

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592400

研究課題名（和文） 歯周疾患の進行と Toll 様受容体リガンドの関連

研究課題名（英文） Relation between progress of periodontal disease and toll-like receptor ligand

研究代表者 中村 公也（NAKAMURA KIMIYA）

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：00261313

研究成果の概要：合成二本鎖 RNA である poly(I):poly(C) を骨芽細胞様 E1 細胞に作用させたところ、すぐに IFN- β mRNA の発現が誘導された。また、poly(I):poly(C) は受容体である TLR3, RIG-I, MDA5 およびケモカインである CXCL10 の発現も誘導したが、これらの誘導は、抗 IFN- β 抗体により抑制され、これら遺伝子の誘導には poly(I):poly(C) 刺激により E1 細胞から放出された IFN- β が関与しているものと思われた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2008 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

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：予防歯科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 生活習慣病の一つである辺縁性歯周炎は、慢性的に経過する疾患である。現在、成人の多くがこの疾患に罹患しており、「健康日本 21」の 2010 年における目標値の中にも成人期の歯周病予防が設定されている。

(2) 歯周疾患の進行に伴い、みられる歯槽骨の破壊に関与する骨系細胞と Toll 様受容体 (TLR) との関連を明らかにした研究は、破骨細胞の分化・誘導に関するものが中心で、

骨芽細胞と TLR に関する研究は少ない。また、骨系細胞と TLR に関する研究は、TLR4 で認識される LPS に対するものが大部分であり、それ以外の TLR リガンドの影響を明らかにした研究は少ない。

(3) 近年、骨免疫学の分野が注目されており、骨系細胞も免疫機構の一翼を担っていることが明らかになってきている。さらに、歯槽骨代謝に関与する細胞を制御するサイトカインネットワークについては、種々の免疫

担当細胞が産生する炎症性サイトカインなどにより破骨細胞が誘導され、骨の吸収・破壊が促進するということが知られている。しかし、骨芽細胞の役割については、いまだ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、第一に自然免疫系において重要な役割を担う Toll 様受容体に着目し、骨芽細胞がマクロファージや T 細胞に代表される免疫担当細胞のように、免疫調節能を有するか否かを明らかにすること、第二に歯周疾患の進行過程においてグラム陰性菌以外の微生物、例えば、ウイルスなどが関与する可能性を模索することである。

3. 研究の方法

(1) 試薬

- poly(I):poly(C)
- recombinant mouse IFN- β (rIFN- β)
- rabbit polyclonal antibody against mouse IFN- β
- rabbit anti-TLR3 polyclonal antibody
- mouse anti-STAT1(N-terminus)antibody
- mouse anti-STAT1(pY701), phospho-specific antibody

(2) 細胞培養

細胞は、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (E1) 細胞を用い、10%牛胎仔血清 (FBS) 含有 α -MEM 培地にて 37°C, 5% CO₂の気相下で通法に従い培養した。

(3) RT-PCR

E1 細胞がコンフルエンスになった後、poly(I):poly(C)あるいは rIFN- β を培養液に添加し、処理実験を行った。処理後、TRIzol[®]を用いて全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。合成した cDNA および IFN- β , CXCL10, TLR3, RIG-I, IFN- α/β receptor に対する特異的プライマーを用いて PCR を行い、これらの遺伝子発現について検討した。使用したプライマーの配列は次の通りである。

IFN- β :

5'-CTC CAG CTC CAA GAA AGG ACG-3'

5'-GAA GTT TCT GGT AAG TCT TCG-3'

CXCL10:

5'-CCT GCC CAC GTG TTG AGA T-3'

5'-TGA TGG TCT TAG ATT CCG GAT TC-3'

TLR3:

5'-ATT TAG AGT CCA ACG GCT TAG ATG-3'

5'-TTC CAG TAA AAA GAG ATC CTC CAG-3'

RIG-I:

5'-GCA TAT TGA CTG GAC GTG GCA-3'

5'-CAG TCA TGG GTG CAG TTC TGT C-3'

IFN- α/β receptor :

5'-CAT GGC TGG CTA TAT TGT TCC-3'

5'-ATG GCT TGG GTT AAA GGT TTA C-3'

IFN- β , CXCL10, TLR3, RIG-I, IFN- α/β receptor のアニーリング温度は、62, 55, 55, 55, 54°C であった。PCR 産物は、1%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色した後、紫外線照射下にて各バンドを検出した。

(4) リアルタイム RT-PCR

MDA5 mRNA の発現については、(3) と同様の cDNA を用いて、定量的 PCR を行った。定量的 PCR は、Taqman[®] gene expression assay (Assay ID: Mm00459183_m1) および Taqman[®] gene expression master mix を使用し、ABI 7300 Real-time PCR system にて行った。

(5) western blot 法

E1 細胞における TLR3, RIG-I タンパク, STAT1 および STAT1 のリン酸化について検討した。また、抗マウス IFN- β 抗体を添加して、STAT1 リン酸化に対する IFN- β の関与について検討した。

4. 研究成果

(1) poly(I):poly(C)は、骨芽細胞様 E1 細胞における IFN- β , CXCL10, TLR3, RIG-I および MDA5 mRNA の発現を時間依存的および濃度依存的に誘導した (図 1 ~ 4)。

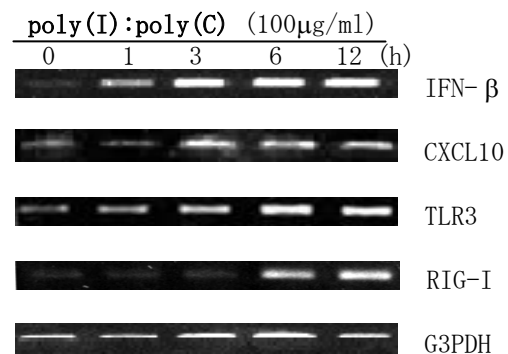


図 1

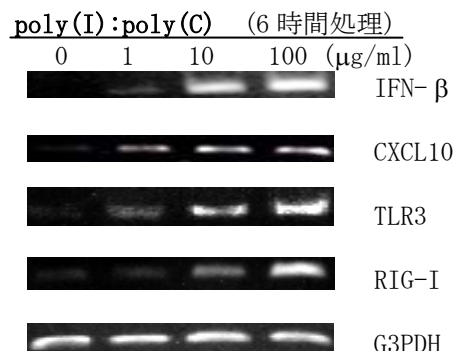


図 2

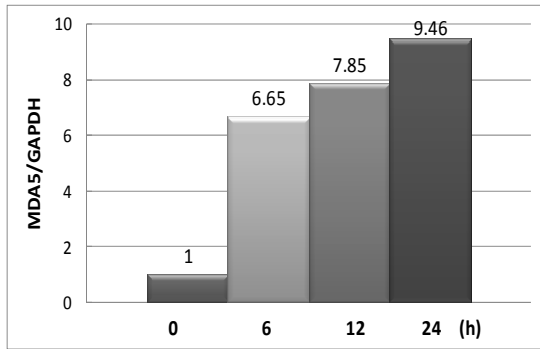


図 3 : poly(I):poly(C) (100μg/ml)

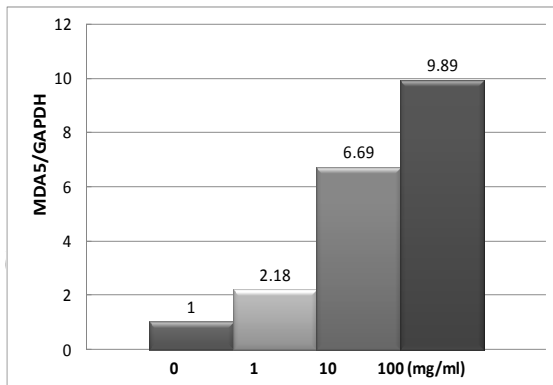


図 4 : poly(I):poly(C)で6時間処理

(2) poly(I):poly(C)は、E1 細胞における TLR3, RIG-I タンパクの発現を誘導した (図 5)。

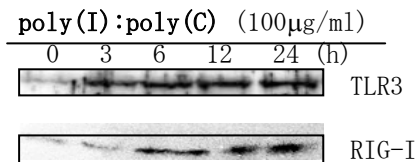


図 5

(3) MC3T3-E1 細胞は、I 型 IFN の受容体である IFN- α/β receptor mRNA を発現していることが RT-PCR 法にて明らかになった。

(4) rIFN- β は、E1細胞における CXCL10, TLR3, RIG-I および MDA5 mRNA の発現を誘導した (図 6 ~ 9)。

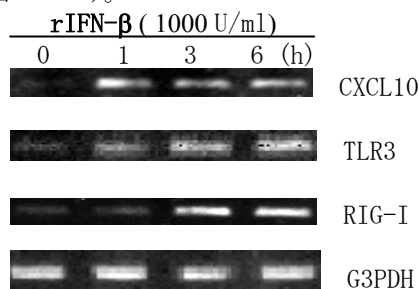


図 6

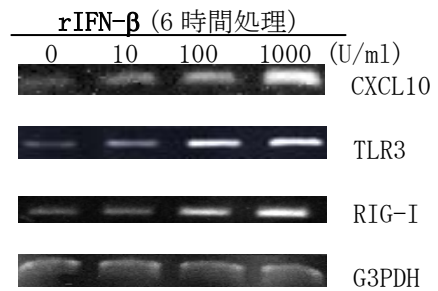


図 7

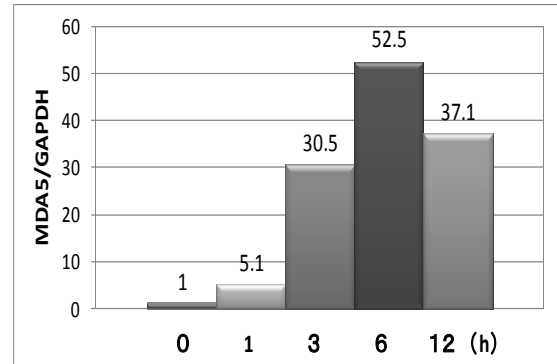


図 8 : rIFN- β (1000 U/ml) 処理

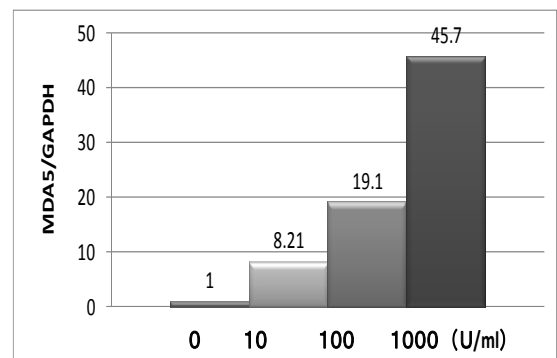


図 9 : rIFN- β で6時間処理

(5) E1細胞を 100 (μ g/ml) poly(I):poly(C) および抗 IFN- β 中和抗体で処理したところ、poly(I):poly(C)が誘導する CXCL10, TLR3, RIG-I および MDA5 mRNA の発現が濃度依存的に抑制された (図 10, 11)。

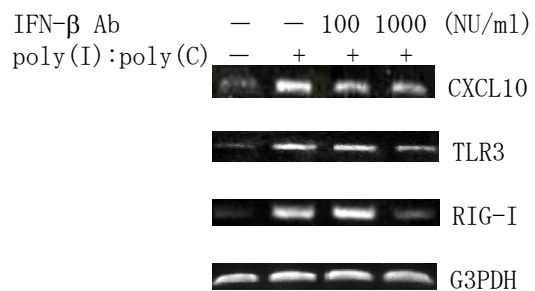
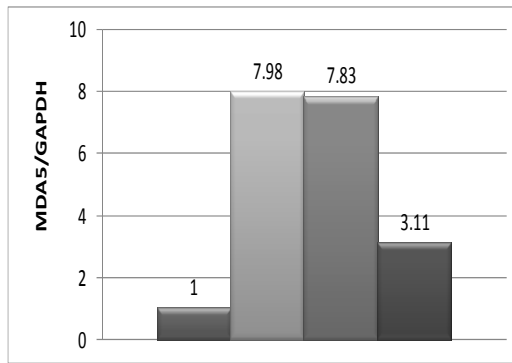


図 10



poly(I):poly(C) - + + +
IFN-β Ab (NU/ml) - - 100 1000

図 1 1

(6) poly(I):poly(C) (100 μg/ml) は、E1 細胞における STAT1 のリン酸化を処理後 3 時間で誘導したが、このリン酸化は、抗 IFN-β 中和抗体を添加することにより、濃度依存的に抑制された (図 1 2, 1 3)。

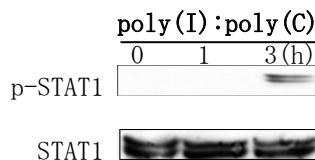


図 1 2

poly(I):poly(C) - + + + + +
IFN-β Ab (NU/ml) - 1000 - 10 100 1000



上述してきた結果より、

①骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞は、ウイルス由来二本鎖 RNA の存在により、IFN-β を産生し、破骨細胞への分化を抑制することで骨代謝の維持に関与すること

αpoly(I):poly(C) により誘導された IFN-β が E1 細胞に autocrine 的に作用し、E1 細胞における TLR3, RIG-I, MDA5 および CXCL10 の発現が上昇したこと

③E1 細胞において、poly(I):poly(C) はケモカイン CXCL10 mRNA の発現を誘導することから、骨芽細胞は、感染部位へ Th1 細胞 NK 細胞を遊走し、細胞性免疫応答の開始に寄与すること

④poly(I):poly(C) による TLR3, RIG-I, MDA5 および CXCL10 mRNA の発現誘導は STAT1 のリン酸化に依存すること

などが明らかとなり、骨芽細胞は、骨代謝調節機構以外のこれまではあまり注目されて

いなかった機能すなわち、局所における免疫系制御機構にも関与することや、ある種のウイルスが歯周病の進行過程に関与することが推測されたので、今後は今回の実験で誘導されたサイトカイン等に対する抗体を用いた動物実験等を行い、歯科臨床応用への可能性について検討を行う必要があると思われる。

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 1 件)

- ① Kimiya Nakamura, Yoshiaki Deyama, Yoshitaka Yoshimura, Kuniaki Suzuki and Manabu Morita: Synthetic double-stranded RNA induces retinoic acid-inducible gene-I in mouse osteoblastic cells. Molecular Medicine Reports 1: 833-836, 2008. (査読: 有)

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① 中村公也, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明: MC3T3-E1 細胞における poly(I):poly(C) による MDA5 mRNA の発現誘導. BMB2008. 2008 年 12 月 9 日. 神戸市.

- ② 中村公也, 竹原順次, 三宅 亮: 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における TLR3 リガンド RIG-I/MDA5 の発現誘導. 第 57 回日本口腔衛生学会・総会. 2008 年 10 月 4 日. さいたま市.

- ③ 中村公也, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明, 森田 学: MC3T3-E1 細胞における TLR3 リガンドによる RIG-I の発現誘導. BMB2007. 2007 年 12 月 11 日. 横浜市.

- ④ 中村公也, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明, 森田 学: 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における RIG-I の発現. 2007 年 8 月 30 日. 札幌市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 公也 (NAKAMURA KIMIYA)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 00261313

(2) 研究分担者

出山 義昭 (DEYAMA YOSHIKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 80271667

(3) 連携研究者

なし