

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861946

研究課題名(和文) 口腔粘膜のウイルス認識機構の解明と口腔粘膜炎症性疾患における意義

研究課題名(英文) Significant and function of Virus recognition system in oral mucosa

研究代表者

福井 暁子 (FUKUI, AKIKO)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：50647550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：宿主細胞はウイルスの侵入を検知し防御応答を行っている。Retinoic acid inducible gene-1(RIG-I)は細胞内レセプターでウイルスRNAを認識しI型IFNを分泌するが口腔粘膜細胞での報告はなく、今回口腔粘膜が担う免疫応答メカニズムを解明するため、口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞のRIG-Iの発現と機能の検討を行った。結果、口腔粘膜上皮細胞(RT7)と歯肉線維芽細胞(GT1)はRIG-Iを発現しRIG-Iを介しdsRNAを認識しIRF3/STAT1経路でIFN- γ 、CXCL10を発現することを明らかにし、口腔粘膜がRIG-Iを介した特異的な免疫機構を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Innate immune response by oral mucosal cells may be the first line of host defense against viral infection. Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) recognizes viral dsRNA in the cytoplasm, and RIG-I-mediated signaling regulates antiviral type I IFN, and inflammatory chemokine production. Here, we tested the hypothesis that oral mucosal cell participation in host defense against viral infection via RIG-I. In this study, RT7 and GT1 constitutively expressed RIG-I in the cytoplasm. Furthermore, PLV increased IFN- γ and CXCL10 productions in both RT7 and GT1 via RIG-I concurrent with phosphorylation of IRF3 and STAT1. We propose that RIG-I in oral keratinocytes and fibroblasts may cumulatively develop host-defense mechanisms against viral infection in oral mucosa.

研究分野：口腔外科

キーワード：RIG-I TLR dsRNA 炎症性サイトカイン I型IFN

1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルス等の微生物感染に対する宿主の自然免疫防御機構として Toll-like receptor (TLR) が知られているが、TLR 以外の病原体認識機構の存在が指摘されている。Retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) は近年同定された TLR 非依存性にウイルスを認識する細胞内レセプターで、ウイルス RNA を認識し抗ウイルス作用を持つ I 型 IFN を分泌することが報告されている。一方、病原体感染に対する第一の防御機構である口腔粘膜はウイルスの細胞内侵入を検知するウイルス認識機構をもち、それらを介し防御応答を行っている可能性が示唆されるが、口腔粘膜上皮細胞における RIG-I を介したウイルス認識機構の詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで今回、口腔粘膜細胞がウイルス由来特異的病原の侵入を認識し、誘導する細胞内免疫応答のメカニズムの検討を行った。

2. 研究の目的

口腔粘膜はウイルス感染経路の 1 つであり様々な宿主免疫応答機構が存在すると考えられるが、口腔粘膜細胞でのウイルス認識レセプターを介した宿主防御機構についての報告はほとんどない。今回、口腔粘膜が担う免疫応答メカニズムを解明するために口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞の RIG-I の発現と機能を検討した。

3. 研究の方法

1. 口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞における RIG-I と TLR1-10 の発現

不死化口腔粘膜上皮細胞 RT7、不死化歯肉線維芽細胞 GT1、さらに健常者頬粘膜上皮細胞で RIG-I と各種 TLR の発現を RT-PCR 法で検討した。また RT7 と GT1 においては RIG-I の細胞内発現の局在を細胞免疫染色にて検討した。

2. 口腔粘膜上皮細胞と歯肉線維芽細胞における RIG-I による I 型 IFN と炎症性ケモカインの発現

口腔粘膜における RIG-I を介した防御機構について検討するため、dsRNA を細胞内導入するよう合成された RIG-I 特異的リガンド (poly: IC /Lyobec, Invivogen 社) を用い、誘導される I 型 IFN (IFN- α 2, IFN- β) の発現を検討した。ウイルス感染で誘導される白血球を遊走活性化する 3 種類のケモカイン (CXCL10, CCL20, IFN- γ) の発現検討も行った。

3. RIG-I siRNA トランスフェクション細胞における I 型 IFN と炎症性ケモカインの発現

RIG-I siRNA を導入した RT7 と GT1 のノックダウン細胞を作製し、I 型 IFN や炎症性ケモカイン蛋白の分泌の変化を検討した。

4. 口腔粘膜上皮細胞と歯肉線維芽細胞における RIG-I を介したシグナル伝達経路の解析

各種シグナル伝達阻害剤 (SP600125, PD98059, SB203580, AG490, APDC) を用い RIG-I リガンドで誘導される CXCL10 の発現を検討した。

5. 口腔粘膜上皮細胞と歯肉線維芽細胞における RIG-I が誘導する STAT1 と IRF3 リン酸化の検討

RIG-I リガンドによる CXCL10 の発現誘導は、JAK/STAT 経路に関与していることが示唆されたため、STAT1 リン酸化の検討を行った。また I 型 IFN の発現に関与する IRF3 のリン酸化も同様に検討した。

6. IFN- β が CXCL10 の発現誘導に与える影響

RIG-I により誘導された IFN- β がタイ

プ1 IFN レセプターに結合することで CXCL10 の発現が誘導される経路について、1) RT7 と GT1 における IFN-β による CXCL10 発現誘導の影響、2) IFN-β 抗体と型 IFN レセプター抗体による CXCL10 蛋白発現の阻害を ELISA 法で検討した。

4. 研究成果

1. RT7, GT1 および健常者頬粘膜上皮細胞で RIG-I と TLR1 から 10 の発現が RT-PCR 法で認められた。RT7 と GT1 では免疫染色にて RIG-I が細胞質に局在して発現していた。
2. RIG-I リガンドの添加で、RT-PCR にて RT7 では型 IFN である IFN β mRNA の発現が、GT1 では IFN α と IFN β mRNA の発現が濃度依存的に増加した。また RIG-I リガンドの添加で 3 種全てのケモカイン発現が誘導され、なかでも RT7 では CXCL10, GT1 では CXCL10 と CCL20 の発現が大きく増加した。また、両細胞ともに ELISA 法で濃度依存的に CXCL10 蛋白の分泌が上昇した。
3. コントロール細胞やコントロール siRNA 導入細胞と比較し、RIG-I のノックダウン細胞では、RIG-I リガンドによる IFN β や CXCL10 の発現が RT-PCR で減少した。IFN β, CXCL10 蛋白の分泌も ELISA 法で減少を示した。
4. RT7 と GT1 の両細胞において JAK2 阻害剤である AG490 で CXCL10 の発現が抑制された。GT1 では NF-κB 阻害剤で抑制された。また CXCL10 蛋白の分泌は RT7 と GT1 で AG490 によって濃度依存的に抑制された。

5. ウエスタンブロッティング法にて RIG-I リガンドの添加により、IRF3 と STAT1 の経時的なリン酸化蛋白の発現が認められた。RT7 と GT1 の RIG-I ノックダウン細胞では経時的なリン酸化蛋白の発現が下がり、RIG-I リガンドが RIG-I を介し IRF3 や STAT1 をリン酸化し IFN-β や CXCL10 が誘導されることが明らかになった。
6. RT7 と GT1 において、IFN-β により濃度依存的に CXCL10 蛋白の発現が誘導され、IFN-β 抗体と型 IFN レセプター抗体により、RIG-I リガンドで誘導される CXCL10 蛋白の分泌が減少した。

今回の結果から、口腔粘膜上皮細胞と歯肉線維芽細胞は、口腔粘膜のウイルス感染に対し、RIG-I を介した特異的な免疫機構を持っていることが明らかになった。

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3件)

1. Ohta K, Fukui A, Shigeishi H, Takechi M, Expression and function of RIG-I in oral keratinocytes and fibroblasts *Cell Physiol Biochem*, 査読有 2014 34, 1556-1565.
2. Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Takechi M Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated interleukin-8 production by human submandibular gland epithelial cells. *Mol Med Rep* 査読有 2014,10(5),2377-82

3 . Fukui A, Ohta K, Takechi M

Interleukin-8 and CXCL10 expression in oral
keratinocytes and fibroblasts via Toll-like
receptors. Microbiol Immunol 57(3):198-206.

2013 (査読有)

[学会発表](計1件)

1. Akiko Fukui. Expression and function of
RIG-I in oral keratinocytes and fibroblasts
96th Annual Meeting, Scientific Sessions &
Exhibition in conjunction with the Japanese
Society and Korean Association of Oral and
Maxillofacial Surgeons, 8-13 Sep 2014,
Hawaii,U.S.A

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福井 暁子 (FUKUI AKIKO)
広島大学病院 ・ 歯科診療医
研究者番号 : 50647550