

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2008~2009

課題番号:20791518

研究課題名(和文)

難治性口腔粘膜疾患発生に関する粘膜上皮・真皮における免疫応答の細胞生物学的研究

研究課題名(英文)

Analysis of inflammatory responses associated with oral chronic inflammation in oral keratinocytes and fibroblasts.

研究代表者

西 裕美(NISHI HIROMI)

広島大学・病院・助教

研究者番号:70403558

研究成果の概要(和文):

口腔粘膜上皮、歯肉線維芽細胞において $INF\gamma$ により活性化される STAT1 シグナル伝達経路は細胞およびサイトカインの種類により異なる発現調節を受け、CXCL10 等のケモカインの発現に関与する事が示唆された。Th1 サイトカインによる上皮と間葉のケモカイン発現機構と Th1 サイトカインを調整している Th2 サイトカインの標的遺伝子やシグナル伝達経路を解析することで、難治性の炎症性口腔粘膜疾患発症機構の解明のみならず、新しい治療や検査法の開発につながる事が期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文):

The JAK/STAT pathway activated by $INF-\gamma$ in oral keratinocytes and fibroblasts undertook an expressional control depending on cells and cytokines. Furthermore, the pathway affected to expression of chemokine such as CXCL10.

It was expected to lead to not only the clarification of oral chronic inflammation appearance of disease mechanism but also new treatment and the development of the inspection method.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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:炎症性口腔粘膜疾患, 口腔粘膜上皮細胞, 歯肉線維芽細胞, Th1 サイトカイン, Th2 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

難治性炎症性口腔粘膜疾患発症の過程には、口腔粘膜に浸潤するリンパ球より産出される $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ といった炎症性サイトカインが重要な役割を担っている。口腔扁平苔癬は、感作された Th1 リンパ球が $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 等の Th1 サイトカインを産出し、病変部の免疫応答が亢進されることが発症の一因であると報告されている。

口腔粘膜を構成する口腔粘膜上皮細胞・歯肉線維芽細胞は病原性微生物の付着、侵入に対して防御的な自然免疫機能を有する一方で、炎症性生理活性物質を分泌し、炎症の惹起に積極的な役割を果たしていると考えられている。しかし、Th1 サイトカインが口腔粘膜上皮細胞、歯肉線維芽細胞に及ぼす影響は明らかにされていない。

また扁平苔癬では、Th1 サイトカインと同時に Th2 リンパ球から産出される IL-4、IL-10 といった Th2 サイトカインの発現も認められることが報告されている。しかし、Th2 サイトカインは Th1 サイトカインの免疫応答に関与し、主に抑制に働くと考えられているが、口腔粘膜疾患に対する Th2 サイトカインの役割は不明である。

申請者はこれまでに、Th1 サイトカインの刺激による不死化口腔粘膜上皮細胞 (RT7) および不死化歯肉線維芽細胞 (GT1) における様々なケモカインの発現および発現パターンを解析した。

その結果、両細胞において $\text{INF-}\gamma$ の刺激により T リンパ球遊走能をもつ CXCL9、CXCL10、CXCL11 の mRNA が他のケモカインと比較して著明に増加することを見出した。また、歯肉線維芽細胞において、 $\text{TNF-}\alpha$ の刺激により、同様に CXCL9、CXCL10、CXCL11 の mRNA が他のケモカインと比較して著明に増加することを見出した。

このことから、T リンパ球を特異的に遊走・活性化するケモカインである CXCL9、CXCL10、CXCL11 は難治性炎症性口腔粘膜疾患の発症に関与していることが考えられた。口腔粘膜上皮細胞および、歯肉線維芽細胞において CXCL9、CXCL10、CXCL11 が他のケモカインと

比較して、 $\text{INF-}\gamma$ や $\text{TNF-}\alpha$ の刺激により著明に増加することは国内外で報告されていない。

また、口腔粘膜上皮細胞において Th2 サイトカインである IL-4 を $\text{INF-}\gamma$ と同時添加すると、CXCL9、CXCL10、CXCL11 の発現がさらに増加する一方、歯肉線維芽細胞では逆に抑制される、という興味深い結果を得た。

Th2 サイトカインが Th1 サイトカインのケモカインを誘導し、さらに上皮細胞と線維芽細胞では異なる調節を行っているという報告は現在までに皆無である。

2. 研究の目的

現在までの研究結果より、Th1 サイトカイン刺激により上皮・間葉組織が CXCL9、CXCL10、CXCL11 といったケモカインを産生することで、T リンパ球浸潤やオートクライン、パラクラインなどの免疫応答が亢進する。また、Th2 サイトカインが上皮と間葉において異なったケモカインの発現調整を行っていることが、病変部の炎症を発展させている可能性を考えた。

正常細胞は長期培養が不可能であること、個々の性質の違いから再現性のある解析を行うことが難しい。当教室は不死化口腔粘膜上皮細胞、不死化歯肉線維芽細胞を樹立している。これらの細胞を用いることによって、再現性のある、かつ長期にわたる検索が可能となる。当科で樹立している不死化口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞を用いて細菌、ウイルス由来物質刺激による特異的炎症性ケモカインの発現を検討した。

また Th1 サイトカインによる上皮と間葉のケモカイン発現機構と Th1 サイトカインを調整している Th2 サイトカインの標的遺伝子を検討し、難治性の炎症性口腔粘膜疾患発症機構の解明とその治療への応用を検討することが、この研究の目的である。

3. 研究の方法

不死化口腔粘膜上皮細胞・不死化歯肉線維芽細胞において Th1 サイトカインが CXCL9、CXCL10、CXCL11 のケモカイン

ン発現におよぼす影響と、Th2 サイトカインによる Th1 サイトカイン誘導遺伝子の発現調節について検討した。

さらに難治性口腔粘膜疾患の上皮・間葉組織におけるサイトカイン、ケモカインの発現を検討した。

口腔粘膜上皮細胞・歯肉線維芽細胞における Th1 サイトカインによる炎症性ケモカイン発現調節の検討は、Th1 サイトカイン (INF- γ 、TNF- α) 単独あるいは同時刺激による口腔粘膜上皮細胞、歯肉線維芽細胞における CXCL9、CXCL 10、CXCL 11 の経時的発現誘導を real-time PCR 法を用いて検討した。さらに経時的蛋白の発現を ELISA 法にて検討した。

また、口腔粘膜上皮細胞および歯肉線維芽細胞における Th2 サイトカインによる炎症性ケモカイン発現調節の検討は、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13) と Th1 サイトカインを同時に添加し、口腔粘膜上皮細胞および、歯肉線維芽細胞における Th1 サイトカインで誘導される CXCL9、CXCL 10、CXCL 11 の経時的発現誘導を real-time PCR 法を用いて検討した。

さらに、Th1 サイトカインが誘導する遺伝子の調節機構を解明するため、細胞内シグナル伝達経路での標的因子を検索した。

CXCL9、CXCL 10、CXCL 11 は皮膚上皮細胞において STAT1 標的遺伝子であることが報告されている。口腔粘膜上皮細胞・歯肉線維芽細胞においてもこれらのケモカインが STAT1 標的遺伝子であることを同定するために、STAT1 リン酸化阻害剤を INF- γ と同時添加し、CXCL9、CXCL 10、CXCL 11 の発現変化を real-time PCR 法、Western blot 法を用いて検討した。

また、口腔粘膜上皮細胞および歯肉線維芽細胞における STAT1 リン酸化の調節および抑制を検討するために、INF- γ とは別のシグナル伝達経路をもつ TNF- α (NF- κ B、MAPK 伝達経路) あるいは IL-4、IL-13 などの Th2 サイトカイン (STAT6 伝達経路) を同時添加し、STAT1 リン酸化の調節を Western blot 法で検討した。

4. 研究成果

T リンパ球遊走・活性能をもつこれらのケモカインは、Th1 サイトカインの刺激により、口腔粘膜上皮細胞、歯肉線維

芽細胞から産出され、難治性口腔粘膜炎症性疾患の発症過程に重要な役割を担っていると考えられる。また口腔粘膜疾患において Th2 サイトカインの役割は明らかにされていない。

口腔粘膜上皮細胞・歯肉線維芽細胞において INF- γ で著しく増加する CXCL10 の発現は JAK/STAT シグナル伝達阻害剤により抑制された。

また INF- γ の添加により STAT1 リン酸化が経時的に増加した。INF- γ による STAT1 のリン酸化が両細胞において TNF- α の同時添加でさらに増加した。一方、IL-4、IL-13 の同時添加では口腔粘膜上皮細胞では増加し、歯肉線維芽細胞では抑制された。

以上より INF- γ により活性化される STAT1 シグナル伝達経路は細胞およびサイトカインの種類により異なる発現調節を受け、CXCL10 等のケモカインの発現に関与する事が示唆された。INF- γ により活性化される STAT1 シグナル伝達経路は細胞およびサイトカインの種類により異なる発現調節を行い、口腔粘膜炎症性疾患発症に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

Th1 サイトカインによる上皮と間葉のケモカイン発現機構と Th1 サイトカインを調整している Th2 サイトカインの標的遺伝子やシグナル伝達経路を解析することで、難治性の炎症性口腔粘膜疾患発症機構の解明のみならず、新しい治療や検査法の開発につながる事が期待できると考えられた。

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 1 件)

1. H. Nishi, K. Ohta, M. Takechi, S. Yoneda, M. Hiraoka and N. Kamata. Wound healing effects of gingival fibroblasts cultured in animal-free medium. Oral Diseases (inpress) 査読有, 2010

[学会発表] (計 4 件)

1. 西 裕美、太田耕司、福井暁子、武知正晃、鎌田伸之. 歯肉線維芽細胞における炎症性サイトカインによる JAK/

STAT シグナル伝達経路の解析. 日本口腔科学会学術集会. 2009年6月24日～6月25日. 浜松

2. 西 裕美、太田耕司、福井暁子、武知正晃、鎌田伸之. 口腔粘膜上皮細胞および歯肉線維芽細胞における炎症性サイトカインによる JAK/STAT シグナル伝達経路の解析. 日本口腔粘膜学会総会・学術大会. 2009年6月5日～6月6日. 神奈川

3. 西 裕美、太田耕司、福井暁子、武知正晃、鎌田伸之. 合成培地で培養したヒト歯肉線維芽細胞の創傷治癒促進効果. 日本口腔粘膜学会総会・学術大会. 2008年9月19日～9月20日. 東京

4. 西 裕美、太田耕司、福井暁子、武知正晃、鎌田伸之. ヒト歯肉線維芽細胞の合成培地による培養. 日本口腔科学会学術集会. 2008年4月17日～4月18日. 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 裕美 (NISHI HIROMI)
広島大学・病院・助教
研究者番号：70403558

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：