

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 6 月 18 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592348

研究課題名（和文）ラット舌炎症モデルを用いた脈管内皮細胞の増殖分化機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of vascular endothelial cell differentiation and growth system in the rat tongue inflammation model.

研究代表者

黒田 範行（KURODA NORIYUKI）

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50359915

研究成果の概要（和文）：

ラットの舌に LPS (Lipopolysaccharide) とアジュバンドを混合して投与することで舌炎症モデルを作製してみたところ、投与後 8 日目くらいから顕著な血管の造形成が見られた。舌にアデノシンレセプターを阻害する試薬を事前に投与してから、LPS とアジュバンドを投与した場合には血管の造形成は有意に減弱したことから、アデノシンレセプターがこのモデルにおける血管造形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To make the model of tongue inflammation, inject the LPS with incomplete Freund's adjuvant. About 8 days after the injection, the luminal areas of blood vessels were increased. But inject antagonists of adenosine receptors before to inject the LPS and incomplete Freund's adjuvant, the ratio of blood vessels in the lingual tissue was remarkably reduced. These results show that adenosine receptors are very important roll of vascular endothelial growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

舌炎は口腔内での病態のうちきわめてありふれたものであるが、そのメカニズムなどに関しては、まだよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

舌炎の際に舌内でどのようなことが起きているのかを解析するために、まず動物を使った舌炎症モデルを作成する。

次にそのモデルを用いて、実際にどのようなことが起きているかを形態的、分子生物学的に解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

ラットの舌に LPS (Lipopolysaccharide) とアジュバンドを混合して投与することで舌炎症モデルを作成する。

その後、炎症を起こしている舌の薄切標本を作製して、どのような変化が起きているかを解析する。

また炎症を起こした舌より RNA を抽出し、そこから逆転写酵素を用いて cDNA を作製して real-time PCR の手法を用いて、各遺伝子の発現パターンを解析する。

4. 研究成果

(1) 舌炎モデル動物の確立

LPS とアジュバンドを混合してラットの舌に投与し、数日経過後に舌の薄切標本を作製して HE 染色ならびに抗 OX6 抗体を用いての免疫染色をおこなったところ、投与後から血管割合ならびに OX6 陽性細胞数が増え始め、投与後 8 日目に血管造成ならびに OX6⁺細胞数が有意に増加している事が判明した。

この結果により、LPS とアジュバンドを混合してラットの舌に投与するという系を舌炎症動物モデルとして用いる事ができることが判明した。(図 1)

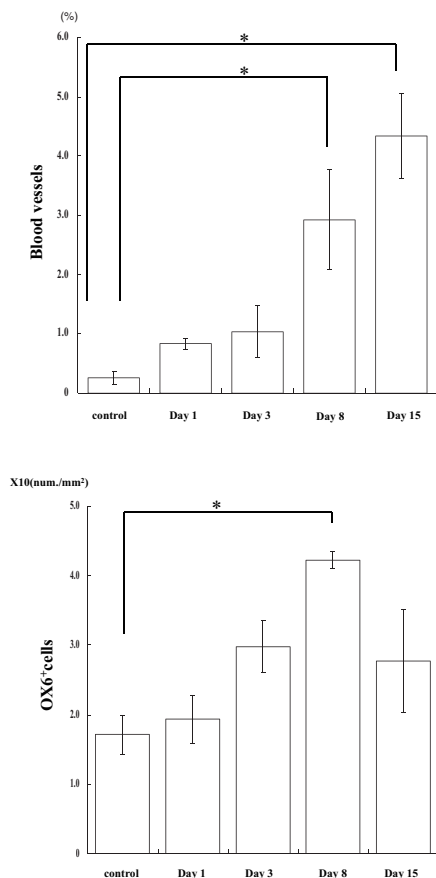


図 1 LPS+ アジュバンドによる血管造成ならびに OX6 陽性細胞数の変化

(2) 血管造成因子産生細胞の同定

上記のモデルを使用して、その際に血管造成に関与している細胞腫の同定を行うべく、LPS+アジュバンドを注入後 8 日目の個体の薄切切片を血管造成因子である VEGF、マクロファージのマーカである抗 ED1 抗体、抗 ED2 抗体、そして MHC classII に対する抗体である抗 OX6 抗体、そしてランゲルハンス細胞のマーカである抗 Langerin 抗体を用いて蛍光免疫染色法で染色してみた。その結果 ED1、ED2、OX6、Langerin に対して陽性な細胞が VEGF も共発現していることが判明した。

これらのことからマクロファージ、ランゲルハンス細胞、MHC classII 陽性細胞といった抗原提示細胞がこの実験系において血管造成因子である VEGF を発現し、舌炎における血管造成に大きく寄与していることが判明した。(図 2)

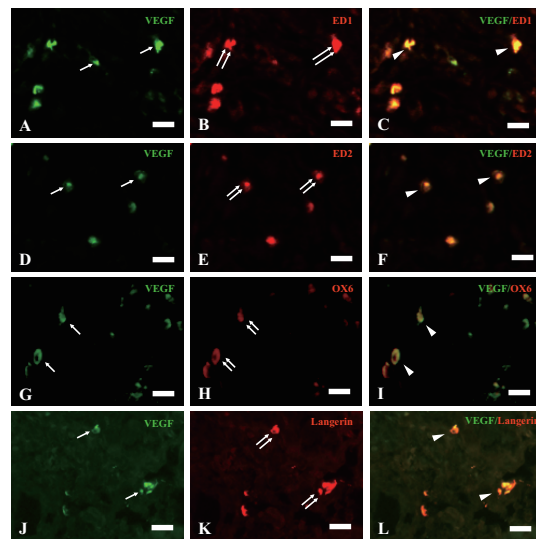


図 2 ED1、ED2、OX6、Langerin と VEGF の共発現

(3) 血管造成におけるアデノシンレセプターの寄与

これまでにアデノシンレセプターの A_{2A}、A_{2B} の活性化が血管造成に大いに関与している事が報告されている。当実験系におけるアデノシンレセプターの関与を明らかにする目的でアデノシンレセプターの A_{2A} を特異的にブロックするアンタゴニスト ZM241385、A_{2B} を特異的にブロックするアンタゴニスト MRS1754 を事前に舌に投与してから LPS+アジュバンドを投与して 8 日目の個体から薄切標本を作製して HE 染色をおこなって観察してみた。その結果アンタゴニストを投与しなかった個体と比較して有意に血管の造成が抑制されていることが判明した。(図 3) 同時にこの舌のサンプルより mRNA を抽出して cDNA を作製して real-time PCR 法により VEGF 遺伝子の発現量を定量したところ、A_{2A} をブロックした場合には有意に、A_{2B} をブロックした場合には有意ではないが、抑制されて

いることが判明した。(図4)

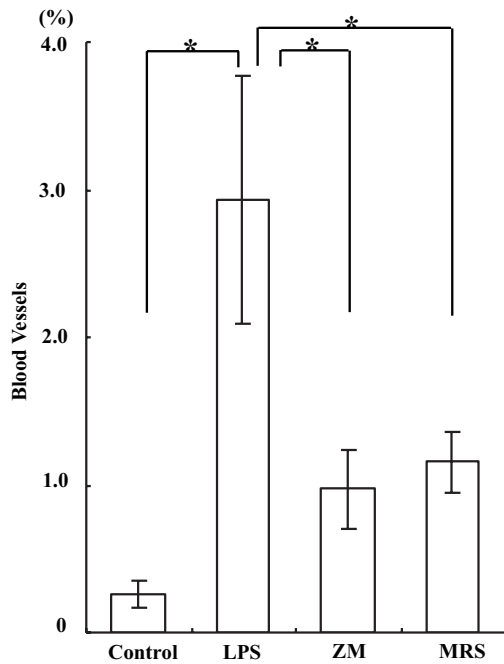


図3 アデノシンレセプターアンタゴニストの血管造成に及ぼす影響

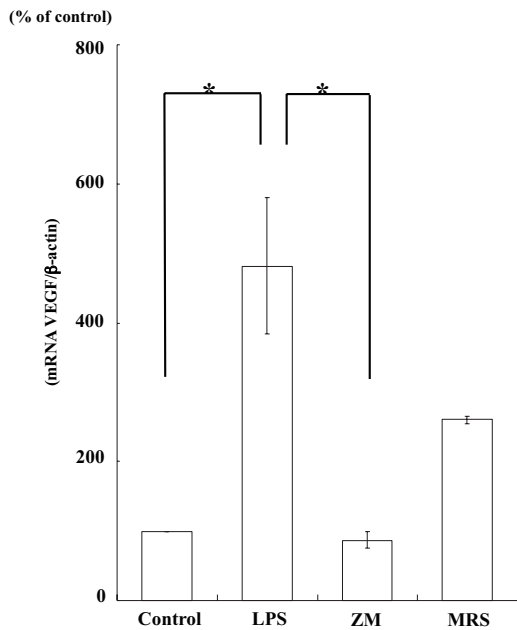


図4 アデノシンレセプターアンタゴニストのVEGF遺伝子発現に及ぼす影響

(4)アデノシンレセプターアンタゴニストの抗原提示細胞の流入への寄与
先程と同様にアデノシンレセプターのA_{2A}を

特異的にブロックするアンタゴニスト ZM241385、A_{2B}を特異的にブロックするアンタゴニストMRS1754を投与してからLPS+アジュバンドを投与して8日目の個体から薄切標本を作製してED1、ED2、OX6、Langerinに対する抗体を用いて免疫染色をおこない、各抗体に対する陽性細胞数を比較してみたところ、ED1、Langerin陽性細胞数はA_{2A}、A_{2B}のどちらをブロックしても有意に減少した。ED2陽性細胞数はA_{2B}をブロックした場合には有意に減少を見たが、A_{2A}をブロックした場合には減少傾向はあったものの有意差は見られなかった。OX6陽性細胞数はA_{2A}、A_{2B}のどちらをブロックしても減少傾向は見られたものの有意差は見られなかった。(図5)

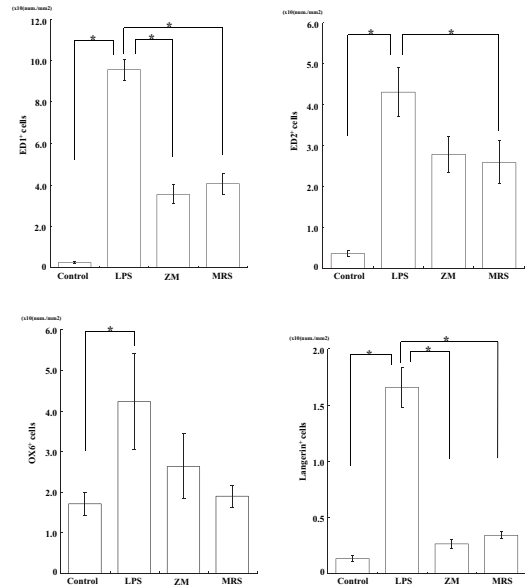


図5 アデノシンレセプターアンタゴニストの抗原提示細胞数に及ぼす影響

以上の事より、LPS+アジュバンドを投与されることによりED1、ED2、OX6、Langerin陽性細胞であるような抗原提示細胞の流入が活発になり、それらの細胞表面のTLR4が活性化し、その下流でアデノシンレセプターA_{2A}そしてA_{2B}が活性化され、その結果として血管造成因子VEGF遺伝子の発現が増加して血管が造成されてくるというメカニズムが考えられる。

これまでの細胞を用いた *in vitro* での報告では、LPSを投与しただけではVEGFの発現は見られず、アデノシンレセプターをアゴニストを用いて活性化してやらなければ、VEGFは発現してこないという報告が存在している。一方今回の我々実験系ではアゴニスト投与によるアデノシンレセプターの活性化が無くとも、LPSの投与のみでVEGFの発現、ならびに実際の血管造成の亢進が確認された。そしてアデノシンレセプターをアンタゴニストを用いてブロックしてやることで血管造

成の抑制が確認されている。
この結果は舌においても VEGF の発現、そしてそれに伴う血管造成にアデノシンレセプターの関与が必要であるが、舌においては既にアデノシンレセプターが活性化されている可能性が示唆される。舌においてはアデノシンレセプターが普段から活性化された状態にあるのか、それともまだ判明していない活性化経路が存在しているのかを明らかにするのが今後の課題であると考えている。

またアデノシンレセプターアンタゴニストを投与してアデノシンレセプター A_{2A} 、 A_{2B} をブロックする事で VEGF 遺伝子の発現ならびに血管造成を抑制できていることより、これらの薬剤を投与することで舌炎に対する有効な薬剤となりうることを示唆している。

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 2 件)

① Shunsuke Baba, Noriyuki Kuroda, Chihiro Arai, Yoshiki Nakamura, Tetsuji Sato,

Immunocompetent cells and cytokine expression in the rat periodontal ligament at the initial stage of orthodontic tooth movement

査読有、

Archives of Oral Biology 56 (2011) 466-473

② Yaiko Hara, Noriyuki Kuroda, Kouji Inoue, Tetsuji Sato,

Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression by adenosine through adenosine A2 receptors in the rat tongue treated with endotoxin

査読有、

Archives of Oral Biology 54 (2009) 932-942

[学会発表] (計 2 件)

① Hara Y, Kuroda N, Sato T

Angiogenesis by VEGF released from antigen-presenting cells during the course of LPS-induced glossitis of rats
11th International Workshop on Langerhans Cells, 2009年9月3~6日、Funchal / Madeira / Portugal

② 原 矢委子、黒田範行、佐藤哲二

An endogenous signal for dendritic cell maturation evaluated in the inflammatory lingual tissue of rats

第 19 回日本樹状細胞研究会、2009 年 7 月 10
- 11 日、淡路夢舞台国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 範行 (KURODA NORIYUKI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50359915

(2) 研究分担者

佐藤 哲二 (SATO TETSUJI)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：10162447

(3) 連携研究者

なし