

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670817

研究課題名(和文) 口腔粘膜上皮の免疫特権性を利用した口腔扁平苔癬インビトロモデルと治療法の開発

研究課題名(英文) Development of an in vitro model of oral lichen planus by utilizing a characteristic of immune-privilege

研究代表者

泉 健次 (IZUMI, KENJI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80242436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：FasLは、平面培養されている口腔粘膜上皮細胞における発現が、タンパク・遺伝子の両レベルにおいて認められなかった。これは、FasL発現誘導効果があると報告されている薬剤を投与しても同様であった。従って、口腔粘膜の免疫特権をビトロモデルに反映させることは困難であることが示唆された。一方、ヒトT細胞集団では10%前後のFasL陽性細胞集団を認めたことから、口腔扁平苔癬の病態をインビトロで解析することは可能かもしれない。

研究成果の概要(英文)：We detected oral mucosa keratinocytes cultured in a tissue culture dish do not express FasL by immunocytochemistry, FACS and RT-PCR analyses. The pharmacological induction of FasL expression was not successful, either. This resulted in the difficulty in developing an in vitro model of oral lichen planus by utilizing a characteristic of immune-privilege. However, we found that approximately 10% of human T cells expressed FasL. This suggested it may be possible to analyze the T cell-oral keratinocyte pathophysiological interaction in vitro.

研究分野：再生歯学

キーワード：口腔扁平苔癬 口腔粘膜上皮細胞 CD8陽性T細胞 インビトロモデル 共培養 免疫特権

1. 研究開始当初の背景

難治性の慢性炎症性疾患である口腔扁平苔癬は、アレルギー性、薬物性、中毒性、ウイルス感染、ストレス、代謝障害や細胞性免疫異常などが原因とされているが、詳細は不明である。明らかなことは、CD8+の細胞傷害性 T 細胞による粘膜上皮基底細胞の破壊から発症することである。

“免疫特権”は、臓器/組織内の免疫応答や炎症反応を積極的に抑制する性質で、局所で免疫系の攻撃から免れる機構である。免疫特権性の維持で重要な働きを持つのは Fas Ligand (FasL) という膜結合型タンパクで、免疫特権部位 (眼、脳、生殖器等) に恒常的に発現し、T 細胞表面の Fas 抗原に結合することで T 細胞にアポトーシスを誘導し、宿主免疫系細胞から自身を守っている。口腔粘膜が免疫特権部位であるとする報告は過去にないが、申請者は正常ヒト口腔粘膜上皮で初めて、膜結合型 FasL の発現があることを発見し、大部分の上皮に免疫特権性があることを示唆した一方で、口腔扁平苔癬発症の起点である基底細胞層に FasL は発現していなかった。最近、椎間板や毛包も免疫特権性を持つことが証明された上、椎間板ヘルニアや脱毛の病因として免疫特権性の破綻や喪失が関連していることが注目されている。

本研究では“**口腔扁平苔癬発症メカニズムに口腔粘膜上皮基底細胞層における免疫特権性欠如が関与する**”、との仮説を立て、免疫反応時、最初に T 細胞の攻撃を受ける部位である基底層細胞に免疫特権を担う FasL を発現させることができれば、口腔扁平苔癬の治療につながるのではないかと考え本研究を立案した。この仮説を実証するには、T 細胞と上皮角化細胞の共培養が必要であるが、2 次元の単層培養では実証不可能で、T 細胞と基底細胞が直に接する 3 次元培養口腔粘膜上皮との共培養による in vitro モデルの確立が不可欠である。

2. 研究の目的

口腔扁平苔癬の病態は浸潤 T 細胞による口腔粘膜上皮基底層細胞の破壊であることから、口腔扁平苔癬の発症は口腔粘膜の免疫特権性の欠如と相関し、薬理的に口腔粘膜上皮基底層に FasL を発現させることが新規治療法につながるとの仮説を立て、この実証を本研究の目的とした。現有の培養上皮作成基盤技術を元に、これまで開発されていない T 細胞と基底細胞が直に接する培養口腔粘膜との 3 次元共培養による in vitro 口腔扁平苔癬モデルが不可欠なので、それを併せて構築する。

3. 研究の方法

ベースとなる研究方法の概略は、口腔粘膜上皮角化細胞が免疫特権性を発揮する機能検証を行った後、ヒト培養粘膜作成プロトコルに沿って 3 次元培養口腔粘膜を作成

し、(1)上皮基底細胞が CD8+T 細胞と層特異的に接触する共培養システムを構築し、口腔扁平苔癬の病態を in vitro モデルに反映させた上、(2)上皮細胞に免疫特権性を薬理的に賦与することが、新規の口腔扁平苔癬の治療法につながるかを検証する。

年度ごとの予定としては、平成 26 年度は 2 次元単層培養の口腔粘膜上皮角化細胞の FasL タンパク発現陽性率と、発現している FasL の機能分析を CD8+T 細胞がアポトーシスに陥るかどうかについて Annexin V や Caspase3/8 の発現で検証した後、本学の臨床応用プロトコルに準じて培養口腔粘膜上皮を作成し、T 細胞をスキャフォールド内の基底細胞直下へ物理的に組みこむことで、目標(1)である T 細胞と基底細胞が直に接する培養口腔粘膜上皮との共培養による in vitro 口腔扁平苔癬モデルを構築する。モデルの確立を組織学的に評価する。平成 27 年度は、ロバスタチン (高脂血症治療薬)、クロロキン (全身性エリテマトーデス治療薬) を培地に添加することで培養口腔粘膜上皮角化細胞の FasL 発現が亢進するかを検証した上で、目標(2)に設定した FasL タンパク発現レベルの亢進が口腔扁平苔癬の新規治療法になり得るかを検討する。

4. 研究成果

検証を予定していた (1) FACS を用いた培養口腔粘膜上皮角化細胞の FasL (CD178) 発現陽性率と発現強度分析、(2) 培養口腔粘膜上皮角化細胞に発現している FasL の機能分析を行った後、目標の 1 として設定した、T 細胞 (CD8 陽性) と培養口腔粘膜上皮との共培養によるインビトロ口腔扁平苔癬モデルであったが、結果的には、(1) の実験に終始してしまい (2) の実験への移行ができなかった。

具体的に行ったことは、(1) について、クローンの異なる 2 種類の抗体、および実験の適用として FACS 抗体と ICC 抗体との合計 4 種類の抗体を購入した。かつ、FasL は細胞膜上と細胞質内での発現の 2 つの局在があるために、細胞固定後に浸透させる方法をいくつか試みたり、トリプシンを用いなかったり、培地のカルシウム濃度をあげて、インビボ環境に類似の環境を作ったり、さらには、MMP によって細胞膜上の FasL が遊離して可溶性の FasL となるのを防ぐために、パチマスタットという MMP 阻害剤を用いて発現確認を行

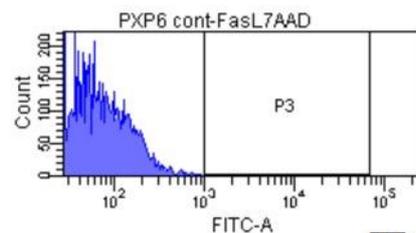


図 1

ったが、いずれもネガであった。つまり、FasLの発現は通常の範疇の培養口腔粘膜上皮細胞には確認することができなかった(図1)。

逆に Fas (CD95) は、ほぼ 100%の細胞に発現していることを確認し(図2) また IFN 東洋(擬似炎症反応)によって MHC クラス I の発現増強と陽性細胞増加を確認することはできた。

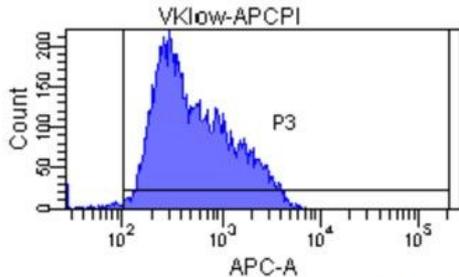
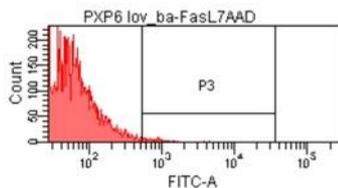


図2

しかしながら、様々なプロトコルや解析方法で試しても、培養口腔粘膜上皮細胞の細胞膜に FasL の発現を確認することができなかった。これは、実験計画に予定はなかったが、PCR 法によって、遺伝子 (mRNA) レベルの発現の有無まで確認したが、やはりネガであった。このことは、予備実験においては、口腔粘膜組織の免疫組織化学で発現を認めただけでも、in vivo と in vitro の口腔粘膜上皮は、FasL については全く異なる表現型を示し、口腔粘膜の免疫特権性を示すことができないというネガティブデータが得られた。結論としては、口腔粘膜は免疫特権性部位であるという仮説を in vitro では証明するに至らなかったという結果となった。ここから示唆されるのは、培養細胞を用いた疾患(病態)のインビトロモデルは、関連する細胞を用いても必ずしも成立するものではないことがわかった、従って、本実験では、これ以上に口腔粘膜上皮を用いた3次元培養を行って発現を確認する作業は実施しなかった。

さらに、薬剤による口腔扁平苔癬に対する新規治療法の探索も2次元培養細胞を用いて行ったが、FasL 発現を誘導するという報告のあった複数の薬剤を、濃度と時間を変えて投与してからの FasL 発現を調べたが、いずれもネガティブであった(図3)。

0.1μM ロバスタチン72時間暴露



30μM クロロキン72時間暴露

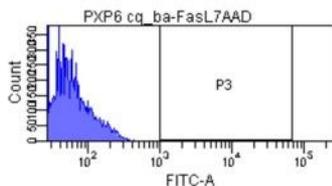


図3

本実験では、3次元培養や、共培養を駆使したビトロモデルの作成に至らなかったが、研究代表者自身の末梢血液を採取して、リンパ球集団を分画し(T細胞とB細胞に分離は未実施) FasL の発現を FACS で解析したところ、8%の細胞が FasL を発現していた(図4)。よって、可能性は低いが3次元培養口腔粘膜組織と、T細胞の共培養は行ってみる価値はありそうである。すなわち、仮説として立てた口腔粘膜の免疫特権性はインビトロでのモデル確立は不能であったが、口腔扁平苔癬の病態についてであれば、このビトロモデルで解析できる可能性があることは示唆された。

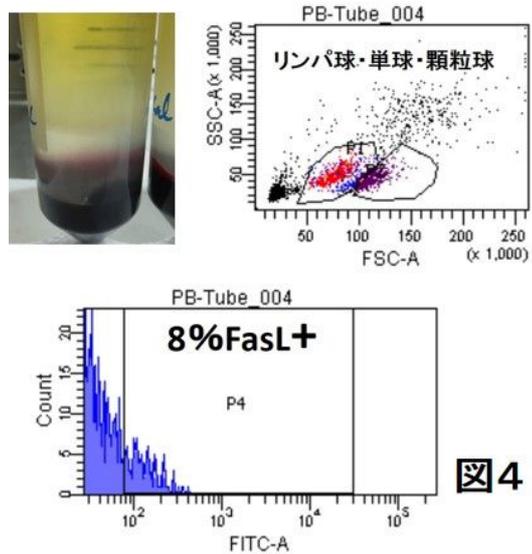


図4

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 0件)

[学会発表](計 1件)

泉 健次,加藤寛子,原 夕子,齋藤直朗,塩見 晶,金谷 貢,大川成剛:口腔扁平苔癬インビトロモデル開発の試み.平成 27 年度(社)日本歯科理工学会中部地方会夏季セミナー,富士屋(新潟県、新潟市),2015 年 8月 21日.

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 健次 (IZUMI KENJI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：80242436

(2) 研究分担者

伊藤 明子 (ITO AKIKO)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：80361898

秋葉 陽介 (AKIBA YOSUKE)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：70547512