

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791527

研究課題名 (和文) 口腔扁平苔癬発症における TLR シグナルの関わりと癌化に関わる遺伝子発現

研究課題名 (英文) The involvement of Toll-like receptor signaling in the onset of oral lichen planus and gene expression associated with malignant transformation

研究代表者

立石 善久 (TATEISHI YOSHIHISA)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20372732

研究成果の概要：口腔扁平苔癬 (OLP) では、病変部の上皮細胞ならびに患者末梢血単球における Toll-like receptor 2 (TLR2) 発現が増強していた。さらに、OLP 患者の末梢血単球を TLR2 のリガンドである Peptidoglycan で刺激することにより Th1 サイトカイン (IL-12) 産生の亢進ならびに Th2 サイトカイン (IL-10) 産生の低下が生じ、サイトカインバランスが Th1 優位にシフトすることが明らかとなった。これらのことより、OLP の発症および病態形成には TLR2 を介するシグナルが何らかの関与をしている可能性が示唆された。しかしながら、OLP の癌化と関連する遺伝子発現を明らかにすることはできなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：免疫学、シグナル伝達、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平苔癬 (OLP) は中高年の女性を中心に比較的高頻度に認められる慢性炎症性疾患で、時には癌化を来すこともあるが、その病因は未だに明らかにされていない。近年、病原体認識に必須の受容体である Toll-like receptor (TLR) が自然免疫のみならず獲得免疫にも影響を及ぼし、種々の炎症性疾患を中心とした病態の発症・進展に関与していることが明らかになってきている。したがって、OLP の病因に TLR が関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

OLP の発症および病態形成に TLR を介するシグナルが関与しているか否かについて検討

するとともに、OLP の癌化に関与する遺伝子を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 正常口腔粘膜および OLP 罹患粘膜の上皮細胞における TLR2 および TLR4 の発現を免疫組織化学染色法にて検討した。

(2) OLP 病変組織から RNA を抽出し、全遺伝子型 cDNA マイクロアレイによる解析を行った。

(3) 健常人および OLP 患者より分離した末梢血単球における TLR2 および TLR4 の発現をフローサイトメトリー法にて検討した。

(4) 分離した単球を TLR2 リガンドである Peptidoglycan (PGN) あるいは TLR4 リガンドである Lipopolysaccharide (LPS) の存在下

で24時間培養した後、培養上清中に分泌されたIFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-4、IL-10、IL-17およびIL-23の量をELISA法にて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) OLP病変部上皮におけるTLR2およびTLR4の発現 (表1)

基底層、有棘層および顆粒層にTLR2が陽性であった例数は、正常口腔粘膜上皮(5例)ではそれぞれ4例(80%)、1例(20%)および1例(20%)であったのに対し、OLP(32例)ではそれぞれ24例(75%)、25例(78%)および0例(0%)で、OLP病変部上皮の有棘層においてはTLR2の発現が有意に亢進していた( $p < 0.05$ )。一方、TLR4の発現は正常粘膜ならびにOLP病変部いずれの上皮においてもTLR2に比べ弱く、基底層にTLR4が陽性であったものは正常粘膜およびOLP病変部いずれにおいても認められず、有棘層に陽性であったものは正常粘膜では1例(20%)、OLPでは4例(13%)、顆粒層に陽性であったものはOLPの1例(3%)のみで、正常粘膜とOLP病変部との間に有意差は認められなかった。

	正常口腔粘膜 (n=5)			OLP (n=32)		
	基底層	有棘層	顆粒層	基底層	有棘層	顆粒層
TLR2	4 (80%)	1 (20%)	1 (20%)	24 (75%)	25 (78%)	0 (0%)
TLR4	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (13%)	1 (3%)

表1. 正常口腔粘膜およびOLP病変部の上皮細胞におけるTLR2およびTLR4の発現

(2) マイクロアレイ解析

a) 全遺伝子型マイクロアレイ解析により、正常粘膜(n=2)と比較してOLP罹患粘膜上皮(n=6)で発現上昇の認められたものは、Alcohol dehydrogenase IB (class I) beta polypeptide、Apolipoprotein C-I、Fatty acid binding protein 4 (adipocyte)、G0/G1 switch 2、Septin 6、Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9、Phospholipase A2 group IIA (platelets, synovial fluid)、Dual specificity phosphatase 4およびSLAM family member 7であり、なかでもAlcohol dehydrogenase IB (class I)、beta polypeptideは115.93倍と高度に上昇していた。一方、発現低下が認められたものは、Acid phosphatase-like 2、FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B、Keratin 3、Adaptor-related protein complex 4 sigma 1 subunit、v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog、Hemoglobin deltaおよびActivating transcription factor 3であった(表2)

OLP症例の中で癌化を来たした症例における遺伝子発現について検討を行ったが、眼科と関連のある遺伝子を明らかにすることはできなかった。

Upregulated genes	Average	SD
Alcohol dehydrogenase IB (class I), beta polypeptide	115.93	62.89
Apolipoprotein C-I	27.56	19.01
Fatty acid binding protein 4, adipocyte	15.90	8.03
G0/G1 switch 2	13.28	9.87
Septin 6	11.93	4.38
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9	11.92	5.89
Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	8.85	6.16
Dual specificity phosphatase 4	7.75	2.34
SLAM family member 7	7.39	2.28

Downregulated genes	Average	SD
Acid phosphatase-like 2	0.007	0.006
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	0.013	0.006
Keratin 3	0.022	0.012
Adaptor-related protein complex 4, sigma 1 subunit	0.039	0.021
v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	0.041	0.021
Hemoglobin, delta	0.055	0.025
Activating transcription factor 3	0.059	0.034

表2. OLPにおいて発現上昇および低下が認められた遺伝子

b) OLP病変部組織(6例)において正常口腔粘膜組織の1.5倍以上のシグナル強度を示したTLR関連遺伝子は、TLR1が1例、TLR2が3例、TLR5が1例、TLR8が2例、TICAM1が4例で、他のTLRではいずれもシグナル強度は正常口腔粘膜組織の1.5倍未満であった(図1)。

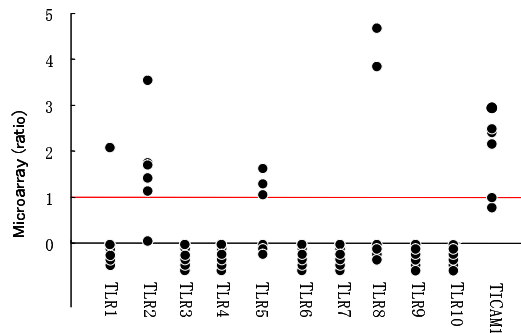


図1. OLP病変部におけるTLR関連遺伝子の発現

(3) OLP患者の末梢血単球におけるTLRの発現

OLP患者(n=10)の末梢血単球は健常人(n=5)のものに比べTLR2およびTLR4を有意に高発現していた(図2)。OLP患者単球におけるTLR2およびTLR4の発現強度と臨床タイプとの関連について見ると、TLR2およびTLR4いずれの発現も網状型の方がびらん・潰瘍型に比べ高い傾向にあったが、統計学的に有意差は認められなかった。

(4) OLP患者の末梢血単球におけるTLRリガンド刺激下におけるサイトカイン産生

a) Th1サイトカイン(IFN- $\gamma$ およびIL-12)産生(図3)

IFN- $\gamma$ 産生はPGNあるいはLPSで刺激しても、健常人の1例を除きほとんど増強されず、

健常人と OLP 患者との間に有意な差は認められなかった。これに対し、IL-12 産生は PGN あるいは LPS 刺激により増強し、なかでも OLP 患者の単球では PGN 刺激により健常人の単球に比べ IL-12 産生がより強く亢進した。

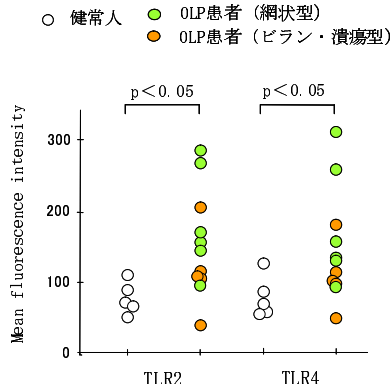


図 2. 末梢血単球における TLR 発現

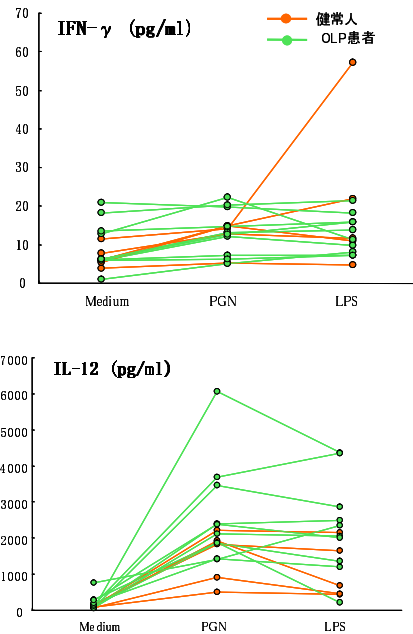


図 3. 末梢血単球における Th1 サイトカイン産生

b) Th2 サイトカイン (IL-4 および IL-10) 産生 (図 4)

PGN および LPS 刺激による IL-4 産生は単球により異なり、産生が増強するものや、逆に、減弱するものが認められたが、健常人の単球と OLP 患者の単球との間には大きな違いは認められなかった。一方、IL-10 産生は健常人の単球では PGN により大きく増強し、LPS により軽度増強したが、OLP 患者の単球では 1 例を除きいずれの TLR リガンド刺激によってもその産生は増強されなかった。

c) Th17 サイトカイン (IL-17 および IL-23) 産生

IL-17 および IL-23 の産生はいずれの TLR リガンドで刺激しても検出限界以下であった。

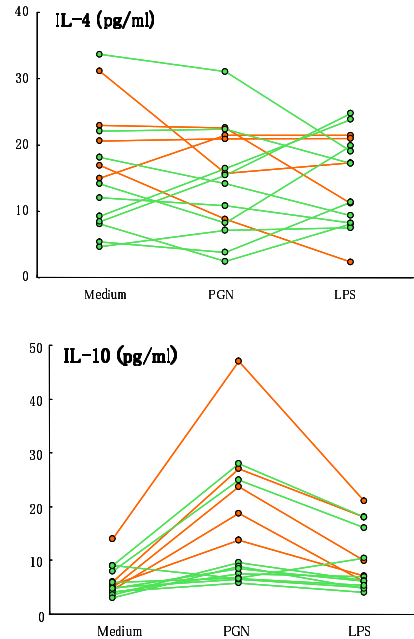


図 4. 末梢血単球における Th2 サイトカイン産生

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

①大野清二、立石善久、笹部衣里、山本哲也：口腔扁平苔癬の発症および病態形成における Toll-like receptor シグナルの関わり、日本口腔科学会、平成 21 年 4 月 16 日、浜松

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

立石 善久 (TATEISHI YOSHIHISA)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20372732

