

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893145

研究課題名(和文) 歯肉上皮細胞におけるTLR間クロストークの解明

研究課題名(英文) Crosstalk of TLRs in gingival epithelial cells

研究代表者

森 健太 (Mori, Kenta)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：40733027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：凍結融解を繰り返して作成した壊死細胞上清はRNAを含む内因性の起炎因子であり、TLR3を介して歯肉上皮細胞(epi4)からIFN-betaを含む炎症性液性因子の産生を誘導した。さらに壊死細胞上清や強力なTLR3活性化を誘導するPoly(I:C)の刺激はepi4細胞におけるTLR2の発現を促進した。epi4におけるTLR2の発現亢進はTLR3刺激により産生されるIFN-betaにより誘導された。また壊死細胞上清は上皮のタイトジャンクション構成分子の発現を減弱させて上皮細胞のバリア機能を低下させた。これらの結果は内因性起炎因子が歯周病発症・遷延化・増悪に関与している可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：The necrotic cell supernatant (NCS), functioned as an endogenous danger signal when released from necrotic epithelial cells exposed to repeat freeze thawing, contained RNA and induced the production of inflammatory cytokines including IFN-beta from gingival epithelial cells (epi4) via TLR3. The activation of TLR3 with NCS or Poly(I:C), a strong TLR3 activator, enhanced TLR2 mRNA expression and proteins in epi4. Upregulation of TLR2 in epi4 was induced by TLR3-stimulated IFN-beta by an autocrine/paracrine mechanism. The NCS reduced the expression of epithelial tight junction molecules zona occludens 1 (ZO-1) and occludin and increased the permeability of epithelial tight junctions. These results suggest that endogenous danger signal is involved in the immunopathogenesis of periodontal diseases.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯肉上皮細胞 TLR3 TLR2

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、歯周病原性細菌を含むバイオフィルムが原因となり発症し、歯周組織の破壊に至る慢性炎症性疾患である。バイオフィルムが形成されると歯周病原性細菌の完全な除去が困難となり、ポケットに残存する歯周病原性細菌による感染が歯周組織において持続する。その結果として惹起される、継続的で時として過剰な免疫応答・炎症反応が歯周組織の破壊に関与すると考えられている。歯周組織は歯肉・セメント質・歯根膜・歯槽骨から構成されており、さらに歯肉は主として歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞により構成されている。一般に上皮細胞は外界との物理的バリアとして外来異物の侵入を防ぐ役割を果たしているのみならず、病原体関連分子パターンを認識することにより炎症性サイトカイン、ケモカインを分泌したり alarmin と総称される細胞損傷に関連した分子群を放出することで免疫応答の制御に関与していることが明らかとなっている。歯肉上皮細胞においても歯周病原性細菌の生菌や菌体構成成分による刺激を感知し、様々な炎症性サイトカインを産生することが報告されている。また、生体内において感染やストレス等による組織の壊死に伴い大量の細胞死が生じると、その細胞によりダメージ関連分子パターン (Damage-Associated Molecular Patterns: DAMPs) が放出され、これらが周囲の細胞内外の受容体に認識され炎症反応を惹起すると考えられている。 High Mobility Group Box 1 protein, Biglycan, Versican, mRNA, Small nuclear RNA などが DAMPs として知られており、壊死細胞よりこれらの分子が放出され、炎症を惹起する。そして DAMPs を認識するレセプターとして P2X Receptors, Receptor for advanced glycation end products, Toll like receptor(以下 TLR と略す)などが知ら

れている。我々は、これまでに歯肉上皮細胞が TLR3 を介して自己由来の壊死細胞から放出される内因性起炎因子 (壊死細胞上清、necrotic cell supernatant: NCS) を認識し、TLR2 の発現を上昇させることを予備研究で明らかとした。そこで TLR3 刺激後の歯肉上皮細胞における TLR2 の発現上昇メカニズムに関して検討を行った。

2. 研究の目的

TLR3 刺激後の歯肉上皮細胞における TLR2 の発現上昇メカニズムを解明すること及び TLR3 刺激後に産生されるサイトカインに着目し検討を行った。また、TLR3 刺激後の歯肉上皮細胞におけるタイトジャンクション分子の発現の変化を検討した。

3. 研究の方法

(1) 歯肉上皮細胞における TLR3 刺激後のサイトカイン産生

当研究室において樹立したヒト歯肉上皮細胞(epi 4)に TLR3 のアゴニストである Poly(I:C)や NCS を刺激し上皮細胞から産生される様々なサイトカインの変化について検討を行った。

(2) 歯肉上皮細胞における IFN-beta 刺激後の TLR2 発現の検討

epi 4 細胞を IFN-beta で刺激して TLR2 の発現の変化についてリアルタイム法、FACS にて検討を行った。

(3) TLR3 刺激後の歯肉上皮細胞におけるタイトジャンクション分子の発現変化

epi4 を繰り返し凍結融解して採取した NCS が TLR3 を介して細胞内にシグナルを伝える事は予備実験で明らかであったため、NCS を TLR3 刺激因子として用いた。NCS 刺激後における epi4 の ZO-1、occludin の発現をリアルタイム PCR 及びウエスタンブロッティングにて検討した。

4. 研究成果

(1)NCS、Poly(I:C)刺激 24 時間後の epi 4 において、IFN-beta、IL-6、IL-8、defensin および MCP-1 の産生量の増加を認めた。

(2) IFN-beta は予備実験において TLR3 刺激により顕著に発現誘導された。このため、TLR3 刺激による TLR2 発現誘導には IFN-beta が関与していると仮定した。そこで epi4 を IFN-beta で刺激したところ、IFN-beta 濃度依存的に TLR2 の発現が増強した (図 1)。

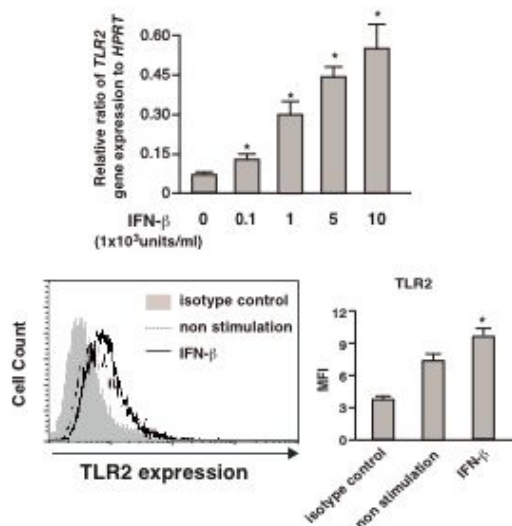


図 1 IFN-beta 刺激により歯肉上皮細胞において TLR2 発現が誘導される

この結果から TLR3 刺激による epi4 における TLR2 発現誘導には IFN-beta が関与している可能性が示唆された。

(3)NCS 刺激 24 時間後の epi 4 において細胞間の接着に重要な分子である ZO-1 及び Occludin の発現はコントロール群と比較して減弱した (図 2: ウェスタンブロッティングのデータは示さない)。この結果から TLR3 を介した刺激は上皮細胞のバリア機能を減弱させる可能性が示唆された。

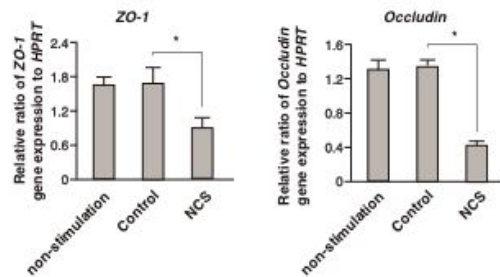


図 2 NCS 刺激は歯肉上皮細胞の ZO-1、Occludin の発現を減弱させる

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 2 件)

Kenta MORI, Manabu YANAGITA, Shiori HASEGAWA, Mikiko KUBOTA, Motozo YAMASHITA, Satoru YAMADA, Masahiro KITAMURA, Shinya MURAKAMI, Necrosis-induced TLR3 Activation Promotes TLR2 Expression in Gingival Cells, Journal of Dental Research, 査読有, Vol.94, No.8, 2015 pp.1149-57. DOI:10.1177/0022034515589289

柳田学、森健太、久保田実木子、長谷川詩織、三木康史、粟田敏仁、沢田啓吾、山下元三、野崎剛徳、山田聡、北村正博、島袋善夫、村上伸也、歯肉上皮細胞の TLR3 を介した IFN-beta 産生に及ぼすニコチンの影響、日本歯科保存学雑誌, vol.59, No.1, 2016 pp.93-102.

DOI: 10.11471/shikahozon.59.93

〔学会発表〕(計 1 件)

Kenta MORI, Manabu YANAGITA, Mikiko KUBOTA, Shiori HASEGAWA, Satoko YAMABA, Motozo YAMASHITA, Satoru YAMADA, Masahiro KITAMURA

and Shinya MURAKAMI, DAMPs via TLR3 expand inflammatory response with upregulation of TLR2 in human gingival epithelial cells. 100th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology, September 19-22, 2014, San Francisco, CA, USA

森健太、柳田学、久保田実木子、長谷川詩織、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也、歯肉上皮細胞における TLR3 を介した TLR2 発現上昇の機構, 第 143 回秋季日本保存学会学術大会、2015 年 11 月 12-13 日、文京シビックホール、東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森健太 (MORI, Kenta)

大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員
研究者番号：40733027