

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463010

研究課題名(和文) 口腔粘膜細胞のDNA認識機構の解明と口腔粘膜炎症の調節

研究課題名(英文) Investigation of DNA recognition system in oral mucosa

研究代表者

西 裕美(Nishi, Hiromi)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：70403558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜上皮細胞や線維芽細胞はヘルペス由来dsDNAの侵入を細胞内受容体によって認識し、NF- κ Bの活性化を介して、CXCL10の発現誘導を行っていることが示唆された。またヘルペス由来dsDNAの認識に対して口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞はRNA受容体であるRIG-Iが関与していることが明らかになった。一方、IFI16の抑制は線維芽細胞におけるdsDNA誘導性のCXCL10の発現を抑制した。IFI16のdsDNA認識機構については現在さらに詳細なメカニズムの検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：To investigate DNA viral recognition mechanism in oral mucosal cells, we examined the effects of double-strand DNA (dsDNA) derived HSV on anti-viral and inflammatory response in immortalized oral keratinocytes (RT7) and gingival fibroblasts (GT1). We found that CXCL10, a chemokine associated with regulation of T cells, was induced by transfected dsDNA. However, naked dsDNA did not affect the CXCL10 expression. Transfected DNA increased the expression of NF- κ B in nuclear fraction, and I κ B inhibitor decreased CXCL10 expression in both cell in dose dependent manner. CXCL10 expression were inhibited by RIG-I siRNA in both cells, whereas IFI16 siRNA decreased CXCL10 expression in GT1, but not RT7. Oral keratinocytes and fibroblasts recognized dsDNA via intercellular receptor to produce anti-viral chemokines through NF- κ B activation, and RIG-I and IFI16 may have a role in regulating these immune responses.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔粘膜疾患

1. 研究開始当初の背景

単純ヘルペスウイルス(HSV)は口腔粘膜の感染の原因となる。一方で口腔粘膜細胞はヘルペスのような DNA ウイルスに対して何らかの宿主防御応答を行っていることが考えられる。申請者らはこれまで口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞が CPG モチーフを持つ single strand DNA を認識する受容体 Toll-like receptor (TLR9) を発現し、IL-8 の発現誘導に関与していること、また細胞内ウイルス認識受容体である RIG-I が double strand RNA を認識し、I 型 IFN を発現誘導することを報告している。しかしながら口腔粘膜細胞における double strand DNA (dsDNA) 認識に関する初期免疫応答機構については不明である。

近年、dsDNA を細胞内で認識する受容体 Gamma-interferon-inducible protein-16 (IFI-16) が同定されている。IFI-16 は HIN-200 ファミリーに属し、HIN ドメインを介して DNA と直接結合し、下流のシグナル伝達を介して抗ウイルスや炎症関連遺伝子を誘導する。また、近年 DNA 認識受容体として報告されている Absent in melanoma 2 (AIM2) は dsDNA を認識し、インフラソームの活性化を介して、アポトーシスや炎症関連遺伝子を誘導することが知られている。申請者らは予備実験で不死化口腔粘膜上皮細胞(RT7)、不死化歯肉線維芽細胞(GT1)が AIM2、IFI16 を発現している結果を得た。この結果から、口腔粘膜細胞は細胞内 DNA センサーを持っており、ヘルペスウイルスなど DNA ウイルスの侵入により抗ウイルス遺伝子や、炎症性遺伝子を発現することを示唆している。口腔粘膜細胞における dsDNA 認識機構の存在の報告は国内外でもない。

2. 研究の目的

口腔粘膜細胞における DNA ウイルスに対する口腔粘膜細胞における初期免疫応答に関する報告は国内外でも報告がない。不死化口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞を用いてヘル

ペス由来 dsDNA が細胞内に侵入した際の炎症関連遺伝子の発現誘導などの初期免疫応答やその応答に関連する DNA 受容体を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 用いた細胞

細胞は hTERT 遺伝子を導入することによって不死化させた口腔粘膜上皮細胞 RT7、不死化歯肉線維芽細胞 GT1 を用いた。RT7 は表皮角化細胞倍地 (Lonza 社)、GT1 は DMEM 培地 (Sigma 社) で培養を行った。

2) DNA の細胞内導入

使用した DNA はヘルペスウイルス由来の dsDNA (HSV-dsDNA) と ssDNA (HSV-ssDNA) (Invivogen 社) を用いた。これらの DNA を Transfection reagent (Invivogen 社) で反応させた後、両細胞にトランスフェクションを行った。

HSV DNA の細胞内導入の確認は FITC 標識した同配列の dsDNA を両細胞にトランスフェクションし、細胞蛍光免疫染色を行った。

3) HSV-dsDNA の細胞内導入によって誘導される炎症性サイトカインの発現誘導

RT7、GT1 に HSV-dsDNA、HSV-ssDNA を添加、あるいは細胞内導入し、12 時間後の RNA を抽出、cDNA を合成し、IFN- β mRNA、CXCL10 mRNA の発現を Real-time PCR 法で検討した。

4) HSV-dsDNA の細胞内導入によって誘導される炎症性転写因子とその阻害剤による影響

RT7、GT1 に HSV-dsDNA を細胞内導入し、経時的に全蛋白を抽出し、NF- κ B 関連蛋白のリン酸化を Western blotting で検討した。また HSV-dsDNA を細胞内導入し、経時的に核内蛋白を抽出し、NF- κ B の核内移動を Western blotting で検討した。RT7、GT1 に NF- κ B 阻害剤 BAY11-7082 (Invivogen 社) で前処理を行った後、HSV-dsDNA を細胞内導入し、12 時間後の RNA を抽出、cDNA を合成し、

CXCL10 mRNA の発現を Real-time PCR 法で検討した。

5) DNA 関連受容体の発現と特異的 siRNA による抑制

コンフルエンスの RT7, GT1 から RNA を抽出, cDNA を合成し, IFI16 mRNA, AIM2mRNA, TLR9mRNA の発現を RT-PCR 法で確認した。IFI16, AIM2, TLR9 の特異的 siRNA を作成し, RT7, GT1 に添加し, 48 時間後の IFI16 mRNA, AIM2mRNA, TLR9mRNA の発現を検討した。

6) DNA 関連受容体の抑制による炎症関連遺伝子の発現の影響

IFI16, AIM2, TLR9 の特異的 siRNA を RT7, GT1 に添加し, 48 時間後, HSV-dsDNA を細胞内導入し, 12 時間後の RNA を抽出, cDNA を合成し, CXCL10 mRNA の発現を Real-time PCR 法で検討した。

4. 研究成果

1) DNA の細胞内導入

RT7 に FITC 標識した HSV dsDNA (FITC-HSV dsDNA) を添加もしくは transfection reagent を用いて細胞内に導入し, 細胞蛍光免疫染色を行った。その結果, HSV dsDNA を添加した細胞内に FITC-HSV dsDNA の存在は認めなかったが, 細胞内導入した細胞内に FITC-HSV dsDNA が認められた。

2) HSV-dsDNA の細胞内導入によって誘導される炎症性サイトカインの発現誘導

RT7 と GT1 において, HSV dsDNA の添加, あるいは HSV dsDNA, HSV ssDNA の細胞内導入を行い, 炎症応答性遺伝子の発現誘導を検討した。両細胞において, いずれの処理においても IFN- β の発現誘導は認められなかった。一方, 両細胞において HSV dsDNA を細胞内導入した際, CXCL10 の著しい発現誘導が認められた。しかし, HSV dsDNA の添加や HSV ssDNA の細胞内導入においては CXCL10 の発現誘導は認められなかった。

3) HSV-dsDNA の細胞内導入によって誘導される炎症性転写因子とその阻害剤による影響

両細胞において HSV dsDNA を細胞内導入することで, NF- κ B の活性化の前段階に生じる I κ B α のリン酸化の亢進が認められた。さらに HSV dsDNA による核内での NF- κ B の発現の亢進が認められた。また両細胞において BAY11-7082 により HSV dsDNA 応答性の CXCL10 の発現が有為に抑制された。

4) DNA 関連受容体の発現と特異的 siRNA による抑制

RT7, GT1 における IFI16, AIM2, RIG-I, TLR9 の特異的 siRNA は IFI16mRNA, AIM2mRNA, TLR9mRNA の発現を有意に抑制した。

5) DNA 関連受容体の抑制による炎症関連遺伝子の発現の影響

IFI-16, AIM2, TLR9 ノックダウン細胞を用いて HSV dsDNA で誘導される CXCL10 の発現の影響を検討した。RIG-I のノックダウンは, 両細胞においてコントロールと比較して HSV dsDNA 応答性の CXCL10 の発現が抑制された。その結果, IFI-16 のノックダウンが, GT1 において CXCL10 の発現を抑制したが, RT7 では CXCL10 の抑制は認められなかった。

今回の結果において, 口腔粘膜上皮細胞や線維芽細胞はヘルペス由来 dsDNA の侵入を細胞内受容体によって認識し, NF- κ B の活性化を介して, CXCL10 の発現誘導を行っていることが示唆された。またヘルペス由来 dsDNA の認識に対して口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞は RNA 受容体である RIG-I が関与していることが明らかになった。一方, IFI16 の抑制は線維芽細胞における dsDNA 誘導性の CXCL10 の発現を抑制した。IFI16 の dsDNA 認識機構については現在さらに詳細なメカニズムの検討を行っている。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Ohta K, Naruse T, Ishida Y, Shigeishi H, Nakagawa T, Fukui A, Nishi H, Sasaki K, Ogawa I, Takechi M. TNF- α -induced IL-6 and MMP-9 expressions in immortalized ameloblastoma cell line established by hTERT. *Oral Disease*. 21(1):106-12. 2016 (査読あり)
2. Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Nishi H, Naruse T, Takechi M, Kamata N. Itracozazole inhibits TNF- α -induced CXCL10 expression in oral fibroblasts. *Oral Disease*. 21(1):106-12. 2015 (査読あり)
3. Ohta K, Fukui A, Shigeishi H, Nishi H, Tobiume K, Takechi M, Kamata N. Expression and function of RIG-I in oral keratinocytes and fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*. 34(5):1556-65. 2014 (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

1. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 口腔粘膜細胞におけるヘルペス由来 DNA の認識に關与する細胞内受容体の局在と TNF- α による調節機構: 第 26 回日本口腔内科学会 / 第 29 回日本口腔診断学会合同学術大会 (岡山) 2016/09/23
2. 重石英生, 杉山 勝, 太田耕司, 西裕美, 武知正晃. 口腔と中咽頭における HPV16 感染と臨床病理学的指標との關係について: 第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会 (広島) 2016/08/10
3. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 口腔粘膜細胞におけるヘルペス由来 DNA の認識と TNF- α による調節: 第 52 回日本口腔組織培養学会学術大会 (徳島) 2015/11/21
4. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 口腔粘膜細胞におけるヘルペス由来 DNA の認識と炎症調節機構: 第 60 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (名古屋)

2015/10/16

5. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 口腔粘膜細胞におけるヘルペス由来 DNA の細胞内受容体を介した認識と NF- κ B: 第 25 回日本口腔内科学会学術大会 (大阪) 2015/09/19
6. Naruse T, Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Nishi H, Shigeishi H, Takechi M. Induction of CXCL10 by double-stranded DNA derived from herpes virus via intercellular receptor in oral mucosal cells: 第 48 回広島大学歯学会総会 (広島) 2015/06/27
7. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 口腔粘膜細胞における細胞内受容体を介したヘルペス由来 DNA の認識と CXCL10 の発現誘導: 日本組織培養学会第 88 回大会 (広島) 2015/05/26
8. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 口腔粘膜細胞における細胞内受容体を介したヘルペス由来 DNA の認識と CXCL10 の発現誘導: 第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会 (大阪) 2015/05/15
9. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 武知正晃. テロメラーゼ遺伝子導入による不死化エナメル上皮腫由来細胞の樹立とその性状: 第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 (奈良) 2015/01/30
10. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞におけるヘルペス由来 DNA による NF- κ B の活性化と炎症性ケモカインの発現誘導: 第 24 回日本口腔内科学会、第 27 回日本口腔診断学会合同学術大会 (福岡) 2014/09/18
11. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁

子, 西 裕美, 重石英生, 武知正晃 . 口腔粘膜細胞におけるヘルペス由来 DNA による NF- B の活性化と炎症性遺伝子の発現誘導: 日本組織培養学会第 87 回大会 (東京) 2014/05/29

12. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西 裕美, 重石英生, 武知正晃 . 口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞におけるヘルペス由来 DNA による炎症性ケモカインの発現誘導: 第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (東京) 2014/05/08

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 裕美 (Nishi Hiromi)
広島大学・病院・助教
研究者番号: 70403558

(2) 研究分担者

武知正晃 (Takechi Masaaki)
広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授
研究者番号: 00304535

太田耕司 (Ohta Kouji)
広島大学・病院・助教
研究者番号: 20335681