

平成22年5月12日現在

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2006年～2009年  
課題番号：18390483  
研究課題名（和文） 口腔組織の毛細リンパ管における機能分子発現機構の解明  
研究課題名（英文） The Clarification of the expression mechanism of functional molecules on human lymphatic endothelium in oral cavity  
研究代表者 吉田 重光（YOSHIDA SHIGEMITSU）  
北海道大学・名誉教授  
研究者番号：80174928

研究成果の概要（和文）：今回の研究では、口腔内および口腔以外のリンパ管を介した免疫機構を明らかにするため、免疫で重要な役割を果たす複数のタンパク質の研究を行いました。その結果、口腔内では部位によりリンパ管の果たす役割が異なる可能性を、また口腔以外では、いくつかのタンパク質が相互連携していることを明らかにしました。以上から、全身のリンパ管は、物質輸送だけではなく免疫機構にも関与することが分かりました。

研究成果の概要（英文）：We investigated some proteins which play an important role in the immune system to clarify immune mechanisms via intraoral and extraoral lymphatic vessels. We showed that intraoral lymphatic vessels may differently play site-specific roles in immune systems, and extraoral lymphatic vessels have intracellular networks through these proteins. We discovered that systemic lymphatic vessels contribute to not only substance transport, but also immune mechanisms.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：リンパ管内皮細胞、白血球接着因子、ケモカイン、口腔組織

## 1. 研究開始当初の背景

従来、脈管研究と言えば血管研究であり、組織学的・細胞学的にリンパ管と血管の鑑別が困難なため、リンパ管研究はほとんど行わ

れていなかった。しかし近年、リンパ管に特異的な蛋白質および遺伝子が相次いで発見され、ヒトリンパ管内皮細胞の分離培養が可能となったことを契機としてLECの機能解析が世界的な規模で盛んに行われるようにな

ったが、いずれにしてもリンパ管研究は緒に付いたばかりと言っても過言ではない。

一方申請者らは、1990年代の初頭からリンパ管、特に組織内における毛細リンパ管の分布・構築に関する研究を開始した。その成果として、我々はこれまでに免疫組織化学的リンパ管同定法 (desmoplakin) を確立するとともに、毛細リンパ管における種々の白血球接着因子、病原因子共通の分子構造である pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識する受容体である Toll 様受容体、ならびにサイトカインの1つであるケモカインの発現を次々と明らかにすることによって、リンパ管が従来言われてきたような単なる下水道ではなく、組織内白血球のリンパ管内への移動や所属リンパ節への輸送に積極的な役割を担っている重要な器官であることを示してきた。

しかし研究開始当初においては、口腔組織の毛細リンパ管と口腔以外の組織における毛細リンパ管の機能的な相違を明らかにするには至らなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、口腔組織の毛細リンパ管における機能分子発現機構が、口腔組織以外の組織における毛細リンパ管と如何なる点で異なっているのかを明らかにすることにある。具体的には、

- (1) 健常および炎症ヒトリンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cell: LEC) における種々の Toll-like receptor (TLR)、白血球接着因子、およびケモカイン発現の相違を明らかにする。
- (2) lymphotoxin (LT) 依存性 nuclear factor-kappaB (NF-kB) 経路による種々の白血球接着因子およびケモカイン発現誘導機構の相違を明らかにする。
- (3) TLR 依存性 NF-kB 経路およびその他の経路を介した、種々の白血球接着因子およびケモカイン発現誘導機構の相違を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) *In vivo* の検索

北海道大学病院より提供を受けたヒト口

腔健常・炎症・悪性腫瘍組織 (舌、歯肉、歯髄ならびに口蓋扁桃)、ならびに口腔以外のヒト健常組織 (口腔粘膜再建時に用いる大腿皮膚) を用い、各種特異抗体を用いて、毛細リンパ管における TLR2、TLR4、TLR6、platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)、Cys-Cys モチーフケモカインである CCL21 ならびに LT 受容体の発現を免疫組織化学的に検索した。

### (2) *In vitro* の検索

①ヒト市販皮膚および肺 LEC を購入して細胞株を樹立し、以下の方法で検索を行った。

- 1) 培養ヒト LEC における種々の TLR 発現ならびにアダプター分子の発現を確認する。
- 2) 種々のリガンドで処理された培養ヒト LEC と処理を行わない LEC における種々のサイトカイン、ケモカインならびに白血球接着因子の発現を比較検討する。
- 3) 種々のリガンドで処理された培養ヒト LEC と処理を行わない LEC における細胞内分子動態を比較解析する。

②口腔組織から既に報告のある方法を用いて LEC 株の樹立を行い、①1)~3) と同様の解析をする。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

#### ① *In vivo* の検索

- 1) ヒト大腿皮膚リンパ管ではほぼすべてのリンパ管で TLR2、TLR4 ならびに CCL21 の発現が認められた。
- 2) ヒト健常および悪性腫瘍舌組織のほぼすべてのリンパ管 (毛細リンパ管および集合リンパ管) で TLR2、TLR4 ならびに CCL21 の発現が認められた。
- 3) ヒト炎症舌組織の全てのリンパ管では、健常時に認められた TLR2、TLR4、ならびに CCL21 の発現が消失した。
- 4) ヒト健常および炎症歯髄組織におけるリンパ管ではほぼすべてのリンパ管で TLR2、TLR4 の発現が認められなかった。

なお、CCL21 の発現については既に報告済みである。

- 5) ヒト健常歯肉組織では毛細リンパ管における TLR2 および TLR4 の発現は認められず、約半数の集合リンパ管で TLR2 および TLR4 の発現が認められた。なお、CCL21 の発現については既に報告済みである。
- 6) 3)～5)における LT 受容体の発現に関しては、採取組織により大きなばらつきがあり統一した見解は認められなかった。

## ② *In vitro* の検索

- 1) 市販ヒト正常 LEC から細胞株を樹立してヒト歯根膜線維芽細胞およびヒト真皮血管内皮細胞と混合培養した後、免疫磁気ビーズを用いることで、LEC の選択的分離が可能であった。
- 2) TNF- $\alpha$  処理培養ヒト市販新生児皮膚由来 LEC は、TNF- $\alpha$  未処理 LEC と比較して、白血球接着因子である vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) および intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) が遺伝子レベルでそれぞれ 10 倍および 50 倍に増大し、これには転写因子である activator protein-1 (AP-1) が関与していることが明らかとなった。一方、PECAM-1 に関しては TNF- $\alpha$  で処理すると、処理しなかった場合と比較して遺伝子レベルで発現量が半減した。
- 3) 培養ヒト市販新生児皮膚由来 LEC は TLR2、TLR4、ならびにアダプター分子である MD-2、CD14、MyD88、TIRAP、IRAK1 ならびに TRAF-6 を発現することを明らかにした。
- 4) リポポリサッカライド (LPS) 処理培養ヒト市販新生児皮膚由来 LEC は、LPS 未処理 LEC と比較して、インターロイキン (IL-)6、IL-8、VCAM-1 ならびに ICAM-1 の産生を増大させ、これらが TLR4 を介して行われていることを、また転写因子には NF- $\kappa$ B、AP-1 が関与していることを明らかにした。(抗体阻害実験および RNA 干渉実験より)

5) リポタイコ酸 (LTA) 処理培養ヒト市販新生児皮膚由来 LEC は、LTA 未処理 LEC と比較して、E-セレクトイン、ICAM-1、VCAM-1 の産生を増大させ、ICAM-2、ICAM-3、junctional adhesion molecule (JAM) -1、JAM-2、JAM-3 ならびに PECAM-1 の産生には変化を与えないことを明らかにした。また、これら産生の増大は、TLR4 ではなく TLR2 を介して行われていることも明らかにした。(抗体阻害実験および RNA 干渉実験より)

6) LTA 処理培養ヒト市販新生児皮膚由来 LEC は、LTA 未処理 LEC と比較して、複数のケモカイン、すなわち Cys-Cys モチーフケモカインである CCL2、CCL5、CCL20 の産生、ならびに Cys-X-Cys モチーフケモカインである CXCL1、CXCL3、CXCL5、CXCL6 ならびに CXCL8 の産生を増大させることを明らかにした。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

2001 年にリンパ管内皮細胞の分離培養が成功した後から、分子生物学を応用したリンパ管研究がようやく行われるようになってきたが、申請者らも 1990 年代の初頭からリンパ管研究に従事し、リンパ管が単なる物質の輸送経路ではなく、免疫機構に積極的に関与する組織である可能性を示してきた。

近年申請者らは、世界で初めてリンパ管内皮細胞における TLR の発現を免疫組織学的に証明したが、今回の組織学的ならびに分子生物学的手法を用いた一連の研究から、リンパ管内皮細胞が TLR により PAMPs を認識し、特定の転写因子 (NF- $\kappa$ B または AP-1) を介して種々の白血球接着因子ならびにケモカインを産生誘導することを証明することができた。

以上のようなリンパ管内皮細胞における PAMPs を介した免疫機構に関する研究は、申請者が渉猟した範囲では、わずかに 2008 年の Pegu らの報告以外には認められず、ましてや白血球接着因子に言及した研究は一切認められていないのが国内外における位置づけであり、さらにはこれらにおける白血球接着因子の発現が、TLR の調節を受けること

を示せたことは非常に大きなインパクトであろう。

さらに、口腔内と口腔以外のリンパ管におけるTLRの発現が異なっていることは、口腔粘膜とそれ以外の免疫システムが異なる可能性を示しており、この点においてもインパクトは非常に大きい。

### (3) 今後の展望

#### 1) リンパ管内皮細胞における免疫機構

今回、リンパ管内皮細胞がTLR2およびTLR4を介してPAMPsを認識することを明らかにしたが、ヒトにおける種々の細胞を用いて確認されている残り8種類のTLRとリンパ管内皮細胞との関連性は全くの不明である。以上のことから、これらについても同様の検索を行い、リンパ管内皮細胞のTLRを介したPAMPsの認識機構に対する全貌を明らかにする必要があると考えられる。

また今回の検索では、口腔内と口腔以外のリンパ管内皮細胞におけるTLR発現に相違が認められたことから、特に口腔内のリンパ管内皮細胞における詳細な検索を追加して行う必要がある。

以上のことが明らかになれば、種々の口腔粘膜感染症に対する特異的な治療システムの開発に貢献できると考えられる

一方、TLRを介してリンパ管内皮細胞に産生誘導される白血球接着因子による種々の免疫細胞(白血球を含む)の動態が明らかになれば、リンパ管内皮細胞における自然免疫機構ならびに獲得免疫機構における分子生物学的基盤の構築に大きく貢献できることが期待される。

#### 2) 悪性腫瘍細胞のリンパ行性転移

現在では可能になったリンパ管内皮細胞の培養を行うことで、リンパ管内皮細胞と悪性腫瘍細胞との関連性を明らかにすることが可能である。

今後は、悪性腫瘍のリンパ行性転移メカニズムの解明ならびに悪性腫瘍に対する治療戦略の構築に貢献することが重要であると考える。

この中で、悪性腫瘍の脈管転移には炎症性反応が関与することが近年の報告で多く認められる。

そこで申請者が明らかにしてきたリンパ管内皮細胞におけるTLRを介した種々のサイトカインならびにケモカインの産生誘導が腫瘍細胞に与える影響を明らかにすることができれば、頭頸部腫瘍のみならず悪性腫瘍全般における治療システムの開発・応用に必要不可欠な分子生物学的基盤の確立に貢献できると考えられる。

### 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9件)

- (1) Okubo N, Ishisaki A, Iizuka T, Tamura M, Kitagawa Y. Vascular cell-like potential of undifferentiated ligament fibroblasts to construct vascular cell-specific marker-positive blood vessel structures in a PI3K-activation-dependent manner. *J. Vasc. Res.* 47: 369-383. 2010. 査読(有)
- (2) Nakajima K, Nakamura M, Ishisaki A, Kozakai T. Synergistic effect of dexamethasone and prolactin on VEGF expression bovine mammary epithelial cells via p44/p42 MAP kinase. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 22: 788-795, 2009. 査読(有)
- (3) 帖佐直幸, 石崎明. 骨における血管新生と線溶系(総説). *日本血栓止血学会誌.* 20: 12-17, 2009. 査読(有)
- (4) 大久保直登, 帖佐直幸, 客本斉子, 高橋典子, 加茂政晴, 石崎明. 歯根膜由来幹細胞様細胞による3次元培養下における血管内皮細胞マーカー陽性血管様構造の形成. *口腔組織培養学会誌.* 19: 29-30, 2009. 査読(有)
- (5) Sawa Y, Tsuruga E, Iwasawa K, Ishikawa H, Yoshida S. Leukocyte adhesion molecule and chemokine production through lipoteichoic acid recognition by toll-like receptor 2 in cultured human lymphatic endothelium. *Cell Tissue Res.* 333(2): 237-252, 2008. 査

読 (有)

- (6) Sawa Y, Ueki T, Hata M, Iwasawa K, Tsurigawa E, Kojima H, Ishikawa H, Yoshida S. LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium. *J Histochem Cytochem*. 56(2):97-109, 2008. 査読 (有)
- (7) Ushijima N, Inoue K, Domon T, Yoshida S. Distribution and organization of lymphatic vessels in the mouse gingiva: An immunohistochemical study with LYVE-1. *Arch. Oral Biol*. 53(7): 652-658, 2008. 査読 (有)
- (8) Taishi Y, Kuroshima S, Domon T, Yoshida S, Kitagawa Y. Expression of CCL21, TLR2, and TLR4 on human lingual lymphatic endothelium. *Hokkaido J. Dent. Sci*. 29(2): 197-208, 2008. 査読 (有)
- (9) Sawa Y, Sugimoto Y, Ueki T, Ishikawa H, Sato A, Nagato T, Yoshida S. Effects of TNF-alpha on leukocyte adhesion molecule expressions in cultured human lymphatic endothelium. *J Histochem Cytochem*. 55(7): 721-33, 2007. 査読 (有)

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 加茂政晴、陳明珠、客本斉子、帖佐直幸、高橋典子、大久保直登、石崎明：ヒト扁平上皮癌細胞におけるガレクチン-1 と E G F R の相互作用によるアノキス抑制作用. 日本分子生物学会. 2009 年 12 月 12 日発表 (パシフィコ横浜)
- (2) 西平宗功、大久保直登、高橋典子、客本斉子、加茂政晴、長谷川智一、杉山芳樹、石崎明、帖佐直幸：間葉系幹細胞における PDGF レセプターを介した VCAM1 の発現解析. 日本生化学会大会. 2009 年 10 月 22 日発表 (神戸ポートアイランド)
- (3) 大久保直登、田村正人、飯塚正、加茂政晴、客本斉子、帖佐直幸、高橋典子、北川善政、石崎明：歯根膜由来幹細胞による血管内皮細胞マーカー陽性血管構造の形成. 歯科基礎医学会学会. 2009 年 09 月 10 日発表 (朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター)

- (4) 太子芳仁、黒嶋伸一郎、土門卓文、吉田重光、北川善政：ヒト舌リンパ管における Toll-like receptor 2 および 4 の発現. 歯科基礎医学会. 2008 年 9 月 25 日発表 (TOC 有明)
- (5) 黒嶋伸一郎、太子芳仁、吉田重光、井上農夫男：ヒト歯肉リンパ管における Toll-like receptor 2 および 4 の発現. 歯科基礎医学会. 2008 年 9 月 23 日発表 (TOC 有明)
- (6) 牛島夏未、井上貴一郎、土門卓文、高橋智美、本間善幸、飯塚正、吉田重光：マウス歯肉における毛細リンパ管の免疫組織学的検索. 歯科基礎医学会. 2007 年 8 月 31 日 (北海道大学学術交流会館)
- (7) 牛島夏未、土門卓文、井上貴一郎、吉田重光：マウス歯肉におけるリンパ管分布. 歯科基礎医学会. 2006 年 9 月 22 日 (鶴見大学記念館)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 重光 (YOSHIDA SHIGAMITSU)  
北海道大学・名誉教授  
研究者番号：80174928

### (2) 研究分担者

石崎 明 (ISHISAKI AKIRA)  
岩手医科大学・歯学部・教授  
研究者番号：20356439

土門 卓文 (DOMON TAKANORI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：50217618

足利 雄一 (ASHIKAGA YUICHI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：70372258

井上 貴一郎 (INOUE KIICHIRO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：30168439

黒嶋 伸一郎 (KUROSHIMA SHINICHIRO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：40443915

### (3) 連携研究者

沢 禎彦 (SAWA YOSHIHIKO)

福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：70271666