

平成 21 年 4 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006 年～2009 年

課題番号：18390483

研究課題名 (和文) 口腔組織の毛細リンパ管における機能分子発現機構の解明

研究課題名 (英文) The Clarification of the expression mechanism of functional molecules on human lymphatic endothelium in oral cavity

研究代表者 吉田 重光 (YOSHIDA SHIGEMITSU)

北海道大学・名誉教授

研究者番号：80174928

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：リンパ管内皮細胞、白血球接着因子、ケモカイン、口腔組織

1. 研究計画の概要

本研究課題の目的は、口腔組織の毛細リンパ管における機能分子発現機構が、口腔組織以外の組織における毛細リンパ管と如何なる点で異なっているのかを明らかにすることにある。具体的には、

(1) 健常および炎症ヒトリンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cell: LEC) における種々の Toll-like receptor (TLR)、白血球接着因子、およびケモカイン発現の相違を明らかにする。

(2) lymphotoxin (LT) 依存性 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 経路による種々の白血球接着因子およびケモカイン発現誘導機構の相違を明らかにする。

(3) TLR 依存性 NF- κ B 経路およびその他の経路を介した、種々の白血球接着因子およびケモカイン発現誘導機構の相違を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) In vivo の検索

北海道大学病院より提供を受けたヒト口腔健常・炎症・悪性腫瘍組織 (舌、歯肉、歯髄、口蓋扁桃)、ならびに口腔以外のヒト健常組織 (口腔粘膜再建時に用いる大腿皮膚) を用いた組織学的・超微細構造学的解析から以下の成果を得た。

① 健常組織リンパ管では cys-cys

chemokine ligand 21 (CCL21) の発現が認められ、炎症組織では認められなかった。

② 健常および悪性腫瘍舌組織では、ほぼすべてのリンパ管で TLR2 および TLR4 の発現が認められた。

③ 健常歯肉組織では、結合組織乳頭部毛細リンパ管で TLR2 および TLR4 の発現が認められず、粘膜固有層集合リンパ管で TLR2 および TLR4 の発現が認められた。また、すべてのリンパ管で LT β 受容体 (LT β R) の発現が認められた。

④ 炎症舌および歯肉組織、ならびに健常歯髄組織では、ほぼすべてのリンパ管で TLR2 および TLR4 の発現は認められなかった。

⑤ 健常大腿皮膚組織では、ほぼすべてのリンパ管で TLR2 および TLR4 の発現が認められた。

⑥ 上記に関する成果については電子顕微鏡を用いた超微細構造学的解析を継続中である。

(2) In vitro の検索

① 市販ヒト正常 LEC から細胞株を樹立してヒト歯根膜線維芽細胞およびヒト真皮血管内皮細胞と混合培養した後、免疫磁気ビーズを用いることで、LEC の選択的分離が可能であった。

②市販 LEC において LT β R の発現が恒常的に認められ、LEC に LT α 1 β 2 を作用させると、NF- κ B を介した CCL21 産生の増大が認められた。

③TLR2 または TLR4 リガンドが、市販ヒト皮膚 LEC に種々の白血球接着因子産生を誘導した。

④一部の口腔組織リンパ管に TLR の発現が認められたが、舌および歯肉組織の絶対数が少ないため舌または歯肉組織由来 LEC の分離・培養に関する検索は継続中である。

3. 現在までの達成度

本研究課題における当初研究目的の達成度についての自己点検評価：

②おおむね順調に進展している。

<In vivo の検索>

口腔組織以外の資料提供の絶対数が不足しているが、口腔組織においては達成度が高いため、総合的にみるとおおむね順調に進展していると考えられる。

③やや遅れている。

<In vitro の検索>

市販 LEC に関しては検索が自由に行える一方で、口腔組織由来 LEC の分離・培養が困難である。当初の研究目的のひとつに口腔組織由来 LEC 株の樹立が挙げられていることから、総合的にみるとやや遅れていると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

研究全体からみると、In vitro の検索がやや遅れた進捗状況であるため、今後の推進方策としては、細胞を用いた検索を重点的に行い、これと並行して組織検索を行う必要があると考えられる。具体的には、

(1) In vivo の検索

①電子顕微鏡を用いた超微細構造学的検索を重点化する（特に口腔組織リンパ管における TLR の発現に関して）。

②口腔組織リンパ管における白血球接着因子の発現を免疫組織化学的に検索する。

③口腔組織以外の組織検索を行う。

(2) In vitro の検索

①口腔組織由来 LEC 株の樹立

細胞数が非常に限られているため、今後も困難が予想される。しかしながら口腔組織 LEC を分離・培養することは今後の研究においても非常に有用性が高いと考えられることから継続して分離・培養実験を行う。同様の実験をマウス口腔組織にて行えば、細胞数の制限は回避が可能であると考えられる。

②市販正常ヒト LEC における TLR 依存性の白血球接着因子および CCL21 産生誘導機構の検索を行う。

5. 代表的な研究成果

(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 3 件)

①Taishi Y, Kuroshima S, Domon T, Yoshida S, Kitagawa Y. Expression of CCL21, TLR2, and TLR4 on human lingual lymphatic endothelium. *Hokkaido J. Dent. Sci.* 29(2): 197-208, 2008. 査読 (有)

②Ushijima N, Inoue K, Domon T, Yoshida S. Distribution and organization of lymphatic vessels in the mouse gingiva: An immunohistochemical study with LYVE-1. *Arch. Oral Biol.* 53(7): 652-658, 2008. 査読 (有)

③Sawa Y, Tsuruga E, Iwasawa K, Ishikawa H, Yoshida S. Leukocyte adhesion molecule and chemokine production through lipoteichoic acid recognition by toll-like receptor 2 in cultured human lymphatic endothelium. *Cell Tissue Res.* 333(2): 237-252, 2008. 査読 (有)

[学会発表] (計 2 件)

①太子芳仁、黒嶋伸一郎、土門卓文、吉田重光、北川善政：ヒト舌リンパ管における Toll-like receptor 2 および 4 の発現。歯科基礎医学会。2008 年 9 月 25 日発表 (TOC 有明)

②黒嶋伸一郎、太子芳仁、吉田重光、井上農夫男：ヒト歯肉リンパ管における Toll-like receptor 2 および 4 の発現。歯科基礎医学会。2008 年 9 月 23 日発表 (TOC 有明)