

## I. 緒言

IL-1 は細胞内シグナル伝達を引き起こすリガンドであるのに対して、IL-1Ra は IL-1 レセプターに結合し、IL-1 $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の IL-1 レセプターへの結合を阻害することにより、IL-1 の活性を調節し、IL-1 のインヒビターとして働くリガンドとして知られている。臨床的に慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液 (GCF) 中の IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-1Ra 産生量を歯周病の疾患重症度別に比較したところ、IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  は歯周病の重症度と正の相関を示したのに対し、IL-1Ra は負の相関を示し、IL-1Ra の産生低下が歯周病の病態悪化に關与する可能性が示唆されている。また、侵襲性歯周炎患者と健常者の間で歯周治療後の GCF 中の IL-1 $\beta$  と IL-1Ra 産生量を比較したところ、侵襲性歯周炎患者の IL-1 $\beta$  産生量は歯周治療後 6 週間で有意に減少したのに対し、IL-1Ra 産生量は健常者レベルまで産生量が増加したことが報告されている。Mizutani らは IL-1Ra 欠損 (KO) マウス腹腔マクロファージ (M $\phi$ ) を *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) LPS で刺激したところ、培養上清中の TNF や IL-6 の産生は野生型 (WT) マウスに比べて増加し、IL-1Ra は IL-1 以外の炎症性サイトカイン産生も間接的に制御していること、および IL-1Ra は PGE2 とその受容体である EP4 産生を介して骨髄細胞の破骨細胞分化を制御していることを明らかにしている。この結果から IL-1Ra は歯周病の発症と進行を制御する重要な分子であることが示唆されるが、実験的歯周炎モデルにおいて IL-1Ra が病態に与える影響についての検討は行われていない。

そこで、本研究では IL-1Ra KO マウスに *A.a.* 感染による実験的歯周炎を惹起させ、形態学的ならびに組織学的に WT マウスと比較することにより、IL-1Ra が歯周病の発症と進行に与える影響を検討することとした。また IL-1Ra の破骨細胞分化および骨形成に關与する骨関連遺伝子発現への影響、さらには石灰化能について IL-1Ra KO マウスから採取した骨芽細胞を用い野生型マウスと比較検討することとした。

## II. 材料および方法

### 1. 実験動物と実験方法

実験動物には 13 週齢雄 BALB/cA マウス (日本クレア, 東京) および、東京大学医科学研究所より供与された IL-1Ra KO マウスを用いた。なお、全ての動物実験は、愛知学院大学歯学部動物実験実施規定に従って行われた。また本実験は同大学動物実験委員会により承認された (動物実験計画承認番号: AGUD47

号)。

## 2. 実験的歯周炎の惹起方法

13 週齢 IL-1Ra KO マウスと WT マウスの口腔内に *A.a.* (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 日後に腹部下大静脈より採血した。採血後に屠殺し、下顎骨を採取した。

## 3. *A.a.*に対する血清抗体価測定

IL-1Ra KO マウスと WT マウスの血清から *A.a.*に対する IgG 血清抗体価を ELISA 法にて測定した。

## 4. マウス下顎骨の形態学的解析

下顎骨の形態学的変化の観察には micro Computer Tomography を使用し、下顎第二臼歯近心舌側根舌側の歯槽骨頂から根尖までの距離(ABC-RA)とセメントエナメル境から近心舌側根根尖までの距離(CEJ-RA)とを計測し、(ABC-RA)/(CEJ-RA)×100 を歯槽骨残存度と定義した。

## 5. マウス下顎骨の組織学的解析

形態学的解析後、下顎骨を固定、脱灰し hematoxylin-eosin (H-E) 染色と酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) にて染色し、光学顕微鏡下で観察した。

## 6. 骨芽細胞培養、real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

炎症性サイトカインと破骨細胞分化関連遺伝子の発現を検討するに先立ち、IL-1Ra KO マウス、WT マウス由来骨芽細胞を 2 日間培養後、*A.a.*で刺激を行い、12 時間培養後の RANKL、OPG、M-CSF、TNF $\alpha$ 、IL-6 の遺伝子発現について qPCR 解析を行った。同様に骨形成に関与する遺伝子発現を検討するに先立ち、IL-1Ra KO マウス、WT マウス由来骨芽細胞を 1 日間培養後、分化誘導培地にて培養し、培養後 1 週目、2 週目、3 週目の IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、ALP、OCN、BSP、Runx2 の遺伝子発現について qPCR 解析を行った。また IL-1Ra KO マウス、WT マウス由来骨芽細胞の石灰化は Alizarin Red S 染色により比較した。

## 7. 統計学的解析

RANKL、OPG、M-CSF、TNF $\alpha$ 、IL-6 mRNA 発現比、血清抗体価、歯槽骨残存度における検定には one-way ANOVA と Bonferroni's multiple comparison test を使用した。また ALP、OCN、BSP、Runx2、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 発現比における検定には Student t test を使用した。

## III. 結 果

## 1. *A.a.*感染実験的歯周炎による IL-1Ra KO マウスと WT マウスの比較

### 1) 血清抗体価測定

菌体浮遊液投与終了 45 日後の抗 *A.a.* IgG 抗体価は、*A.a.*感染 WT マウスにおいては 61 であったのに対し IL-1Ra KO マウス血清抗体価では WT マウスの約 9 倍である 527 と有意に高い血清抗体価を示した。未処置の IL-1Ra KO マウスと WT マウスにおいてはそれぞれ 23 と 21 であり両群間で有意差はなかった。

### 2) マイクロ CT による実験的歯周炎惹起後の歯槽骨変化の観察

未処置 IL-1Ra KO マウス、未処置 WT マウスおよび *A.a.*感染 WT マウスの歯槽骨表面は滑沢で歯槽骨形態に違いは認められなかった。*A.a.*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岐部に明らかな歯槽骨の吸収が観察された。そこで、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.a.*感染 IL-1Ra KO マウスは未処置 IL-1Ra KO マウス、未処置 WT マウスおよび *A.a.*感染 WT 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。

### 3) H-E 染色による実験的歯周炎惹起後の歯周組織変化の観察

*A.a.*感染 IL-1Ra KO マウスは WT マウスと比較して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。

### 4) TRAP 染色による実験的歯周炎惹起後の組織学的変化の観察

*A.a.*感染 IL-1Ra KO マウスは WT 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髓側に TRAP 陽性細胞が観察された。

## 2. *A.a.*刺激による IL-1Ra KO マウスおよび WT マウス由来骨芽細胞からの炎症性サイトカインと破骨細胞関連遺伝子発現比較

*A.a.*刺激した IL-1Ra KO マウス由来骨芽細胞と WT マウス由来骨芽細胞から発現される炎症性サイトカインの遺伝子発現を qPCR 法にて測定をした。その結果、qPCR 法による各群の相対比較では *A.a.*刺激した IL-1Ra KO マウス由来骨芽細胞が WT マウス由来骨芽細胞と比較して RANKL mRNA 発現は約 1.5 倍、M-CSF mRNA 発現は約 2 倍、TNF $\alpha$  mRNA 発現は約 19 倍、IL-6 mRNA 発現は約 3.7 倍の有意な発現増加を認めた。また OPG mRNA 発現には有意な差は認められなかった。

### 3. IL-1Ra KO マウスと WT マウス由来骨芽細胞からの骨形成に關与する骨關連遺伝子発現比較

分化誘導培地で培養した骨芽細胞から発現する骨形成に關与する骨關連分子である、ALP、OCN、BSP、Runx2 と IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現を qPCR 法にて測定した。また、アリザリンレッド S を用いて骨芽細胞の石灰化の比較を行った。IL-1Ra KO マウス由来骨芽細胞が WT マウス由来骨芽細胞と比較して Runx2 mRNA 発現は 2 週目に約 50%、3 週には約 70%低下した。BSP mRNA 発現は 1、2 週目において約 60%、OCN mRNA 発現はすべての週において約 50%、ALP mRNA 発現はすべての週において約 70%の低下を認めた。アリザリン染色による骨芽細胞の石灰化比較では、3 週目の WT マウス由来骨芽細胞はアリザリン染色像を認めたが、IL-1Ra KO マウス由来骨芽細胞ではアリザリン染色像を認めなかった。また、骨形成の抑制が IL-1 によって制御されていると報告されていることから IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の発現を調べたところ、IL-1Ra KO マウス由来骨芽細胞の IL-1 $\alpha$  mRNA 発現は、WT マウス由来骨芽細胞と比較して、3 週目に約 2 倍の増加を認めたが、IL-1 $\beta$  mRNA 発現には有意な差は認められなかった。

## IV. 考 察

*A.a.* 感染により IL-1Ra KO マウスと WT マウスは血清抗体価の上昇が觀察され、感染の確立を確認できたが、IL-1Ra KO マウスは WT マウスと比較して、有意に高い抗体価を示した。IL-1Ra KO マウスは IL-1Ra 欠損により IL-1 を過剰産生し、T 細胞・抗原提示細胞の活性化を行う。さらに B 細胞に働き免疫グロブリン分泌を促進する OX40、および B 細胞上の CD40 を介して B 細胞の活性化に働く CD40 リガンドが IL-1 刺激 IL-1Ra KO マウス T 細胞で増加していることが報告されており、このことが血清抗体価上昇に働いたのではないかと考えられた。*A.a.* 感染 IL-1Ra KO マウス下顎骨の形態学的変化としては WT マウスと比較して歯槽骨吸収が亢進し、組織学的にも接合上皮と歯肉固有層に炎症性細胞浸潤が生じ、付着の喪失と TRAP 陽性細胞が歯槽骨表面に多数觀察された。そこで、炎症性骨吸収を制御する骨芽細胞からの炎症性サイトカイン mRNA 発現を両マウスの間で比較検討を行ったところ、腹腔 M $\phi$  の場合と同様に TNF $\alpha$ 、IL-6 の有意な発現の増加を認めた。TNF $\alpha$  トランスジェニックマウス血清中には IL-1 や IL-6 が高濃度に産生されることから、IL-1、IL-6、および TNF $\alpha$  は互いに細胞内の NF $\kappa$ -B を活性化させ、細胞内における IL-1、TNF $\alpha$ 、IL-6 mRNA の転写

を活性化するのではないかと考えられた。

今回、IL-1Ra KO マウスにおいて RANKL と M-CSF 発現の有意な増加を認め、破骨細胞分化に対して抑制的に働く OPG は IL-1Ra によりその発現が変化しなかったことから IL-1Ra KO マウスでは骨代謝が骨吸収に傾いていると思われた。一方、IL-1 $\beta$  は Runx2、OCN、ALP の発現を抑制することが報告されているが、本研究においては IL-1 $\beta$  の遺伝子発現が、IL-1Ra KO マウスと WT マウスにおいて有意な差を認めなかった。ラット由来骨芽細胞からの ALP 活性と石灰化抑制に IL-1 $\alpha$  の有意な発現増加が関与していたという報告と同様に、本研究における IL-1 $\alpha$  の有意な発現増加が ALP、OCN、BSP、Runx2 の発現抑制に働き、骨芽細胞の石灰化が認められなかったのではないかと考えられた。

以上の結果から IL-1RaKO マウスでは炎症性サイトカイン産生の上昇に伴い、破骨細胞分化関連遺伝子発現増加と骨形成関連遺伝子発現抑制が生じ実験的歯周炎の病態悪化が誘導されたと考えられた。今回の結果から IL-1Ra は歯周組織局所での歯周炎マーカーや歯周病治療薬として利用できる可能性があることが強く示唆された。

## V. まとめ

IL-1RaKO マウスの *A.a.* 感染実験的歯周炎が WT マウスに比べ進行していたことは、細菌感染による炎症性骨吸収抑制に IL-1Ra が深く関与していることによるものと思われた。また IL-1Ra は破骨細胞分化に関与する RANKL、M-CSF 遺伝子発現を抑制し、一方、骨芽細胞分化に関与する ALP、BSP、OCN、Runx2 遺伝子発現を促進し、さらに石灰化をも促進していることが明らかとなった。このことから IL-1Ra は将来における歯周病治療薬としての可能性が示唆された。