

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 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：37114
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592406
 研究課題名（和文） 口腔粘膜免疫疾患におけるエフェクター細胞の上皮指向性機序の解明
 研究課題名（英文） Epithelotropism of effector cells in immune disorders of the oral mucosa

研究代表者
 大野 純 (OHNO JUN)
 福岡歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号：10152208

研究成果の概要（和文）：

satellitosis 型および扁平苔癬型口腔粘膜疾患モデルを用いて、エフェクター細胞の上皮指向性機序を検討した。satellitosis 型口腔粘膜病変においては、ICAM-1/LFA-1 接着経路を利用して CD8 陽性細胞が上皮内に浸潤した。一方、扁平苔癬型では、class II および ED1 陽性細胞が、自己抗体の沈着を認める上皮基底膜をターゲットとして浸潤することが明らかとなった。両病変でのエフェクター細胞の違いおよび上皮指向性機序の違いは、病変発症・進行に關与する免疫応答の違いによるものと推測された。

研究成果の概要（英文）：

Epithelotropism of effector cells were studied in rat models of satellitosis-induced and lichenoid oral mucosal disorders. In the satellitosis-induced oral lesion, the induction of ICAM-1 expression on epithelial keratinocytes leads to the migration of CD8⁺ cells into the epithelium. The lichenoid lesion is characterized by intense infiltration of class II⁺ and ED1⁺ cells around the epithelial basement membrane showing deposition of autoantibodies. These findings provided insights into the pathophysiological roles of effector cells in oral mucosal lesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	330,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：口腔粘膜疾患、免疫応答、上皮指向性、エフェクター細胞、satellitosis

1. 研究開始当初の背景

近年、増加傾向にある難治性口腔粘膜疾患は、多様な臨床症状を呈するが、病理組織学的には扁平苔癬型粘膜病変としてグループ化することができる。すなわち、”粘膜被覆

上皮内あるいは上皮直下結合組織へのエフェクター細胞であるリンパ球の浸潤が特徴とされる。しかしながら、これらの病変のエフェクター細胞であるリンパ球の上皮指向

性機序については解明されていない。リンパ球・上皮指向性病変のモデルとして、ラットおよびマウスに GVH (graft-versus-host, 移植片対宿主) 反応を誘導することにより、上皮系組織の進行性破壊が再現できることが知られている。また、GVH 反応モデルにおいては、誘導法の選択により、上皮破壊が著しい急性型と全身性自己免疫疾患の lupus 類似性病変を示す慢性型がみられる。しかしながら、口腔粘膜病変におけるエフェクター細胞の上皮指向性機序の解明に、これらのモデルを応用した報告はほとんどなかった。

2. 研究の目的

エフェクター細胞の浸潤様式が異なる 2 つの口腔粘膜疾患モデルを作製する。それらのモデルから、エフェクター細胞と口腔粘膜上皮細胞のサイトカインおよび接着分子を介した相互作用によるエフェクター細胞の上皮指向性機構を免疫病理学的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ラット P→F1 リンパ球移入 GVH 反応モデルおよび水銀病モデルを用いて、全身性免疫疾患に継発する口腔粘膜病変を誘導する。免疫病理学的検索を行い、それぞれのモデル病変が、エフェクター細胞の上皮組織内浸潤を特徴とする satellitosis 型あるいは上皮直下を中心に浸潤する扁平苔癬型であるかを検討する。そして、この 2 型口腔粘膜病変におけるエフェクター細胞の上皮指向性機構を解析する。

4. 研究成果

(1) satellitosis 型および扁平苔癬型口腔病変モデルの確立

satellitosis 型モデルは、LEW ラット脾細胞を LBNF1 ラットに投与する P→F1 セミアロ移植系を応用して作製した。モデルの妥当性は、経日的に採取した舌粘膜の病理組織学的所見により検討した。モデル作製 10 日目以降に、リンパ球の上皮内浸潤がみられた。さらに、12 日以降では、上皮内浸潤リンパ球数は増加し、それに伴い上皮組織の壊死および脱落などの上皮破壊が著明となった。以上の所見より、同モデルは satellitosis 型として妥当であると判断した。

扁平苔癬型口腔粘膜病変モデルは、水銀病により誘導される全身性自己免疫疾患としての口腔粘膜病変と P→F1 慢性移植片対宿主病(cGVHD)型口腔粘膜病変の 2 種類を作製して検索した。水銀病は、BN ラット腹腔内に塩

化水銀を投与して作製した。また、cGVHD モデルは BN ラット脾細胞を LBNF1 ラットに投与する P→F1 セミアロ移植系を応用した。水銀病ならびに cGVHD 口腔粘膜病変は、組織学的に類似していた。すなわち、単核細胞の浸潤が上皮直下に限局し、上皮内への浸潤および上皮破壊は軽度であった。

(2) satellitosis 型および扁平苔癬型口腔病変でのエフェクター細胞の性状

免疫組織化学的検索から、satellitosis 型病変において、上皮内に浸潤するエフェクター細胞は、CD8 陽性 T 細胞が主体であった。また、初期病変の上皮直下結合組織には NK 細胞性状を有する細胞の浸潤も認めた。一方、扁平苔癬型病変では、class II 陽性および ED1 陽性細胞の浸潤が主体であった。これらの細胞は、上皮基底膜へ付着する浸潤様式を示した。また、satellitosis 型で主体であった CD8 陽性細胞は、病変の進行期に上皮直下結合組織に限局性に浸潤を認めた。これらの結果は、satellitosis 型および扁平苔癬型におけるエフェクター細胞の相違およびそれらのエフェクター細胞がターゲットとする上皮組織部位の相違を示していると考えた。

(3) satellitosis 型におけるエフェクター細胞の上皮指向性に関するファクターの検討

経日的な病変モデルの免疫組織化学的検索から、エフェクター細胞の浸潤は、病変が進行してから著明となることが明らかとなった。すなわち、病変の初期には、エフェクター細胞の上皮指向性に関する環境が準備される必要性が考えられた。そこで、エフェクター細胞浸潤前の病変部での免疫染色を検討すると、上皮細胞(KC)での ICAM-1 発現が satellitosis 型の初期病変の特徴であることが明らかとなった。

さらに、エフェクター細胞の上皮指向性に対する KC-ICAM-1 発現の意義を検討した。RT-PCR 法によるインターフェロン・ガンマ (IFN- γ) mRNA 発現から、KC-ICAM-1 発現は病変部の IFN- γ 産生により誘導された。病変部 KC では、IFN- γ mRNA 発現に一致して IFN- γ レセプターが発現していた。したがって、同病変の発症・進行に関する免疫応答は、Th1 型が優位であることが推測された。Stamper-Woodruff binding assay により、病変部上皮は CD8 陽性リンパ球と接着した。さらに、リンパ球と病変部上皮組織の接着は、抗 ICAM-1 抗体および抗 LFA-1 抗体の前処理により阻害された。以上の結果から、CD8 陽性エフェクター細胞の上皮組織への浸潤は、ICAM-1/LFA-1 接着経路の一部

を利用していることが明らかとなった。

(4) 扁平苔癬型におけるエフェクター細胞の上皮指向性に関するファクターの検討

前述したように、本病変では **class II** 陽性細胞と **ED1** 陽性マクロファージの浸潤が特徴であった。浸潤様式は、上皮直下結合組織→上皮基底膜への付着性浸潤であった。**satellitosis** 型で特徴であった **KC-ICAM-1** 発現は見られなかった。この結果は、同病変のエフェクター細胞は、上皮組織の上皮基底膜をターゲットとしている可能性が考えられた。さらに、同モデルの血清中には抗核自己抗体が産生されていることが明らかとなった。

そこで、間接蛍光法による **IgG** および **C3** 検索を行うと、腎臓糸球体基底膜および口腔粘膜上皮基底膜に **Lupus** タイプの蛍光性を認めた。また、口腔粘膜病変部でのサイトカイン発現を **RT-PCR** 法により検索すると、病変部では **IL-4 mRNA** 発現を認めた。以上のことから、水銀病型および **cGVHD** 型口腔粘膜病変は、**Th2** 型免疫反応により発症・進行することが確認された。また、**satellitosis** 型粘膜病変のエフェクター細胞である **CD8** 陽性細胞の浸潤態度は、軽微であった。この結果は、同病変での **IFN- γ** の産生低下による **KC** における **ICAM-1** 発現の抑制が関与している可能性が示唆された。

(5) まとめ

以上の結果から、**satellitosis** 型病変と扁平苔癬型病変は、両者ともに **T** 細胞関連免疫応答により発症するものであった。しかし、エフェクター細胞および病変の進行に関する免疫応答に違いがあることが明らかとなった。両病変の病態は、エフェクター細胞の上皮指向性病変であったが、**satellitosis** 型では **CD8** 陽性細胞傷害性 **T** 細胞であり、扁平苔癬型病変では **class II** 陽性細胞および **ED1** 陽性マクロファージであった。また、指向性に関連するファクターは、**satellitosis** 型では **KC** での **ICAM-1** 発現が強く関与していた。それに対して、扁平苔癬型のエフェクター細胞は、自己抗体が沈着している上皮基底膜をターゲットとした。両病変でのエフェクター細胞の違いおよび上皮指向性機序の違いは、病変発症・進行に関する免疫応答の違いによるものと推測された。

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 13 件)

1. Shinozaki Y, Mori N, Ohno J, Kawaguchi M, Kido H, Hayakawa T, Fukushima T (2012) Rat calvarial tissue response

to flowable DNA/protamine complex mixtures with DNA/ chitosan complex to be used as a protective membrane for guided bone regeneration. *J Oral Tissue Engin* 9: 159-166 (査読有)

2. Fukushima T, Ohno J, Imayoshi R, Mori N, Sakagami R, Mitarai M, Hayakawa T (2011) DNA/protamine complex paste for an injectable dental material. *J Mater Sci Mater Med* 22: 2607-2615 (査読有)
3. Hayakawa T, Hirayama S, Ohno J, Fukushima T (2011) Computational approach for calcium complex formation of aromatic carboxylic acid monomers. *Nano Biomedicine* 3: 200-207 (査読有)
4. Mori N, Iwahashi T, Ohno J, Shinozaki Y, Sakagami R, Mitarai M, Fukushima T (2011) Cell viability and tissue response of high molecule weight DNA/protamine complex. 8: 188-194 (査読有)
5. Kawaguchi M, Ohno J, Irie A, Fukushima T, Yamazaki J, Nakashima N (2011) Dispersion stability and exothermic properties of DNA-functionalized single-walled carbon nanotubes. *Int J Nanomedicine* 6:729-736 (査読有)
6. Ohno J, Iwahashi T, Ehara M, Ozasa R, Hanada H, Funakoshi T, Taniguchi K (2011) Induction of epithelial migration of lymphocytes by intercellular adhesion molecule-1 in a rat model of oral mucosal graft-versus-host disease. 26:725-733 (査読有)
7. Ohno J, Iwahashi T, Ehara M, Taniguchi K (2011) Alterations in PNA binding of keratinocytes in oral keratosis. *Biotech Histochem* 86:168-173 (査読有)
8. Ohno J, Iwahashi T, Ozasa R, Okamura K, Taniguchi K (2010) Solitary neurofibroma of the gingiva with prominent differentiation of Meissner bodies: a case report. *Diagn Pathol* 22:61 (査読有)
9. Fukushima T, Ohno J, Hayakawa T, Imayoshi R, Kawaguchi M, Doi Y, Kanaya K, Mitarai M (2010) Polycationic protamine for water-insoluble complex formation with DNA. *Dent Mater J* 29:529-535 (査読有)
10. Akao T, Kimura T, Hirofuji YS, Matsunaga K, Imayoshi R, Nagao J, Cho T, Kaminishi H, Ohatono S, Ohno J,

Taniguchi K (2010) A poly (gamma-glutamic acid)-amphiphile complex as a novel nanovehicle for drug delivery system. J Drug Target 18:550-556 (査読有)

11. Kawaguchi M, Ohno J, Iwahashi T, Fukushima T, Hayakawa T, Doi Y (2009) Bone response of DNA-chitosan-apatite complexes. J Oral Tissue Engin 7:89-98 (査読有)
12. Fukushima T, Ohno J, Hayakawa T, Kawaguchi M, Inoue Y, Takeda S, Toyoda M, Okahata Y (2009) Mold fabrication and biological assessment of porous DNA-chitosan complexed. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 91: 746-754 (査読有)
13. Okamura K, Ohno J, Iwahashi T, Enoki N, Taniguchi K, Yamazaki J (2009) Giant cell fibroma of the tongue: report of a case showing unique S-100 protein and HLA-DR immunolocalization with literature review. Oral Med Pathol 13:75-79 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 大野 純、岩橋輝明、谷口邦久 ミニ移植法によるマウス口腔メラノーマ抑制の可能性 第100回日本病理学会総会、2011年4月28日—30日、東京
2. 大野 純、森 南奈、岩橋輝明、御手洗誠、庵原啓治、早川 徹、福島忠男 サケ白子由来 DNA/プロタミン複合体の骨形成能 第10回日本再生医療学会、2011年3月1日—2日、東京
3. 川口 稔、入江明仁、福島忠男、大野 純、山崎 純、松浦正朗 ナノカーボン分子ヒーターの創製—CNT/抗体複合体の調整 第55回日本歯科理工学会、2010年4月18日、東京
4. 岩橋輝明、大野 純、小笹竜起、榎 規雄、岡村和彦、谷口邦久 横紋筋侵入をともなう顆粒細胞腫の免疫組織化学的検討 第21回日本臨床口腔病理学会総会 2010年7月31日—8月1日、大阪
5. 岩橋輝明、大野 純、小笹竜起、谷口邦久 センチネルリンパ節における腫瘍反応性リンパ節症の病態 第99回日本病理学会総会 2010年4月27日—29日、東京
6. 大野 純、岩橋輝明、谷口邦久 口腔扁平上皮癌細胞のスフェロイド形成能 第99回日本病理学会総会 2010年4月27日—29日、東京
7. 森 南奈、大野 純、福島忠男、坂上竜資 骨形成促進効果を有するサケ白子由来DNAとプロタミンからなる複合体

ペースト 第56回日本歯科理工学会
2010年10月9日—10日、岐阜

8. 大野 純、岩橋輝明、榎 規雄、岡村和彦、谷口邦久 マウス自然発症転移モデルにおけるセンチネルリンパ節の動態 第98回日本病理学会総会 2009年5月1日—3日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計◇件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 純 (OHNO JUN)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10152208

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

