織の IL-36s mRNA 発現

②免疫組織化学的観察：歯肉サンプルにおける上述のサイトカイン発現を各特異抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。その結果、歯肉上皮および一部の炎症性細胞において IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , および IL-36Ra の発現がみられた。特に、歯肉上皮において IL-36 $\gamma$  の発現が強い傾向がみられた (図 2)。このことから、本研究においては特に歯肉上皮細

胞における IL-36 $\gamma$  の発現に着目して研究を進めた。



図2 歯周組織のIL-36 $\gamma$ 免疫組織染色像

(2) 歯肉上皮細胞における IL-36 $\gamma$  産生性

①歯肉上皮細胞において、IL-36 $\gamma$  の mRNA 発現は IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 によって経時的に誘導され、TNF- $\alpha$  と IL-17 共存下では相乗的に発現誘導された (図3)。IL-36 $\gamma$  タンパクの発現も誘導されることも Western blotting および細胞免疫染色にて確認した。

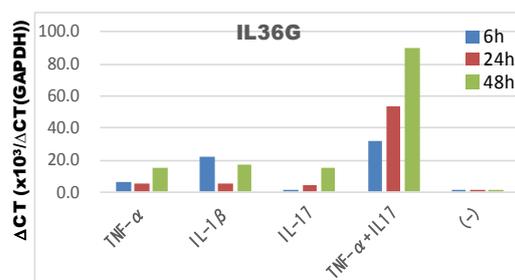


図3 歯肉上皮細胞におけるIL36G mRNA発現レベル

②歯肉上皮細胞を *Porphyromonas gingivalis* W83株あるいは ATCC33277 と共培養すると、IL36G 発現レベルが増強した (図4)。

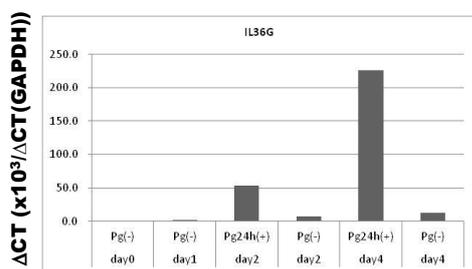


図4 歯肉上皮細胞を *Porphyromonas gingivalis* と共培養した時の IL36G mRNA発現レベル

③歯肉上皮細胞を in vitro で分化誘導させる系において、IL36G mRNA 発現レベルの変化を調べたところ、分化に伴い、IL36G 発現レベルは上昇した (図5)。

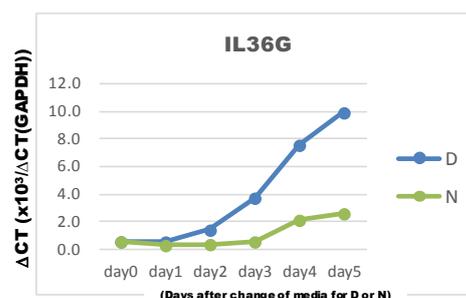


図5 歯肉上皮細胞の分化誘導時の IL36G mRNA発現レベル

以上の結果は、分化した歯肉上皮細胞が *Porphyromonas gingivalis* 感染によって IL-36 $\gamma$  産生し、歯周病の病態に関わる可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

①Kato-Kogoe N, Ohyama H, Okano S, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Nishiura H, Abiko Y, Terada N, Nakasho K., Functional analysis of differences in transcriptional activity conferred by genetic variants in the 5'-flanking region of the IL12RB2 gene., Immunogenetics.; 査読有, 2016; 68(1): 55-65

doi: 10.1007/s00251-015-0882-x.

②Kawabe M, Ohyama H, Kato-Kogoe N, Yamada N, Yamanegi K, Nishiura H, Hirano H, Kishimoto H, Nakasho K. Expression of interleukin-34 and colony stimulating factor-1 in the stimulated periodontal ligament cells with tumor necrosis factor- $\alpha$ ., Med Mol Morphol.; 査読有, 2015; 48(3): 169-176

doi: 10.1007/s00795-014-0094-8.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

大山 秀樹 (OHYAMA, Hideki)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90280685

(2)研究分担者

中正 恵二 (NAKASHO, Keiji)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00217712

山根木 康嗣 (YAMANEGI, Koji)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00434944

山田 直子 (YAMADA, Naoko)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10319858

久保 秀司 (KUBO, Shuji)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10441320

小越 菜保子 (KOGOE, Nahoko)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：60509115