

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

岡田康佑

論文題目

歯周病病態における Th17 細胞に対する IL-35 の
役割についての基礎的検討

I. 緒言

近年、主にヘルパーT (Th) 17 細胞から産生されるインターロイキン (IL)-17 は、歯周病における炎症反応と歯槽骨破壊に強く関与すると報告されている。しかし、歯周病病態における Th17 細胞の動態や役割は未だ不明な点が多い。

IL-17 の主な産生細胞である Th17 細胞の転写因子としては、核内受容体スーパーファミリーに属しているレチノイン酸受容体関連オーファン受容体 (ROR) が知られている。さらに ROR には、ROR α 、ROR β 、ROR γ t の3つのサブタイプがあり、それぞれのコードする遺伝子は、*RORA*、*RORB*、*RORC* となっている。また、ROR γ t 欠損マウスを用いた *in vitro* および *in vivo* の研究において Th17 細胞への分化が減少したことが報告されている。ROR γ t 欠損マウスでは、Th17 細胞への分化が完全に抑制されなかったのだが、ROR γ t と ROR α 両方を欠損したマウスにおいては、Th17 細胞への分化が完全に抑制され、ROR α も Th17 細胞への分化を制御している重要な分子であることが示唆されている。

一方、近年、制御性 T (Treg) 細胞から産生される新規の抗炎症性サイトカインである IL-35 が注目を集めている。IL-35 は、Th17 細胞への分化を制御する報告がある。また、当研究室のこれまでの研究で、歯周病患者における歯肉溝滲出液中の IL-35 濃度が健常者と比較し増加していること、さらに、IL-17 濃度に対して負の相関傾向にあることを報告してきた。これ

らの報告より、IL-35 が歯周病病態における過剰な炎症反応を抑制する可能性が示唆されるが、そのメカニズムは、未だ明らかとなっていない。そこで、本研究では、歯周病病態における IL-35 の役割を明らかにするための基礎的研究として、Th17 細胞への分化および、IL-17 産生に対する IL-35 の直接的な影響を検討した。

II. 材料および方法

1. 研究協力者

研究協力者は、以下の要件を満たし、同意の得られたものを対象とした。

- 1) 歯周病に影響を及ぼす全身疾患（糖尿病、骨粗鬆症など）がない、2) 5年以内に喫煙していない、3) 6ヶ月以内に抗菌薬を服用していない、4) 妊娠していない

上記の条件を満たしている者で、6歯以上に6mm以上の Probing Pocket Depth (PPD) および6mm以上の Clinical Attachment Level (CAL) を認める者を歯周病患者群とし、全顎的に PPD が3mm以下でプロービング時の出血が10%未満のものを健常者群とした。なお、本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認のもとに行った（承認番号：390）。

2. 末梢血中の CD4⁺T 細胞の分離

CD4⁺T 細胞の分離は、CD4⁺ T cell Isolation Kit を用い、autoMACS にて行った。

3. Flow Cytometry

健常者群 (3名) と歯周病患者群 (3名) の末梢血より分離した CD4⁺T 細胞を Phorbol-12-Myristate-13-Acetate、Ionomycin および Brefeldin A を添加し 4 時間培養した。培養後に抗 CD4、抗 IL-17A、抗インターフェロン (IFN) - γ および抗 Foxp3 抗体を用いて染色を施し、Flow Cytometry を用いて解析を行った。

4. Th17 細胞分化誘導法

1 名の健常者より分離した CD4⁺T 細胞に、サイトカインカクテル (リコンビナント (r) transforming growth factor - β (10ng/mL), rIL-6 (10ng/mL), rIL-1 β (10 ng/mL), 抗 IFN- γ 抗体 (0.5 mg/mL), 抗 IL-2 抗体 (1mg/mL), 抗 IL-4 抗体 (0.5 mg/mL)) を添加し、Th17 細胞への分化誘導を行った cocktail 群および、rIL-23 (40 ng/mL) のみを添加し Th17 細胞への分化誘導を行った rIL-23 群を共に 5 日間培養し、両者の Th17 細胞への分化について比較を行った。

5. rIL-35 添加実験

rIL-35 添加実験では、3 名の健常者より行った。分離した CD4⁺T 細胞を Th17 細胞へ分化誘導後に、rIL-35 (1 ng/ml) を添加した。添加後、2 時間培養後に定量的 Real-Time PCR (qPCR) 法に用いる細胞の回収、24 時間後に Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法に用いる培養上清の回収をそれぞれ行った。

6. qPCR 法

細胞から抽出した total RNA より、cDNA を合成し、*RORA*、*RORC*、*IL17A*、18S rRNA の遺伝子発現を通法に従い解析した。

7. ELISA 法

IL-17A タンパク産生量は、回収した培養上清を用い、ELISA Kit にて定量した。

8. 統計学的解析

各群の有意差の検定には、one-way ANOVA と Bonferroni multiple comparison test を用い、危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。

III. 結 果

1. 歯周病患者と健常者の末梢血中における Th17、Th1、Treg 細胞の割合

歯周病患者において、Th17 細胞の割合が、健常者と比較し約 1.4 倍の上昇を認めたものの、どの T 細胞サブセットにおいても歯周病患者群と健常者群の間に有意な差は認められなかった。

2. Th17 細胞分化誘導法の違いによる Th17 関連転写因子の遺伝子発現

Th17 細胞分化誘導法については、前述したサイトカインカクテルを用いる方法と、rIL-23 単独で行う 2 種類の報告がある。そこで、両者を比較し

検討した。その結果、*RORA*、*RORC* どちらの mRNA 発現も、cocktail 群でのみ、有意な増加を認めた。すなわち、cocktail 群においてのみ Th17 細胞への分化誘導が確認された。従って、これ以降の実験は、サイトカインカクテルによる Th17 細胞分化誘導法を用いた。

3. Th17 細胞に対する IL-35 の影響

IL17A および *RORA* mRNA 発現は、Th17 細胞分化誘導により、分化誘導を行わなかったコントロール群と比較し有意に増加したが、rIL-35 添加により有意な減少が認められた。一方、*RORC* mRNA 発現は、同様の傾向が認められたものの、Th17 細胞分化誘導および、rIL-35 添加による有意な変化は認められなかった。また、IL-17A タンパク産生量は、*IL17A* mRNA 発現の結果と同様に、Th17 細胞分化誘導によって、コントロール群と比較し有意に増加し、rIL-35 添加により有意なタンパク量の減少が認められた。

IV. 考 察

歯周病患者において歯周組織中の Th17 細胞が健常者と比較して、増加していたという報告がある。今回の結果で末梢血レベルにおいて Th17 細胞の割合は、歯周病患者と健常者とで、有意な差は認められなかったが、歯周病患者末梢血において Th17 細胞が、わずかに上昇していた。これは、歯周組織における Th17 細胞の増加が影響している可能性が推察される。実際に、他の研究において、歯周病患者末梢血中の Th17 細胞数が歯周治療後には有

意に減少したという報告がある。しかし、健常者と歯周病患者末梢血中の Th17 細胞の割合についての報告は無く、その点において、本研究結果は、研究対象者が僅かではあるものの、何らかの示唆を与え得ると考える。

これまでのいくつかの報告で、IL-35 が Th17 細胞への分化および IL-17 産生を抑制することが確認されている。また、そのメカニズムとしては IL-35 が IL-10 産生を促進する事で間接的に Th17 細胞への分化を抑制していることが示唆されている。また、これまでの研究で、IL-35 が、歯周病患者の歯肉溝滲出液 (GCF) および歯周組織において、健常者と比較し有意に高く産生/発現していることが報告されている。このことから、IL-35 は、過剰な炎症反応を引き起こす Th17 細胞を抑制するために産生され、歯周病病態に影響を与えているのではないかと推測される。しかしながら、IL-35 の Th17 細胞に対する直接的な効果については全く明らかになっていなかった。

本研究では、IL-35 が Th17 細胞に直接的に作用し、IL-17 産生を抑制し、その IL-35 による Th17 細胞の抑制メカニズムとして、Th17 細胞の転写因子の 1 つである ROR α を抑制している可能性が示唆された。これまでに、ROR α を過剰発現させたマウスにおいて Th17 細胞への分化および IL-17 産生が促進するという報告や、Treg 細胞のマスター転写因子である Foxp3 が ROR α を抑制するという報告もある。以上より、Treg 細胞は、IL-35 を産生し、ROR α 抑制することで、Th17 細胞への分化および IL-17 産生を抑制してい

る可能性が示唆された。

V. まとめ

歯周病病態において抗炎症性サイトカインである IL-35 は、Th17 細胞の転写因子の 1 つである ROR α の抑制を介して、直接的に Th17 細胞の分化および、IL-17 産生を抑制し、歯周病病態の過剰な炎症反応を制御する可能性が示唆された。