

令和元年6月6日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11545

研究課題名(和文) 歯髄における樹状細胞サブセットの解析から展開する歯髄炎発症のメカニズムの探求

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of onset of pulpitis developed from analysis of dendritic cell subsets in dental pulp

研究代表者

荒牧 音 (ARAMAKI, OTO)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：60634615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト歯髄におけるリンパ球、マクロファージ、樹状細胞の分布や比率を明らかにすると同時に、ラットう蝕モデルを作成し歯髄樹状細胞のサブセット、機能評価する及びう蝕における獲得免疫系の関与を明らかにすることを目的とした。これまでマウス歯髄の最前線に分岐状の細胞が多く存在し、樹状細胞であるとの報告があったが、我々はこれら最前線の分岐状の細胞が、マクロファージのマーカーとして用いられているIba1陽性であることから、マクロファージである可能性が高いことを示し、歯髄の免疫応答にこのマクロファージが重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究成果から、象牙芽細胞層最前線に存在するIba1陽性細胞はマクロファージと考えられ、う蝕などの歯髄における免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられた。う蝕における獲得免疫系の関与を研究した報告はなく、今後歯髄の免疫機構の解明が進めば、う蝕治療において生体防御機構を利用した新しい治療法の確立が可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we will clarify the distribution and ratio of lymphocytes, macrophages and dendritic cells in human dental pulp, create rat caries model and evaluate dental pulp dendritic cell subsets, function evaluation and acquired immune system in caries. The purpose was to clarify the involvement. Until now, there have been reports of many branched cells at the forefront of mouse dental pulp and that they are dendritic cells, but we have used these forefront of branched cells as markers for macrophages. The positive Iba1 indicates that it is likely to be a macrophage, suggesting that this macrophage plays an important role in the dental pulp immune response.

研究分野：う蝕

キーワード：免疫応答 歯髄 樹状細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

免疫応答は自然免疫と獲得免疫からなるが、う蝕により歯髄が感染した場合には自然免疫応答が有意に誘導されると考えられ、これまでマクロファージについての研究が多く報告されている(Okiji T. *Arch Oral Biol.* 1996, Iwasaki Y. *Cell Tissue Res.* 2011)。一方で、リンパ球や樹状細胞についての報告は少なく、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする樹状細胞については、近年少なくとも 2 種類の樹状細胞様の細胞がマウス歯髄に存在することが報告されている (Zang, J 2006. *Int Immunol.*) が、歯髄における樹状細胞の詳細は不明であり、う蝕における獲得免疫系の関与を研究した報告はない。

マクロファージは、感染局所で活性化され自然免疫応答や組織の修復に従事する一方で、樹状細胞は 2 次リンパ組織である所属リンパ節に移動し、ナイーブ T 細胞をエフェクター T 細胞に分化・誘導させる。そして、リンパ節で活性化した T 細胞は感染局所に動員される。どのような T 細胞が動員されるかには、抗原提示を行った樹状細胞の種類が大きく関与している。そのため、樹状細胞は、免疫応答の質を決定する大きな役割を担っている。

う蝕は最も一般的な慢性感染症であり、う蝕の成り立ちのメカニズムについては多くの研究がなされて解明されてきている。しかし、う蝕が進行し、歯髄に感染が波及していくメカニズムについては未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト歯髄におけるリンパ球、マクロファージ、樹状細胞の分布や比率を明らかにすると同時に、ラットう蝕モデルを作成し歯髄樹状細胞のサブセット、機能評価する及びう蝕における獲得免疫系の関与を明らかにすることを目的とする。歯髄における樹状細胞の詳細なサブセットは不明であり、う蝕における獲得免疫系の関与を研究した報告はなく、本研究により、歯髄の免疫機構の解明が進めば、う蝕治療において生体防御機構を利用した新しい治療法の確立が可能となると考え、研究を立案、遂行した。

3. 研究の方法

ヒト抜去歯歯髄を用い、whole mount 免疫組織染色およびフローサイトメトリーを行い、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞の分布および比率の解析を行った。また、ラット臼歯う蝕モデルを作成し、臼歯歯髄における樹状細胞のサブセット解析、及び所属リンパ節において歯髄から遊走してきた樹状細胞の機能解析を行った。具体的にはラット口腔内に *S mutans* を投与しう蝕歯原性食を用いてう蝕歯髄炎モデルを作成し、歯髄における樹状細胞サブセットの局在を免疫組織染色により評価した。またフローサイトメトリーにて所属リンパ節で増加した樹状細胞サブセットの解析を行うと同時に同定した樹状細胞から mRNA を採取し、各種サイトカインの発現を real time PCR 法にて解析することで、樹状細胞の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト抜去歯歯髄を用いた whole mount 免疫組織染色

ヒト抜去歯歯髄を用いた whole mount 免疫組織染色に成功し、歯髄全体に近年マクロファージのマーカーとして使用されている

Iba1(ionized calcium binding adaptor molecule1)

陽性細胞が存在することが観察された(図 1)。

これまでマウス歯髄の最前線に分岐状の細胞が多く存在し、樹状細胞であるとの報告があったが、我々はこれら最前線の分岐状の細胞が、マクロファージのマーカーとして用いられている Iba1 陽性であることから、マクロファージである可能性が高い。

これは、皮膚において病原体進入の最前線に存在するランゲルハンス細胞が、現在マクロファージと考えられていることに一致すると考えられた。

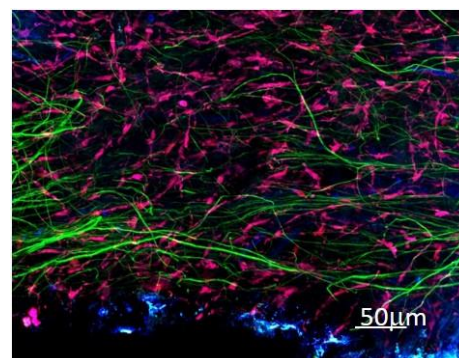


図 1 ヒト歯髄における neurophilament 及び Iba1 免疫染色像
Neurophilament 陽性の神経と細長い突起を持ち、分岐型の形態を示す Iba1 陽性が歯髄全体に存在している

Iba1 が樹状細胞、マクロファージといった抗原提示細胞に染まるかどうかを確認するため、抗

原提示細胞のマーカーである HLA-DR との二重染色を行ったところ、HLA-DR、Iba1 とともに歯髄全体に染まり、HLA-DR 陽性の細胞が多かった。Merge すると Iba1 陽性細胞はすべて HLA-DR 陽性であり、また、HLA-DR のみ陽性の細胞も存在した (図 2)。

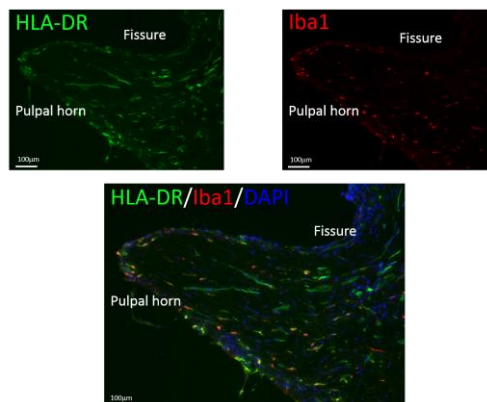


図 2 ヒト歯髄における Iba1、HLA-DR 染色

FactorXIIIa と Iba1 の二重染色の結果では、FactorXIIIa, Iba1 とともに歯髄全体に染まっており、割合としては、FactorXIIIa の陽性細胞が多く、Merge すると Iba1 陽性細胞はすべて FactorXIIIa 陽性であり、また、FactorXIIIa のみの陽性の細胞も認められた。一方で Iba1 単独の陽性細胞は認められなかった (図 3)。

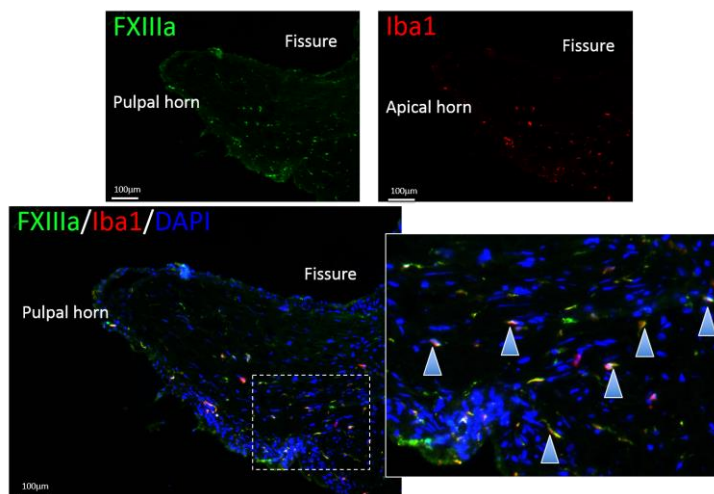


図 3 ヒト歯髄における Iba1、FactorXIIIa 染色

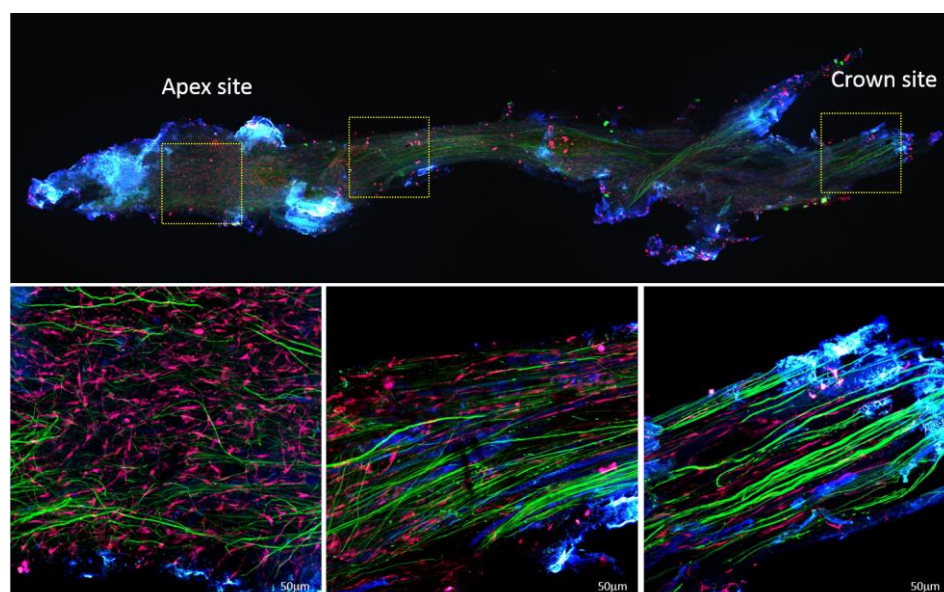


図 4 ヒト歯髄における Iba1、neurofilament whole mount 染色

neurofilament と Iba1 で歯髄全体の whole mount での染色を行った結果では、根部歯髄においては neurofilament 陽性の神経線維の多くは歯髄に平行に走行していたが、冠部歯髄においては複雑に分岐している像が観察された一方、Iba1 は、歯髄全体に陽性細胞が認められた (図 4)。

(2) ヒト歯髄における Iba1 陽性細胞の 3 次元的解析像

細胞の形態をより詳細に解析するために、象牙芽細胞層最前線に存在する Iba1 陽性細胞のみを抽出し、3 次元的に解析を行うことにも成功した (図 5)。

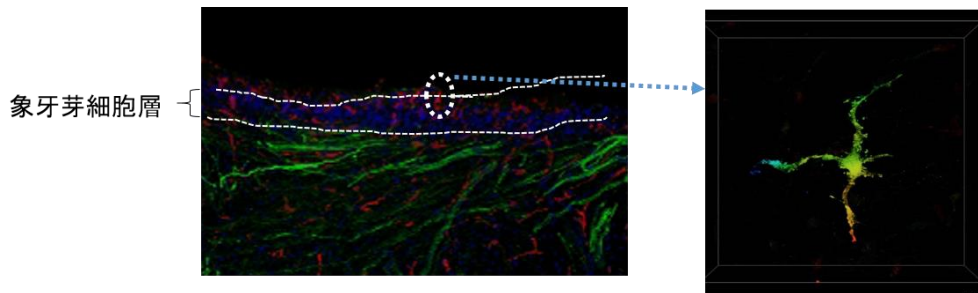


図5 ヒト歯髄における Iba1 陽性細胞の3次元解析像

(3) ヒト抜去歯歯髄のフローサイトメトリー法を用いた樹状細胞のサブセットの解析
 ヒト歯髄から細胞の単離およびフローサイトメトリー解析が可能な段階まで進んでいる(図6)。各種抗体 (CD3, CD4, CD8, CD19, CD11c, HLA-DR, CD14 など) を用いて、リンパ球、樹状細胞、マクロファージの存在比率を解析する。また、樹状細胞サブセットの解析を行った。

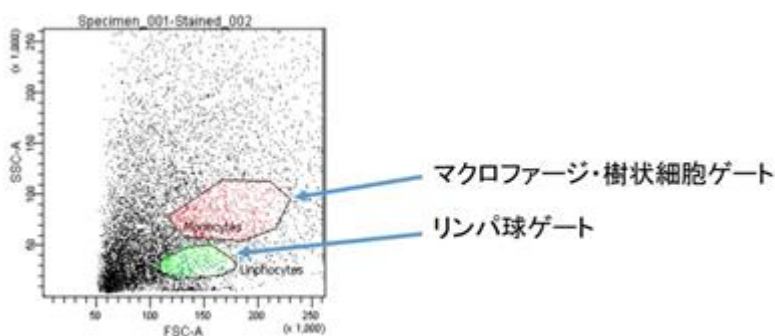


図6 ヒト抜去歯歯髄におけるフローサイトメトリー解析

(4) ラット正常歯髄とう蝕歯髄モデルにおける樹状細胞のサブセットの局在及び所属リンパ節における機能解析

①ラットう蝕モデルの作成

Whistar 系ラットを腹腔麻酔下、S.mutans 菌の口腔内接種を7日間連続で行い、う蝕原生食を投与し、ラットう蝕モデルを作成するした(Hamada S. *Microb Immunol.* 1978, Shimada Y. *Dent Mate.* 2004)。

② 正常歯髄及びう蝕モデルにおける免疫組織学的検討

う蝕モデル作成後、経時的に(1,5,7,10,14日後)に臼歯を含めた下顎骨を採取し、新鮮顎骨凍結組織切片を作成する。樹状細胞サブセット及び局在を検討するため、F4/80, MHC classII, CD11b, CD11c, CD103等の免疫染色を行い、正常歯髄との比較検討を行った。

③う蝕モデルにおけるフローサイトメトリー法を用いた樹状細胞のサブセットの解析

う蝕モデル作成後、経時的に(1,5,7,10,14日後)に所属リンパ節(顎下リンパ節)を採取し、歯髄細胞浮遊液を得る。各種抗体(F4/80, MHC classII, CD11b, CD11c, CD103)を用いて、樹状細胞のサブセットを解析する。正常時と比較してう蝕モデルにおいて所属リンパ節で増加した樹状細胞のサブセットをフローサイトメトリーを用いてセルソーティングし、mRNAを採取する。リアルタイムPCR法にて各種サイトカイン(*Il-1, Il-6, Il-10, Il-12, Il-17, tnf-a, tgf-b*)の発現を比較検討した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①Aramaki O, Kawashima M, Shimada Y, Okiji T, Tagami J. Three dimensional analysis of Iba1+ macrophages in human dental pulp using whole mount immunostaining. IADR GENERAL SESSION,

Seoul, Korea.2016.

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 川島 伸之

ローマ字氏名: (KAWASHIMA, Nobuyuki)

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 大学院医歯学総合研究科

職名: 講師

研究者番号 (8桁): 60272605

研究分担者氏名: 島田 康史

ローマ字氏名: (SHIMADA, Yasushi)

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 大学院医歯学総合研究科

職名: 非常勤講師

研究者番号 (8桁): 60282761

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。