

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592280

研究課題名（和文） 歯周組織由来細胞におけるストレス応答性タンパク質 MICA の
発現に関する研究研究課題名（英文） Expression of stress responsive protein MICA in
the component cells of the periodontal tissue

研究代表者

河原 和子（KAWAHARA KAZUKO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20034209

研究成果の概要：

ストレス応答性タンパク質 MICA について、ヒト歯周組織における発現の有無と発現制御因子について調べた。歯周組織において MICA は恒常的に発現が誘導されていることが示された。次いで、培養歯根膜細胞において、MICA 誘導・制御因子を検討したところ、トランスフォーミング増殖因子(TGF- β 1)は MICA 発現を亢進し、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)は MICA 発現を転写レベルで抑制することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：MICA、ストレスタンパク質、歯周組織、歯根膜細胞、TGF- β 1

1. 研究開始当初の背景

MICA (MHC-class I Chain A-related) 分子は、腫瘍細胞や熱、低酸素、有害物質に暴露した細胞に発現し、MICA に対する受容体 NKG2D を発現する細胞の傷害機能を活性化するタンパク質であると理解されていた。

NKG2D は、ナチュラルキラー（NK）細胞のほ

か、細胞傷害性 T 細胞（キラー T）、T 細胞、マクロファージなどに発現しており、これらの細胞は臨床的に正常な歯周組織にも見出され、炎症性歯周疾患組織では多数出現することから、MICA が歯肉炎ならびに歯周炎の進行になんらかの関与をする可能性が推察された。

しかしながら、口腔組織における MICA に関しては今もって、扁平上皮癌等について 2,3 の報告を見るのみで、通常の歯周組織に関する報告はまったくない。MICA の発現は組織特異性が高いといわれており、歯周組織での MICA 発現の可能性を明らかにすることが本課題の第一歩であった。

2. 研究の目的

(1) ヒト歯周組織における MICA 発現の状況を明らかにする。

(2) ヒト歯周組織由来培養細胞において、MICA の発現誘導ならびに発現抑制に働く因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織サンプルならびに歯周組織由来培養細胞の準備

便宜抜歯処置を受ける患者から、インフォームドコンセントを得て材料の提供を受けた。組織サンプルは速やかに凍結して使用時まで -80 に保存した。培養歯根膜細胞と培養歯肉線維芽細胞は、通法に従って抜去歯牙に付着していた歯根膜組織あるいは歯肉組織から、10% FCS 添加 DMEM 培地を用いて初代培養を行い、継代早期の細胞を実験に供した。

(2) 歯周組織における MICA 発現について

RNA レベル

組織から総 RNA を抽出し、オリゴ(dT)をプライマーに用いて作製した cDNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。

免疫染色

培養細胞は 8 チャンバーに播種して、セミコンフルエントに達したところで、4% パラフォルムアルデヒドにて固定して、同一スライド上で MICA に対する抗体染色ならびにネガティブコントロールの免疫染色を実施した。なおネガティブコントロール染色では一次抗体として、特異抗体と動物種、イソタイプおよび濃度をマッチさせた正常血清を用い

た。

(3) ヒト歯周組織由来細胞における MICA 発現誘導調節因子の検討

調節因子の試験分子には、炎症性周疾患の発症、進行、修復の過程に関わる代表的な分子を選択した。

LPS、炎症性サイトカイン、細胞増殖因子による MICA 発現誘導効果について、培養歯肉線維芽細胞では RT-PCR によって解析を行い、培養歯根膜細胞においてはリアルタイム PCR 法によって精査した。

血清不含培地による MICA 発現への影響

サイトカインおよび細胞増殖因子による MICA 誘導効果を調べるにあたって血清不含培地を使用した場合、血清フリーであることがストレスとなって培養細胞に MICA の発現を誘導することも考えられる。そこで FCS 不含 DMEM 培地による培養中の歯根膜細胞の MICA 発現レベルを調べた。

歯根膜培養細胞がコンフルエントに達した時点で、10% FCS - DMEM 培地を FCS 不含培地に置換し、0, 3, 15, 40, 64 h 後に、RNA 抽出試薬を加えて細胞ライセートを回収した。

LPS ならびに各種生体分子による MICA 発現誘導・制御効果

培養細胞がコンフルエントに達した時点で、10% FCS 添加 DMEM を FCS 不含 DMEM 培地に置き換え、15 時間後よりサイトカイン類の添加を開始した。試験物質に所定の期間暴露させた後、ライセートを回収した。なお LPS 投与実験では、1% FCS - DMEM を使用した。

RT-PCR ならびにリアルタイム PCR

ライセートから抽出した総 RNA より、オリゴ(dT)プライマーにて cDNA を作製して、RT-PCR またリアルタイム PCR によって MICA 発現レベルを測定した。

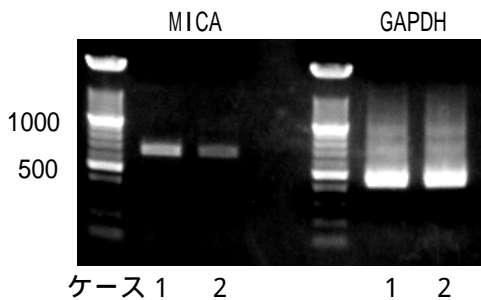
リアルタイム PCR の解析では GAPDH を内部コントロールとして、無処置コントロールの MICA に対する相対値を法で得た。

4. 研究成果

(1) 歯周組織における MICA 発現

1 mRNAレベル

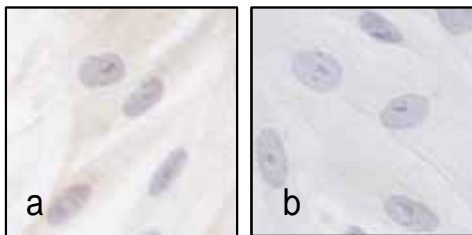
二名から提供を受けた歯周組織より抽出した総 RNA サンプルのいずれからも RT-PCR によって、使用したプライマーセットの予測アンプリコンサイズ位置 (MICA; 626 bp、GAPDH; 452 bp) に、増幅物の明瞭なバンドを得た。



免疫染色

組織小切片では、一部の血管内皮とまれに単核細胞に微弱なシグナルがみられた。

培養細胞染色では弱いシグナルの認められる細胞と認めがたい細胞が混在していた。



同一の 8 チャンバー上の培養歯根膜細胞
a: ビオチン標識-抗 MICA-ヤギ IgG b: ビオチン標識-正常ヤギ IgG

これらの結果から、通常の歯周組織においても恒常的にある程度の MICA 発現が起こっている可能性が示された。

(2) 培養歯肉線維芽細胞に対する LPS ならび

にサイトカイン等による MICA 誘導

代表的な炎症性サイトカイン IL-1 と TNF- α 、細胞増殖因子 TGF- β 1、FGF-2 および FGF-7 (ケラチノサイト増殖因子) について、各 10 ng/ml の濃度で 24 h 処理し、ライセートを回収して RT-PCR を行った。GAPDH レベルに対する MICA 相対レベルをデンストメーターによって算定し、無処置細胞をコントロールとして評価を行った。

TGF- β 1、IL-1 α 、TNF- α でコントロールに比べて MICA 発現が上昇し、これらの中では TGF- β 1 によるレベル変化が大きかった。FGF-7 はコントロールと変わらず、FGF-2 では低下していた。

(3) 歯根膜由来細胞に対する、MICA 発現誘導調節因子の検討

FCS 不含培地による MICA 発現誘導について

FCS 不含 DMEM 培地による培養中の歯根膜細胞の MICA の mRNA レベルは、0 - 64 h の試験期間中に明らかな変化はみられなかった。

LPS による誘導効果

歯根膜細胞が LPS に対する受容体 TLR-4 を発現することが報告されている。そこで LPS による MICA 発現誘導効果を調べた。

実験は *E. coli* 由来の LPS で行った。試験した 0 - 20ng/ml, 0 - 48 h の範囲では、MICA 発現に明白な変化は生じなかった。

サイトカイン投与による MICA 発現誘導

<濃度試験>

IL-1 は0, 0.33, 1.1, 3.3, 10, 20 ng/ml、TNF- α 、TGF- β 1、FGF-2では0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ng/mlの6濃度にて24 h培養した。リアルタイムPCR解析によって、コントロールの無処置サンプルに対してTGF- β 1が250-350%、TNF- α が200-250%、IL-1が110-150%とMICA発現を亢進した。他方FGF-2はコントロールと同程度、あるいは低レベル(2.5 ng/ml $p<0.01$)を示した。

<タイムコース試験>

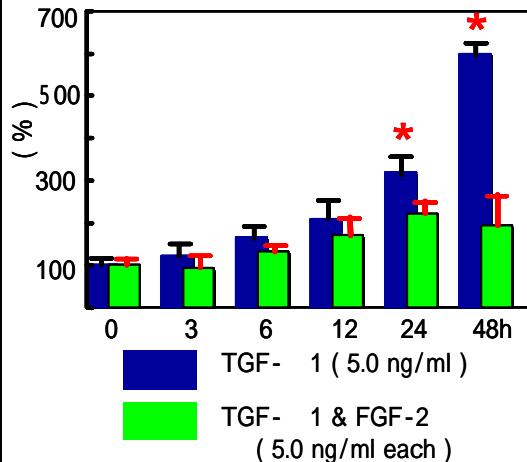
濃度試験の結果をもとに各サイトカインの至適濃度に調整したFCS-不含DMEM培地で、歯根膜細胞を0, 3, 6, 12, 24, 48 h培養した。なお、サイトカインの添加は48 h処理群からスタートしており、RNA抽出試薬添加時点で無処置群を含めていずれの処理群もFCS-不含DMEM中での培養期間は63時間である。

リアルタイムPCR解析によって、TGF- β 1では処理時間とともにMICA発現が増加して48時間後には無処置コントロールに比べて600%の値を示した。TNF- α とIL-1はともに24 hと48 hに増加を示した(TNF- α ; 250%弱、IL-1 ; 200%弱)。いっぽうFGF-2は、3-12 hの3時点では無処置サンプルレベルに比べて20%程度の増加傾向を示したが、24 hと48 hでは低レベルであった(24h $p<0.01$)。

TGF- β 1とFGF-2の二重投与実験

FGF-2は、<濃度試験>と<タイムコース試験>の両試験において、無処置コントロ-

ルに比較して若干低いMICA発現レベルが見られた。そこでMICA発現に対するFGF-2の作用を明確にする目的で、TGF- β 1(5ng/ml)とFGF-2(5ng/ml)の等量二重投与によるタイムコース試験をおこなった。



同じ処理時間におけるTGF- β 1単独投与群とTGF- β 1 & FGF-2二重投与群の有意差(* $p<0.01$)

予想どおり、FGF-2はTGF- β 1によるMICA発現亢進作用を抑制した。処理時間3h以降、二重投与細胞はTGF- β 1単独投与細胞より低いMICAレベルを示し、24hならびに48hでは有意差が認められた。

(4) 得られた主要な成果の意義

非腫瘍性で臨床的には健康な歯周組織においても、MICA発現が起動することが判明した。

非腫瘍性組織で腸以外にMICA発現が報告されている組織は、まだ肝、肺・気管など少数であり、歯周組織でMICA発現が生じることが示されたことは意義深い。

難病パーチェット病はMICAとの関係が推定されているが、MICAの役割や多器官に発症する機序など十分な解明にいたっていない。この疾患は再発性口腔粘膜

潰瘍を必発症状としており、本成果はこの難病の制御法開発の糸口を与えるかもしれない。

歯根膜細胞ではTGF- β 1がMICA発現を亢進させることが判明した。

腫瘍細胞においては TGF- β と MICA の関係について以前から注目されてきた。通常、腫瘍細胞では TGF- β が高レベルであると MICA 発現は低く、予後が悪い。このため腫瘍以外についての論文で、TGF- β は MICA 発現を抑制するとの前提で考察が展開されていることもあり、この科学研究によって得られた正常歯周組織由来細胞では、TGF- β 1 は MICA 発現を亢進させるという成果のインパクトと意義は大きい。

翻って歯周組織では、メカニカルストレスによって骨芽細胞や歯根膜細胞が TGF- β を産生することが明らかにされており、TGF- β と MICA によって生じる生理現象の解明に期待される。

MICA発現は、TGF- β 1とFGF-2によって制御を受けることが判明した。

予想に反して、代表的な炎症性サイトカイン IL-1 および TNF- α よりも、細胞増殖因子 TGF- β 1 が、MICA 発現を亢進した。またこの応答を細胞増殖因子 FGF-2 が抑制することを明らかにした。

最近、従来から MICA に知られる細胞傷害活性や移植抗原作用以外に、細胞周期の制御に関わる可能性を示唆する報告が出ている。TGF- β 1 と FGF-2 による MICA の発現制御の事実は、この新しい作用の

可能性をサポートするものである。歯周組織由来細胞においては、MICA が歯周炎組織の修復や再生細胞の分化過程に関与する可能性も考えられる。

以上述べたごとく、科学研究費の支援を受けた本研究の成果は、予防歯科・歯周歯科領域はもとより、われわれ以外の医学領域にも新たな研究展開のきっかけになると思われる。

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 5 件)

KAWAHARA K, TGF-beta1 Enhances MICA Expression in the Human Periodontal Ligament Cells, IADR, 2009/4/2 (Miami, USA)

河原和子, 歯周組織におけるストレス応答性タンパク質MICAの発現, 日本口腔衛生学会総会, 2008/10/4 (さいたま市)

河原和子, ヒト歯周組織におけるストレス誘導タンパク質MICA遺伝子発現と調節因子, 日本歯科基礎医学会, 2008/9/23 (東京)

河原和子, ヒト歯根膜細胞におけるMHC class I-related chain A (MICA)の発現, 日本歯周病学会, 2008/4/24 (さいたま市)

島津 篤, 17 エストラジオールは歯根膜細胞に対してOsteoprotegerin発現を誘導する。日本歯科基礎医学会, 2007/8/31 (札幌)

6. 研究組織

(1)研究代表者

河原 和子 (KAWAHARA KAZUKO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研科・助教
研究者番号: 20034209

(2)研究分担者

島津 篤 (SHIMAZU ATSUSHI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研科・

助教
研究者番号：10274094

柴 秀樹 (SHIBA HIDEKI)
広島大学・病院・講師
研究者番号：60260668

(3)連携研究者