

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792138

研究課題名（和文）老化口腔組織のリンパ管における Toll 様受容体を介した病態制御機構の解明

研究課題名（英文） The Clarification of pathologic regulation via Toll-like receptors on senescent lymphatic endothelial cells in oral cavity

研究代表者 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

研究成果の概要（和文）：

老化に伴う免疫機構の変化は未だに不明な点が多く、種々の治療において障壁となることが多く見られます。今回の研究では、免疫機能に大切な役割を果たす受容体に焦点を当て、老化と口腔内のリンパ管との関連を調べました。その結果、老化に伴ってリンパ管の免疫機能に関わる受容体発現、ならびにその反応性に変化がもたらされることが分かりました。

以上の事は、加齢によって起こる免疫力の低下に特定の受容体が関与する可能性を示唆しています。

研究成果の概要（英文）：

I investigated to clarify the pathologic regulation via toll-like receptors on senescent lymphatic endothelium in oral cavity. It was found that immune responses through toll-like receptors on lymphatic endothelium were downregulated in ageing.

It is possible that lymphatic endothelium may regulate immunesenescence system via toll-like receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：リンパ管内皮細胞、ケモカイン、Toll 様受容体、免疫老化

1. 研究開始当初の背景

人体の脈管は、血管系とリンパ管系に分類

される。血管に関する研究は以前から精力的に行われているが、リンパ管に関する研究は、近年に至るまでほとんど行われていなかった。しかし近年、vascular endothelial growth factor receptor-3、desmoplakin、*prospero* related homeobox gene-1 (*prox1*)、lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1)、ならびに podoplanin などのリンパ管特異的抗原の発見により、リンパ管に関する研究が世界的規模で盛んに行われるようになってきた。

申請者も 2004 年からリンパ管研究に参画し、ヒト小腸毛細リンパ管および歯肉リンパ管が、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-like receptor (TLR) 2 および TLR4、ならびに、ケモカインのひとつである *cys-cys* (C-C) chemokine ligand 21 (CCL21) を発現することなどを明らかにし、リンパ管が、今まで考えられてきた常態制御だけではなく病態制御にも貢献する可能性を示唆する結果を得てきた。

近年のリンパ管研究、ならびに申請者の研究結果から、自然免疫と獲得免疫の架橋としてリンパ管が重要な役割を担っていることが示唆される。

一方現在申請者は、高齢者歯科学教室に所属しているが、治療の対象としている患者の多くは 65 歳以上の高齢者であり、加齢または慢性疾患による免疫力の低下を伴っている。しかしながら、加齢に伴う免疫機構の変化については不明な点が多い。

以上のことから申請者は、加齢現象に伴って、リンパ管が担う免疫機構にも変化が生じるのではないかと考えた。しかし、リンパ管内皮細胞特異抗原を用いた細胞分離培養システムが確立されたのは最近であるため、このような研究報告は現在に至るも非常に少なく、ましてや、口腔組織におけるリンパ管内皮細胞と TLR との関連を免疫老化という視点から捉えた研究は全く行われていないことから、口腔組織リンパ管内皮細胞における TLR を介した免疫老化機構を解明する事を目的として本研究を企画した。

## 2. 研究の目的

本研究は、口腔組織リンパ管における TLR を介した免疫老化に焦点を当てる。

具体的には、

(1) 老化した組織および老化していない組織を用いて、リンパ管における種々の TLR、TLR 関連分子、ならびにケモカインの発現様式の相違を明らかにする。

(2) 老化した培養リンパ管内皮細胞および老化していない培養リンパ管内皮細胞を用いて、TLR を介した白血球接着因子およびケモカインの産生誘導機構、ならびに NF- $\kappa$ B の活性化状態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試料提供を受けるヒト口腔健常・炎症組織（舌、歯肉、頬粘膜、歯髄、口蓋粘膜、顎下リンパ節、口蓋扁桃等）を材料とした in vivo の検索を行う。

なお、採取組織は、老化マーカー-p16<sup>INK4a</sup>および senescence-associated acidic  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) の応用により、老化した組織と老化していない組織を区別することが可能となる。また、臨床的に炎症症状が存在し、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色により白血球の著しい浸潤が認められる組織を炎症組織とする。

#### <免疫染色を用いた免疫組織化学的検索>

①凍結連続切片を作製し、1枚目の切片では、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色と SA- $\beta$ -Gal に対する特異抗体を用いた2重染色を施す。なお、臨床的に炎症症状が存在し、H-E 染色により白血球の著しい浸潤が認められる組織を炎症組織と判定する。

②2枚目の切片に対しては、リンパ管を同定するために、LYVE-1 および CCL21 に対する特異抗体を用いた2重染色を施す。

③3枚目以降の切片に対しては、3) で同定したリンパ管に対して、種々の TLR (TLR1~TLR9)、ならびに種々の白血球接着因子 (PECAM-1、ICAM-1、ならびに VCAM-1) に対する特異抗体を用いた3重染色をそれぞれに施す。

#### (2) In vitro の検索

①すべての細胞株は、提供を受けるドナーの違いから、老化に至るまでの細胞分裂回数が異なるため、細胞分裂してその数が2倍になる時間 (population doubling time (PDT))

に関しての検索が必須となる。PDT の測定にはすでに製品化されてる XTT 分析を用いる。

②培養 LEC の老化に対する評価は、PDT と、老化マーカーである SA- $\beta$ -Gal を用いて染色を行う。

③遺伝子の検索には (定量) RT-PCR を、タンパク質の検索にはウェスタンブロット・免疫染色・ELISA を、また転写因子活性化の検索には、定量 RT-PCR・ウェスタンブロット・ゲルシフトアッセイをそれぞれ用いる。

TLR1~9 に対するリガンドで未処理、ならびに処理した LEC および老化 LEC における種々の TLR および関連分子の発現量、種々の白血球接着因子および CCL21 の発現量、ならびに NF- $\kappa$ B の活性を検索し、それぞれを比較解析する。

## 4. 研究成果

### 【研究の主な成果】

#### (1) In vivo の検索

##### ①ヒト口蓋扁桃についての検索

ヒト口蓋扁桃は組織の特性上、健常組織と炎症組織を区別することが困難であることから、老化した口蓋扁桃組織および老化していない口蓋扁桃組織を区別した。

##### ①-1: 老化していない口蓋扁桃組織

- 全てのリンパ管は LYVE-1 および CCL21 を発現する (全ての血管は LYVE-1 を発現しない。CCL21 に関しては高内皮細静脈における発現が報告されているため、リンパ管の中に含まれている可能性がある)。

- LYVE-1 および CCL21 陽性リンパ管は、

TLR2 および TLR4 を発現する。

① - 2 : 老化した口蓋扁桃組織

- ・老化した組織においては老化していない組織と比較して発現様式に大きな変化が認められないが、染色が可能であった組織の数が少なかった (n=3) ことから、統計学的には不明であった。

②ヒト歯髄組織についての検索

② - 1 : 老化していない健常歯髄組織

- ・全てのリンパ管は LYVE-1 および CCL21 を発現する (全ての血管は LYVE-1 を発現しない)。
- ・LYVE-1 および CCL21 陽性リンパ管は、TLR2 および TLR4 を発現しない。

② - 2 : 老化していない炎症歯髄組織

- ・全てのリンパ管は LYVE-1 を発現するが、CCL21 に関しては LYVE-1 陽性リンパ管の一部で発現が認められた (全ての血管は LYVE-1 を発現しない)。
- ・LYVE-1 および CCL21 陽性リンパ管は、TLR2 および TLR4 を発現しない。
- ・染色が可能であった組織の数が少なかったことから (n=3)、上記結果については議論の余地がある。

② - 3 : 老化した健常歯髄組織

- ・全てのリンパ管は LYVE-1 および CCL21 を発現する (全ての血管は LYVE-1 を発現しない)。
- ・LYVE-1 および CCL21 陽性リンパ管は、TLR2 および TLR4 を発現しない
- ・染色が可能であった組織の数が少なかったことから (n=3)、上記結果については議論の余地がある。

② - 3 : 老化した炎症歯髄組織

- ・染色が可能であった組織数はわずかに 1 であったことから発現様式に関しては不明である。

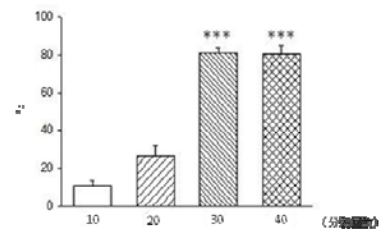
(2) In vitro の検索

①市販ヒト正常リンパ管内皮細胞の培養と老化リンパ管内皮細胞株の樹立

- ・申請者は数年前からヒト頬粘膜におけるリンパ管内皮細胞の分離培養に取り組んできたが、これを達成することはできなかった。一方で市販ヒト正常皮膚または肺リンパ管内皮細胞株を培養・継代して研究を並行してきた。口腔組織由来のリンパ管内皮細胞を用いることができなかったが市販ヒトリンパ管内皮細胞を用い、以下の結果を得た。

① - 1 : 老化リンパ管内皮細胞

- ・培養ヒトリンパ管内皮細胞は、分裂回数が 20 回を超えた時点で老化細胞が徐々に増加し、分裂回数が 30 回以降では 80%以上が老化マーカー陽性細胞であることが明らかとなった。



老化細胞の割合 (%)

① - 2 : TLR の発現様式

- ・培養ヒト老化リンパ管内皮細胞では、TLR4 を発現する細胞と発現しない細胞が認められた。なお、老化していない培養ヒトリンパ管内皮細胞はその

すべてが TLR4 を発現する。

- ・培養ヒト老化リンパ管内皮細胞では、老化していないヒトリンパ管内皮細胞と比較して TLR2 の発現が著しく低下していた。
- ・その他の TLR に関しては発現に相違は認められなかった。

#### ① - 3 : TLR の機能的相違

- ・培養ヒトリンパ管内皮細胞および培養ヒト老化リンパ管内皮細胞を TLR4 および TLR2 のリガンドで処理した後 CCL21 の発現様式を検索したが、用いる老化細胞によってその発現様式が大きく異なり定量することが困難であった。これは、培養を繰り返すことにより本来の機能から逸脱した機能を獲得した細胞が存在している可能性を示唆するものである。

#### 【得られた成果の国内外における位置づけとインパクト】

2004 年の段階で、リンパ管内皮細胞の白血球接着因子、ケモカインならびに TLR に関する検索は、申請者の研究のみであり、現時点においても申請者の研究、2008 年に Pegu らが市販ヒト正常皮膚リンパ管内皮細胞を用い遺伝子レベルで行った検索、また、2008 年に Sawa らが市販ヒトリンパ管内皮細胞を用いて LPS の反応を検索した以外は見当たらず、ましてや 口腔組織リンパ管内皮細胞、しかも老化に焦点を当てて行っている研究は国内外を通して一切存在しない。

一方、今回申請者が組織学および分子細胞学的に明らかにした事柄は、老化の進行が、リンパ管内皮細胞の TLR を介した免疫機構に変化をもたらす可能性を示唆している。以上のことは、従来まで考えられていなかった新

しい領域において免疫老化が関与する可能性を示唆できたことになり、大きなインパクトがあると考えられる。

#### 【今後の展望】

(1) 申請者が In vitro の検索に用いた細胞は、皮膚または肺由来のリンパ管内皮細胞であって口腔組織由来ではないことから、In vitro における結果と In vivo における結果の相関には議論の余地がある。以上のことから引き続きヒト口腔組織由来リンパ管内皮細胞の分離培養を継続する必要があると考えられる。

(2) 申請者の研究に用いた資料はすべてヒト由来である。しかし、用いることのできるサンプル数が限られ十分な検索ができないことが多いことから、今後はマウスを積極的に用い、リンパ管内皮細胞における免疫機構への関与を詳細に検討する必要がある。

(3) 世界的に進行する高齢化社会において、骨粗鬆症の罹患者数は非常に多いことが知られている。ところが近年、骨粗鬆症治療薬の服用により、顎骨壊死が副作用として起こることが多く報告されている。このことに関して近年、顎骨壊死とリンパ管新生との関連を示す興味深いデータが報告されたが、申請者が行っている一連の研究は、この顎骨壊死におけるリンパ管の新生および顎骨壊死に伴う免疫機構の解明にも貢献できる可能性が高い（既にこの研究者を訪れ、共同で研究を行なっている）。

#### 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)

研究者番号：40443915

〔雑誌論文〕（計2件）

① Kuroshima S. A Case of Prosthodontic Rehabilitation after Maxillo-mandibular Reconstruction Using Milling and Riegel Telescopic Method. *Ann. Jpn. Prosthodont. Soc.* 2(4): 287-290, 2010. 査読（有）

② Saito N, Yamane N, Matsumura W, Fujita Y, Inokuma D, Kuroshima S., Hamasaka K, Shimizu H. Generalized exacerbation of systemic allergic dermatitis due to zinc patch test and dental treatments. *Contact Dermatitis.* 62(6): 372-373, 2010. 査読（有）

〔学会発表〕（計2件）

① Kuroshima S., L. McCAULEY, and J. YAMASHITA, 89th General Session & Exhibition of the IADR, 2011年3月17日. カリフォルニア, アメリカ合衆国 Selected Oral Presentation. Abstract No. 0423

② Kuroshima S. A case of prosthodontic rehabilitation after maxillo-mandibular reconstruction using Riegel telescopic method and milling technique. *J. Jpn. Prosthodont. Soc.* 29, 2009年10月24日. 岩手歯科医師会館 8020 プラザ（岩手）

〔図書〕（計1件）

①（著）Stephen T. Chen、（訳）黒嶋伸一郎ほか5名、クインテッセンス出版、第4回ITI コンセンサス会議議事録、243-312, 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒嶋 伸一郎 (KUROSHIMA SHINICHIRO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし