

機関番号：34408

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791833

研究課題名（和文）炎症発症機序解明における NK 細胞の結合組織浸潤機構についての解析
 研究課題名（英文）Analysis for the mechanisms of NK cell invasion into the connective tissue which is elucidate for mechanism of inflammation

研究代表者

井上 博（INOUE HIROSHI）

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10330143

研究成果の概要（和文）：生体内では血管内から炎症組織へと NK 細胞が浸潤していくことが想定される。しかし、その機序はほとんど解明されていない。本実験結果より、NK3.3 は CXCL12 刺激によって I 型コラーゲンへの浸潤と DQ コラーゲン I 型の分解が増強される事が確認された。また、この浸潤と分解には MMP-1 が強く関与している可能性と NK3.3 と pro-MMP-1 の結合には CXCL12 が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Natural killer (NK) cells play a key role in inflammation and tumor regression through their ability to migrate into tissues. CXCL12 is a chemokine that promotes lymphocyte invasion and migration into tissues. However, the mechanism for this process remains incompletely understood. In this study, we show that CXCL12 significantly enhanced NK cell invasion into type I collagen and increase the production of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1). Confocal immunofluorescence studies show that MMP-1 colocalized on NK cell surface that was stimulated by CXCL12.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：NK 細胞, MMP, ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

歯科の二大疾患の一つである歯周病は成人の 80%以上が罹患しているといわれている口腔感染症である。また歯周病は歯の喪失をきたすだけでなく、心疾患、糖尿病などの全身疾患のリスク因子であることが明らかにされつつある。厚生労働省が推進する「健康日本 21」の各論、「歯の健康」における基本方針には、8020(80歳において20歯以上の自分の歯を有する)の実現に向けた目標として歯の

喪失原因の約 9 割を占めているう触と歯周病の予防を推進することが重要であると記載されている。

歯周炎などの炎症歯周組織には、リンパ球をはじめとする免疫担当細胞の浸潤が認められることにより、局所的免疫反応が歯周疾患発症の要因であると考えられる。その免疫担当細胞の中でも NK 細胞は細胞内感染物質に対する初期防御に重要であると考えられている。

私が研究参加したグループではこれま

でNK細胞の活性化に焦点を絞り研究を行ってきたが、生体内では血管内から炎症組織へとNK細胞が浸潤していくことが想定される。しかし、NK細胞が組織に浸潤する際の機序はほとんど解明されていない。そこで、この機序を解明しこれまでの研究成果と組み合わせることにより歯周病予防につなげたいと考えている。歯周病の予防が出来れば厚生労働省の「健康日本21」が推進する8020の実現に向けて大きく前進し、国民の健康増進を図ることができると考えられる。

2. 研究の目的

CXCL12はBリンパ球やナイーブTリンパ球において炎症時に走化性を誘導する炎症性ケモカインである。NK細胞においてもCXCL12は走化性に深く関与しており、NK細胞の組織浸潤や活性化にも重要である。また、Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)は、コラーゲナーゼの一つでI型コラーゲンを切断することが知られている。

今回はCXCL12刺激によるNK細胞の(1)コートしたI型コラーゲンに対する分解能の検討、(2)I型コラーゲンに対する分解能の検討、(3)I型コラーゲングルに対する浸潤能の検討、(4)MMP-1発現の検討、(5)recombinant MMP-1との結合の検討などをおこなうことにより歯周病など炎症性口腔疾患の予防におけるNK細胞の役割を明らかにしていきたい。

3. 研究の方法

(1) 細胞表面レセプターの確認

① NK様細胞株(NK3.3)を $1 \times 10^5/300\mu\text{l/sample}$ になるように調整後、各種1次抗体(抗 $\alpha 2$ integrin、抗 $\beta 1$ integrin、抗CXCR4)を加え30分氷上で反応させる。

② 1次抗体と反応後細胞を洗浄し2次抗体としてAlexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)を用いて30分氷上で反応させる。

③ 2次抗体と反応後、細胞を洗浄し $1 \times 10^5/300\mu\text{l/sample}$ になるように調整した。Fluorescence activated cell sorting (FACS)を用いて蛍光標識したNK3.3細胞を解析した。

(2) CXCL12刺激によるI型コラーゲン分解能の検討

① $25\mu\text{g/ml}$ のDQコラーゲンTypeIをコートしたスライドガラス上に、 20 ng/ml のCXCL12刺激のみ、あるいはCXCL12刺激にMMPの各種阻害剤(GM6001: $20\mu\text{M}$ 、TIMP

2: 200ng/ml)を加えたNK3.3を播種し $5\%CO_2$ 、 37°C で4時間培養した。

② DQコラーゲンTypeIは分解されることにより蛍光物質を発するので、分解されたコラーゲンTypeIのみを共焦点レーザー顕微鏡にて観察する事が出来る。共焦点レーザー顕微鏡にて分解されたI型コラーゲンの蛍光像、微分干渉像、そして2つを重ね合わせた像の3種類を観察した。

(3) CXCL12刺激によるI型コラーゲングルに対する細胞浸潤能の検討

① ポアサイズ $3\mu\text{m}$ の24well Transwellを用いた。 $200\mu\text{g/ml}$ のI型コラーゲングルをupper chamberに加え、 200ng/ml のCXCL12をlower chamberに入れた。各種MMP阻害剤(GM6001: $20\mu\text{M}$ 、TIMP 2: 200ng/ml)を入れるサンプルにはupper chamberとlower chamberに阻害剤を加えた。

② NK細胞をupper chamberに播種し培養後ポリカーボネート膜をDiff Quickにて染色し、顕微鏡($\times 400$)でランダムに5視野を選び細胞数をカウントした。

(4) NK3.3細胞においてCXCL12刺激により発現するMMPsの同定

① NK3.3細胞にCXCL12を加えて $3 \times 10^6/1000\mu\text{l/sample}$ になるように調整した後、24well plateに播種して $5\%CO_2$ 、 37°C で24時間培養をおこなった。

② 培養終了後上清を回収しMicroconを用いて上清を5倍に濃縮する。

③ 濃縮した上清中のタンパクをタンパク分離泳動装置とパワーサプライを用いてSDS/PAGEで分離後ナイロン膜上に転写する。

④ 各種抗MMP抗体(anti-MMP-1, anti-MMP-8, anti-MMP-13, anti-MMP-14)にてタンパクの転写したナイロン膜を処理し、ECLシステムとVersaDocを用いて各種MMPバンドを検出した。

(5) CXCL12刺激によるNK3.3細胞とMMP-1との結合の検討

① NK3.3細胞を $5 \times 10^5/200\mu\text{l/sample}$ になるように調整する。 20ng/ml のCXCL12刺激と 1ng/ml recombinant pro-MMP-1を加えたもの、あるいはそれにGプロテイン阻害剤であるPertussis toxin (100ng/ml)を加えたサンプルをウォーターバスにて 37°C で10分間incubateした。

② Incubate後細胞を洗浄し1次抗体として抗MMP-1抗体と30分氷上で反応させた。

③ 1次抗体と反応後細胞を洗浄し、次に2次抗体としてAlexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H+L)を用いて30分氷

上で反応させた。

- ④ 2次抗体と反応後細胞を洗浄し、10%パラホルムアルデヒドにて固定した。
次にAqua Poly/Mountを用いスライドガラスに蛍光標識した細胞を埋入し、試料を作成した。
- ⑤ 共焦点レーザー顕微鏡にてNK3.3細胞と結合したMMP-1の蛍光像(Fluorescence)、微分干渉像(DIC)、そして2つを重ね合わせた像(Merge)の3種類を観察した。

4. 研究成果

(1) 細胞表面受容体の確認

NK3.3細胞にはコラーゲンの細胞膜受容体の一つである $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンとCXCL12の受容体であるCXCR4が存在することを確認した。

(2) CXCL12刺激によるI型コラーゲン分解能の検討

NK3.3細胞は、CXCL12存在下でDQコラーゲンI型の分解を増強する事が確認された。また、DQコラーゲンI型に対する分解能の増強はMMP阻害剤であるGM6001とTIMP2によって著明に抑制される事が確認された。

(3) CXCL12刺激によるI型コラーゲンゲルに対する細胞浸潤能の検討

CXCL12存在下で、NK3.3細胞はI型コラーゲンゲルへの浸潤を増強する事が確認された。また、浸潤の増強はMMPの阻害剤であるGM6001とTIMP2によって著明に抑制される事が確認された。

(4) NK様細胞株(NK3.3細胞)においてCXCL12刺激により発現するMMPsの同定

NK3.3細胞のCXCL12刺激による各種MMPの産生において、MMP-8, -13, -14では無刺激時と比べて差は認められなかった。しかし、MMP-1の産生においてはCXCL12刺激による著明な増強が確認された。

(5) CXCL12刺激によるNK3.3細胞とMMP-1との結合の検討

CXCL12刺激によりpro-MMP-1がNK3.3の細胞表面に結合することを確認した。また、この結合はGタンパク阻害剤のPTXによりCXCL12が受容体に結合するのを阻害すると著明に抑制された。

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2件)

① INOUE H, GODA S, DOMAE N, NOSAKA K, NAKAI M, UCHIHASHI K, NISHIKAWA Y. Matrix metalloproteinase 1 produced by CXCL12 stimulation on NK92 cells. J Osaka Dent Univ 2009; 43: 163-167. 査読有り

② GODA S, KANESHITA Y, INOUE H, IKEO T, IIDA J, DOMAE N. Enamel matrix derivative protein stimulated wound healing via phosphoinositide 3-Kinase. J Periodontol 2009; 80: 1631-1637. 査読有り

[学会発表] (計7件)

① 角倉紗恵子, 井上 博, 西川泰央, 松本尚之. 破骨細胞前駆細胞におけるIL-17の影響. 第69回日本矯正歯科学会大会, 2010年9月27日, 横浜市

② 井上 博, 藤本哲也, 成瀬真弓, 平野俊一朗, 内橋賢二, 西川泰央. NK細胞におけるIL-17の影響. 第52回歯科基礎医学会, 2010年9月22日, 東京都

③ 内橋賢二, 成瀬真弓, 藤本哲也, 平野俊一朗, 井上 博, 西川泰央. ボツリヌストキシンAの導管注入によるラット唾液腺のnNOSの免疫反応に対する影響. 第52回歯科基礎医学会, 2010年9月22日, 東京都

④ MengShu, ZhaoLei, WuYa-fei, 方一如, 藤本哲也, 成瀬真弓, 平野俊一朗, 井上 博, 内橋賢二, 西川泰央. C-reactive protein can increase chemotaxis of monocytes through promoting CD192 expression. 第52回歯科基礎医学会, 2010年9月22日, 東京都

⑤ 中島紗恵子, 井上 博, 西川泰央, 松本尚之. CXCL12刺激によるNK細胞のI型コラーゲンに対する浸潤と分解について. 第68回日本矯正歯科学会大会, 2009年11月18日, 福岡市

⑥ 井上 博, 合田征司, 池尾 隆, 堂前尚親, 西川泰央. CXCL8刺激NK細胞におけるI型コラーゲンに対する浸潤と遊走について. 第51回歯科基礎医学会, 2009年9月10日, 新潟市

⑦ INOUE H, DOMAE N, NISHIKAWA Y. Expression of matrix metalloproteinase-1 on NK cells stimulated by CXCL8 and CXCL12. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009年7月

31日，京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 博 (INOUE HIROSHI)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：10330143