

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593073

研究課題名(和文) ウイルス感染による歯の形成障害の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular analysis in developmental defects of teeth by viral infection

研究代表者

門馬 祐子 (Monma, Yuko)

東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師

研究者番号：00191073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染が歯の形成不全を起す可能性を示す疫学調査が報告されている。我々は、ウイルス感染による歯の形成に及ぼす影響について、炎症反応の観点から検討した。マウス単層細胞を培養し、ヘルペス科ウイルスを *in vitro* にて感染させ、その後の培養上清中のサイトカインを測定したところ、炎症性サイトカインの上昇が確認された。免疫細胞によって IFN や IL-1 などのサイトカインが初期の感染状態で産生され、歯の形成にかかわる前駆細胞周囲の繊維芽細胞に作用して、歯の形成に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：On epidemiological studies, it has been reported that the hypoplasia of the teeth is affected by the virus infection. In this study, we investigated that the effect on the formation of a tooth by viral infection in view of the inflammatory responses. We found that inflammatory cytokines were increased in the culture supernatant, when mouse monolayer cells were infected with the herpes family viruses *in vitro*. Inflammatory cytokines such as IFN and IL-1 were produced by immune cells at initial infection phase and then, fibroblasts which are present around the tooth precursor cells, are affected by these cytokines. These results suggested that the formation of a tooth may be influenced by inflammatory cytokines from immune cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：感染症

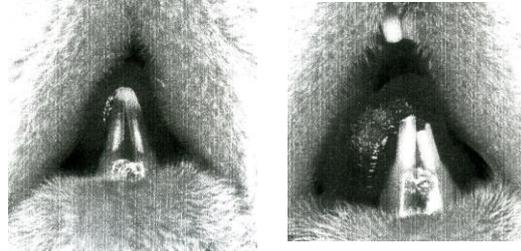
## 1. 研究開始当初の背景

口腔感染症には、細菌感染、ウイルス感染など多くの感染症が存在する。細菌感染については、抗生物質などによる治療法が一定の効果をもつために、それほど問題視されていないが、ウイルス感染については、解決すべき問題は多い。

ウイルス感染のうち、ヘルペス科ウイルスの感染症は、乳幼児期に初感染することが多いとされ、その感染応答の理解は重要である。単純疱疹ウイルス（ヘルペスウイルス）は、初感染時にはヘルペス性歯肉口内炎や再発性口唇ヘルペスの原因である。サイトメガロウイルスは、先天性サイトメガロウイルス感染症の原因である。例えば、先天性免疫不全症や、臓器移植後の免疫抑制剤投与中、悪性腫瘍の治療中などでは、免疫機能が低下しているために、潜伏感染している単純疱疹ウイルス（ヘルペスウイルス）などが出現し始めるために、口腔内へのウイルス排出と口内炎が発症して、再発病変の場合でも重篤化した症状を呈することが知られている。

研究代表者は、これまでヘルペス科ウイルスの病原性に関する研究を一貫して行ってきた。これまで、①実験動物を用いて感染実験を行ったところ、単純疱疹ウイルス（ヘルペスウイルス）をマウス口腔粘膜に感染させた場合、腹腔感染と比較して死亡率や全身へのウイルス播種の著しい低下がみられることを報告した（門馬、歯科基礎誌 1993、JDR 1996）。②神経節への潜伏成立はウイルス量依存性であり、免疫賦活剤投与で潜伏率が低下すること（門馬、Pediatric Dental Journal 1991、Shmizu, 1991）なども報告している。このことは口腔領域の免疫機構は、腹腔内の免疫機構よりも強力であり、口腔内に免疫細胞が存在し、機能を担っていることを示唆するものであり、口腔免疫の重要性を示すものである。

研究代表者はさらに、サイトメガロウイルス感染が *in vivo* で歯の形成異常を起こすことを世界に先駆けて発見している。



新生児期にCMV感染させたマウスの切歯に見られた形成不全

## 2. 研究の目的

最近、口腔領域のウイルス感染に関連した研究が注目されている。①サイトメガロウイルスが Guillam-Barré syndrome における口内炎のトリガーになりうること（Tabanella, 2005）、②根尖病巣からのサイトメガロウイルスが検出されたこと（Andreic, 2007）、③サイトメガロウイルスによるエナメル質形成不全のモデルが作成されたこと（Jaskoll, 2008）が報告されている。また、ウイルス感染が歯の形成不全を起こす可能性を示す疫学調査（Stango, 野坂ら）が報告された。ヘルペスウイルス感染に関する研究の多くは、目や性器への感染実験であり、口腔領域へのウイルス感染の影響を調べたものは極めて少ない。初感染部位が主に口腔領域であることから、口腔領域の免疫機構の解析を含めた全身へのウイルスの波及についての研究も重要である。

そこで本研究では、ウイルス感染による歯の形成に及ぼす影響について、炎症反応の観点、特にサイトカインの観点から明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) NK細胞の単離

マウス脾臓より、リンパ球を通法通り回収す

る。まず、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を用いて、これら抗体を T 細胞に結合させる。洗浄後、マグネチックビーズと結合した抗ラット抗体 (Mg-anti Rat Ig) および抗マウス Ig 抗体(Mg-anti mouse Ig)を結合させる。B 細胞上には Ig が発現しているため、B 細胞には、Mg-anti mouse Ig が結合する。また、T 細胞には、抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体を介して Mg-anti Rat Ig が結合する。その後、マグネットをもちいて、これら T 細胞、B 細胞を除去し、残りの細胞を回収する。

NK 細胞は、CD49 b のマーカーをもっているため、これを利用し、マグネチックビーズと結合した抗 CD49 b 抗体で、T 細胞、B 細胞を除去した細胞集団に結合させる。洗浄後、マグネットを用いて、抗 CD49 b 抗体と結合した細胞集団を単離する。この細胞集団を NK 細胞マーカーを用いて染色しフローサイトメトリーで解析したところ、90%以上の純度で NK 細胞であることが確認できた。

#### (2) サイトカイン産生能の検討

マウス免疫細胞として、マウスリンパ球を取り出し、in vitro で培養を行った。また、単層細胞は、マクロファージ分画と考えられる接着性細胞を用いた。培地は、RPMI1640 培地を基本とし 10%ウシ胎児血清と 2 メルカプトエタノール含有の培養液である。リンパ球は  $5 \times 10^6/\text{ml}$  となるよう調整、単層細胞は集密度 60%程度となるよう調整し、ヘルペスウイルスを感染させ、 $37^\circ\text{C}$ 、3 日間培養した。その培養上清を採取し、ELISA 法にて、サイトカイン産生能を測定した。

#### (3) NK 細胞からのサイトカイン産生能の検討

上記方法により取り出した NK 細胞を in vitro で培養した。NK 細胞には増殖因子が必要なことから、インターロイキン 2 (IL-2) を  $10\text{U}/\text{ml}$  加え、(2) の方法と同様に、培

養しヘルペスウイルスを感染、培養上清を回収して、ELISA 法にて、サイトカイン産生能を測定した。

#### (4) 疑似ウイルスによるサイトカイン産生能の検討

ヘルペス科ウイルスは、DNA ウイルスのため、GC rich の領域の配列を選び、オリゴ DNA を合成した。20bp のオリゴ DNA を脂質二重膜小胞複合体として作製して、疑似ウイルスとした。この疑似ウイルスを、上記細胞の培養液に加え、(2) の方法と同様にしてサイトカイン産生能を測定した。

(5) ELISA 法によるサイトカイン測定  
ELISA 法は、通法どおりの方法でサイトカインの測定を行った。測定したサイトカインは、IFN- $\gamma$ 、IL-1、TNF である。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫細胞からのサイトカイン産生

マウスリンパ球細胞を培養し、ヘルペス科ウイルスを in vitro にて感染させ、その後の培養上清中のサイトカインを測定したところ、炎症性サイトカインである、IFN- $\gamma$ 、IL-1、TNF が産生されることが明らかとなった。

### (2) NK 細胞からのサイトカイン産生

ウイルス感染後直後には、自然免疫系が働き、NK 細胞の活性化がみられる。免疫系細胞には、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、マクロファージなどがあり、上記のリンパ球にはこれら細胞が含まれる。初期のウイルス感染に NK 細胞が重要であることから、NK 細胞によるサイトカイン産生が、他の細胞に影響を及ぼしている可能性がある。そこで、NK 細胞を単離し、NK 細胞によるサイトカイン産生を ELISA 法により測定した。マウス NK 細胞を培養し、ヘルペス科ウイルスを in vitro にて感染させ、その後の培養上清中のサイトカインを測定したところ、多量の IFN- $\gamma$ 、および TNF の産生が認められた。IFN- $\gamma$ は、

T細胞の活性化やマクロファージの活性化を促すことが知られており、ウイルス感染によりNK細胞からのIFN- $\gamma$ 産生は、免疫細胞の活性化および免疫機能増強を示唆するものである。

### (3) マクロファージからのサイトカイン産生

さらに、マウスマクロファージを培養し、同様の実験を行ったところ、IL-1、TNFの産生を認めた。マクロファージの機能は、NK細胞と協働して、相互に産生するサイトカインによって機能増強されることが知られている。NK細胞からのIFN- $\gamma$ 産生が過剰な免疫反応を示す可能性が考えられた。

### (4) 疑似ウイルスを用いたサイトカイン産生の研究

さらに、合成DNAが細胞内に取り込まれるよう工夫して、合成DNAによる疑似ウイルス感染モデルの作成を行った。

NK細胞からは、IFN- $\gamma$ 、TNFが産生され、マクロファージからは、IL-1が産生されることが判明し、ヘルペスウイルス感染と同様の結果が認められた。

### (5) マウス単層細胞を用いた研究

マウス単層細胞を培養し、ヘルペス科ウイルスをin vitroにて感染させ、その後の培養上清中のサイトカインを測定したところ、炎症性サイトカインの上昇が確認された。

疑似ウイルス感染モデルにおいても、マウス単層細胞（主として繊維芽細胞）を用いて実験を行った結果、同様のサイトカイン産生を認めた。そこで、マウス単層細胞の培養液中に、NK細胞が産生すると考えられるIFN- $\gamma$ 、TNF、マクロファージが産生すると考えられるIL-1を加え刺激したところ、IL-8、IL-6、MCP-1が産生することが明らかとなった。

このように、免疫細胞によってIFNやIL-1などのサイトカインが初期の感染状態で産生され、歯の形成にかかわる前駆細胞周囲に存在する繊維芽細胞に作用して、炎症性サイトカインが産生され、歯の形成に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

さらに研究代表者は、米国NIHのDr.Hooksらと共にヒトRPE cellにおけるCMV感染後のケモカインの発現（IL-8の増加、MCP-1,-3の減少）や、ヒト歯肉由来細胞におけるヘルペス科ウイルス感染後のサイトカインの動態（IL-8,IL-6,MCP-1の増加、RANTSの増加と減少）を調べている。

今後、炎症性サイトカインが歯の形成異常のどこの段階で影響を及ぼすか詳細を解析していく予定である。

## 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1件）

1. 橋元 亘、中村恭平、遠藤実里、島田栄理遣、小笠原康悦、中山勝文、佐藤直毅、樋口繁仁. 免疫抑制にはたらくドレスNK細胞の発見. 炎症と免疫 21:297-304. 2013（査読無）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門馬 祐子 (Monma Yuko)

東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師  
研究者番号：00191073

### (2) 研究分担者

小笠原 康悦 (Ogasawara Koetsu)

東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：30323603

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：