

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390483

研究課題名 (和文) 根尖性歯周疾患の病態機序

—自然および獲得免疫応答と樹状細胞の成熟化—

研究課題名 (英文) Pathogenic mechanisms in apical periodontitis: innate immunity, acquired immunity and dendritic cell maturation

研究代表者

興地 隆史 (OKIJI TAKASHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80204098

研究成果の概要 (和文)：根尖性歯周炎の病態機序への樹状細胞や免疫機能分子の関与について知るため、レーザーマイクロダイセクション法及びリアルタイム PCR 法でラット臼歯歯根膜における MHC クラス II 分子、CD86、CD83、TLR2、TLR4 の mRNA 発現を解析し、露髄・開放により発現が亢進することを確認した。さらに常在性マクロファージや樹状細胞の機能的意義を知るためラット臼歯器官培養系を確立し、LPS 刺激後にこれらが CD14、TLR4、CX3CR1 の mRNAs 発現を亢進させることを見いだした。

研究成果の概要 (英文)：This study aimed to advance the understanding of the involvement of dendritic cells and immunoregulatory molecules in the pathogenic mechanisms in apical periodontitis. Results demonstrated that unsealed pulp exposure caused the upregulation of MHC class II molecules, CD86, CD83, TLR2 and TLR4 mRNAs in the periodontal ligament of rat molars, as revealed by laser microdissection and real time PCR. Moreover, by employing a whole tooth culture system of the rat molar, it was demonstrated that resident macrophages and dendritic cells upregulated the expression of CD14, TLR4 and CX3CR1 following LPS stimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：歯科保存学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：樹状細胞、マクロファージ、根尖性歯周炎、獲得免疫、自然免疫、免疫機能分子、Toll-like receptors、レーザーマイクロダイセクション

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞はその成熟段階に応じて免疫表現型や機能の異なる多様な亜群を形成し、各亜群が異なる役割を演じつつ自然および獲得免疫応答成立過程を制御すると考えられている。

一方、申請者らはラット臼歯に誘発した根

尖性歯周炎病変部での MHC クラス II 分子陽性樹状細胞の存在を見いだしたのち、これらの免疫表現型や超微形態について免疫組織化学的に追究し、根尖病変誘発初期より樹状細胞が著明に出現し、病変部の拡大から慢性化までの全観察期間を通じて主要な免疫細胞

胞として存在すること、樹状細胞が CD11c, OX62 などの表面マーカー発現状況や超微形態から数種の亜群に分類されることを見いだした。各亜群の比率は病期により相違するが、この所見は病態進行過程を機能の異なる樹状細胞亜群が調節している可能性を示唆すると考えられる。

しかしながら、根尖性歯周炎の病態機序への樹状細胞の関与についての知見は依然として限られており、樹状細胞が自然免疫応答の活性化を介して根尖性歯周炎の病態に関与する可能性については報告が全くなされていない状況である。

2. 研究の目的

本研究は、免疫組織化学的手法を用いて根尖性歯周炎病変部の樹状細胞亜群を toll-like receptor (TLR) や免疫機能分子の発現状況等から識別し、各々の挙動を解析するとともに、TLR や免疫機能分子の mRNA 発現状況の解析を合わせて行い、根尖性歯周炎の病態進行過程に対する樹状細胞の関与の実態について、自然あるいは獲得免疫応答の両面から追究することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 根尖性歯周炎の誘発

ラット臼歯の歯冠歯髄を露髄させ開放のまま放置することにより実験的に根尖性歯周炎を誘発した。正常な歯髄や歯根膜もあわせて検索に供した。

(2) Whole tooth culture

ラットに培養液を灌流後、下顎第一臼歯を顎骨ごと摘出して whole tooth culture に供した。一部の実験では歯冠歯髄を断髄し、LPS 貼付および仮封を行った後培養した。

(3) 免疫組織化学

EDTA 脱灰凍結切片を作成後、樹状細胞、マクロファージ、各種免疫機能分子、TLRs に対するモノクローナル抗体を一時抗体として酵素抗体染色を施し光学顕微鏡で観察した。

(4) マイクロダイセクション法およびリアルタイム PCR による mRNA 発現解析

マイクロダイセクション法により組織切片より標的細胞もしくは組織を回収後、各種免疫機能分子や TLRs の mRNA 発現をリアルタイム PCR で定量解析した。一部の実験では、免疫染色された組織切片よりレーザーマイクロダイセクションを行った (immuno-laser capture microdissection)。

4. 研究成果

(1) ラット実験的根尖性歯周炎における樹状細胞の免疫組織化学的解析

露髄・開放によりラット臼歯に実験的に根尖性歯周炎を誘発後、病変部の樹状細胞、マクロファージあるいは免疫機能分子陽性細胞の経時的動態を免疫組織化学的に検索した。

その結果、正常な歯根膜や誘発された根尖病変部では OX6 (抗 MHC クラス II 分子)、ED1 (抗マクロファージ、樹状細胞)、CD11c が露髄開放 3 日後より経時的に密度を増加させる傾向を示した。また CD86 陽性細胞や T 細胞は、病変の活発な拡大期である露髄開放 28 日以降で増加を示した。CD86 陽性細胞は、病変内で MHC class II 分子発現細胞の約 10% の比率で存在した。

以上より、樹状細胞の活性化や T 細胞との相互作用が根尖性歯周炎の拡大に関与する可能性が示唆された。

(2) ラット臼歯正常歯根膜における各種免疫機能分子および TLRs mRNA の発現様式

ラット臼歯正常歯根膜を近心側、遠心側、根尖部および根分岐部にわけ、各々の部位における MHC クラス II 分子、CD83、CD86、TLR2 および TLR4 mRNA の発現レベルをリアルタイム PCR 法で解析した。

その結果、歯根膜のいずれの検索部位においても、MHC クラス II 分子、CD83、CD86、TLR2 および TLR4 mRNA が検出された。いずれの遺伝子とも根分岐部では他部位と比較して有意に高レベルに発現されており、CD83、CD86 および TLR4 ではこの傾向が顕著であった。一方、根尖部ではいずれの遺伝子発現量とも低値を示した。近心側、遠心側では MHC クラス II 分子のみ根尖部と比較して有意に高レベルの発現が検出された。

以上の結果から、ラット正常歯根膜の各部位には、細菌刺激の多寡などの微小環境の相違に応じて、成熟度、活性化度の異なる抗原提示細胞が存在することが示唆された。

(3) ラット臼歯実験的根尖性歯周炎における各種免疫機能分子および TLRs mRNA の発現の変動

ラット臼歯に露髄開放により起炎処置をほどこしたのち、1 日後の歯根膜各部位における MHC クラス II 分子、CD83、CD86、TLR2、TLR4 および UFN- γ mRNA の発現レベルをリアルタイム PCR 法で解析した。また、TLR4、TLR2 の歯根膜における発現を免疫組織化学的に検索した。

その結果、根分岐部の歯根膜では、MHC クラス II 分子、CD83、CD86、TLR4、および TLR2 は、露髄開放 1 日経過後ではコントロール

(正常歯根膜および露髄後仮封)と比較して有意に高レベルに発現されており(p<0.05),特にTLR2 mRNAでは顕著に高レベルの発現が認められた(p<0.001).しかしながら,IFN- γ には有意な増加は認められなかった.免疫組織化学的には,TLR2,TLR4発現細胞は根分岐部を中心に認められた.

一方,遠心根・近心側歯根膜では,いずれの遺伝子とも有意な増加が認められなかった.

以上より,ラット臼歯の根分岐部歯根膜に存在する抗原提示細胞が,歯髄の感染に起因する細菌刺激侵襲に応じて,速やかに成熟度や活性化度を増加させることが示唆された.

(4) Whole tooth cultureを用いた常在性マクロファージ、樹状細胞における免疫機能分子発現の解析

歯根膜や歯髄における常在性の樹状細胞やマクロファージに着目し,これらの自然免疫応答への関与の実態を解明することを目的として,whole tooth culture systemを用いて滲出性細胞の流入のない条件下で検索を行った.すなわち,ラット下顎第一臼歯を顎骨ごとwhole tooth cultureに供し,歯髄へのLPS貼付を行った後の樹状細胞やマクロファージにおける各種免疫機能分子やToll-like receptor (TLR)4のmRNA発現の変動を,Immuno-laser capture microdissectionおよびリアルタイムPCRで定量解析した.

その結果,ED1(抗マクロファージ,樹状細胞)陽性細胞,ED2(抗組織常在性マクロファージ)陽性細胞とも,LPS刺激により集積を示すとともにCD14,TLR4,あるいはchemokine receptorであるCX3CR1のmRNAs発現を亢進させた.

以上より,これらの分子が常在性の樹状細胞やマクロファージの遊走や活性化に関与する可能性が示唆された.

(5) 総括

本プロジェクトでは根尖性歯周炎およびその前駆疾患である歯髄炎を対象とし,樹状細胞の活性化に関連する各種分子のmRNAレベルでの発現解析を主たる手法として,これらの疾患の成立・進行過程に対する樹状細胞活性化の関与の実態を,さまざまな視点から明らかとすることができた.これらの結果は,immuno-laser capture microdissectionなどの先端的手法をも用いて初めて明らかとされたものであり,当該研究量息の最先端のものと位置づけられよう.

しかしながら,本研究では根尖性歯周炎成立過程に対する樹状細胞の多様な機能的意義の

一端が解明されたに過ぎないことも事実である.他種免疫機能分子,ケモカインなどの発現レベルの

タンパク、遺伝子レベルでの発現検索を積み重ねることにより,この領域の知見の更なる発展が期待できよう.

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 12 件)

① Kaneko T, Okiji T, Kaneko, R. Suda, H, Nör, JE: Gene expression analysis of immunostained endothelial cells isolated from formaldehyde-fixated paraffin embedded tumors using laser capture microdissection—a technical report. Microsc Res Tec 72: 908–912, 2009 (査読有).

② Chokechanachaisakul U, Kaneko T, Okiji T, Kaneko R, Kaneko M, Kawamura J, Sunakawa M, Suda H: Increased gene expression of toll-like receptors and antigen presenting cell-related molecules in the onset of experimentally induced furcation lesions of endodontic origin in rat molars; J Endod 36(2):251–255, 2010 (査読有).

③ Chokechanachaisakul U, Kaneko T, Okiji T, Kaneko R, Suda H, Nör JE: Laser Capture Microdissection in Dentistry, International Journal of Dentistry. vol. 2010, Article ID 592694, 8 pages, 2010 (査読有).

[学会発表] (計 20 件)

① 河村隼, 金子友厚, チョクチャナイサクンウライワン, 興地隆史, 砂川光宏, 須田英明: Analyses for dendritic cells in pulp infection-induced furcal inflammation. 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会, 仙台, 2009年5月27日.

② Shigetani Y, Ohkura N, Hosoya A, Yoshiba N, Yoshiba K, Ohshima H, Okiji T: Temporal Changes in mRNA expression of mineralized tissue matrix proteins in GaAlAs laser-irradiated rat molars, IFEA 8th Endodontic World Congress. Athens, Greece, October 6–9, 2010

③ Yoshiba K, Yoshiba N, Shigetani Y, Hosoya A, Okiji T: Tissue alteration of rat

dental pulp in whole tooth culture. 88th General Session & Exhibition of the IADR, Barcelona, Spain, July 15, 2010.

④ Chokechanachaisaku U, Yamanaka Y, Kaneko T, Katsube K-I, Kobayashi H, OKIJI T, SUDA H: A new method of culturing rat dental pulp tissue. 89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, USA, March, 17, 2011.

[図書] (計 2 件)

① Okiji T: Pulp as a connective tissue. Hargreaves K, Goodis H eds. Seltzer and Bender's dental pulp, 2nd ed., Quintessence, Chicago, in press.

② Kaneko T, Okiji T, Kaneko R, Suda H, Nör JE: Laser capture microdissection from formaldehyde-fixated and demineralized paraffin embedded tissues. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education volume 3. Formatex Research Center, 2111-2116, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

興地 隆史 (OKIJI TAKASHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：80204098

(2) 研究分担者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA KUNIHICO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：30220718

吉羽 永子 (YOSHIBA NAGAKO)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：10323974

大島 勇人 (OHSHIMA HAYATO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：70251824

重谷 佳見 (SHIGETANI YOSHIMI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：80397132

金子 友厚 (KANEKO TOMOATSU)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：70345297

