

平成21年4月26日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007年～2008年

課題番号：19791628

研究課題名（和文） 口腔組織毛細リンパ管内皮細胞における免疫老化機構の解明

研究課題名（英文） The Clarification of immunosenescent immune systems on human lymphatic endothelial cells in oral cavity

研究代表者 黒嶋 伸一郎（KUROSHIMA SHINICHIRO）

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40443915

研究成果の概要：今回の研究では、口腔内のリンパ管を介した免疫機能が、加齢や炎症に伴ってどのように変化するかを調べており、免疫に大切な役割を果たす複数の蛋白質に焦点を当てて研究を行いました。その結果、加齢や炎症に伴ってその数を減少させる蛋白質が存在することを明らかにしました。以上の結果は、加齢や炎症が免疫機能の低下に関与する可能性を示唆しています。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：リンパ管内皮細胞、ケモカイン、Toll様受容体、白血球接着因子、免疫、老化

1. 研究開始当初の背景

従来、脈管研究と言えば血管に関する研究であり、リンパ管に関する研究は、近年に至るまでほとんど行われていなかった。しかし1989年に、リンパ管を同定するために開発された5'-Naseを用いた酵素組織学的染色法の開発を皮切りに、vascular endothelial growth factor receptor-3、desmoplakin、

prospero related homeobox gene-1 (*prox1*)、lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1)、ならびに podoplanin などのリンパ管特異的抗原が相次いで発見され、近年、リンパ管に関する組織学的研究が世界的な規模で盛んに行われるようになってきた。

一方申請者は、大学院生時代の研究から、

ヒト小腸毛細リンパ管が、病原因子共通の分子構造である pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識する受容体である Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4、ならびに、ケモカインのひとつである cys-cys (C-C) chemokine ligand 21 (CCL21) を発現することなどを明らかにしてきた。

申請者は現在、臨床系教室の1つである高齢者歯科学教室に所属しているが、本教室が治療対象としている患者の多くは65歳以上の高齢者であり、免疫力の有意な低下が認められるとともに、慢性疾患に罹患していることも少なくないため、しばしば治療の継続が困難となる場合がある。免疫機構は大きく自然免疫と獲得免疫に分類されるが、近年、自然免疫に関与する白血球（好中球およびマクロファージ）、および獲得免疫に関与する白血球（T細胞およびB細胞）の両者が、老化に伴って量的にも（細胞数）および質的にも（能力）低下することが報告されている。

近年のリンパ管研究、ならびに申請者の研究結果から、この自然免疫と獲得免疫の架橋としてリンパ管が重要な役割を担っていることが示唆されている。リンパ管内皮細胞特異抗原を用いた細胞分離培養システムが確立されたのはごく最近であるため、このような研究報告は現在に至るも非常に少なく、ましてや、口腔組織におけるリンパ管内皮細胞の免疫老化に関する研究は、全く行われていないというのが実情であることから、口腔組織リンパ管内皮細胞における免疫老化機構を解明するため、本研究を企画した。

2. 研究の目的

口腔組織におけるリンパ管内皮細胞の免疫老化という点に焦点を絞り、老化した口腔組織のリンパ管内皮細胞における機能分子

発現機構が、老化していない口腔組織のリンパ管内皮細胞における機能分子発現機構と如何なる点で異なるかを明らかにすることを目的とする。すなわち、

(1) 老化していない健常および炎症組織、ならびに老化した健常および炎症組織を用い、リンパ管内皮細胞における種々の白血球接着因子およびケモカインの発現様式の相違を明らかにする。

(2) 転写因子である Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) による種々の白血球接着因子およびケモカインの発現誘導機構の相違を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) In vivo の検索

北海道大学病院より試料提供を受けるヒト口腔健常・炎症組織（舌、歯肉、頬粘膜、歯髄、口蓋粘膜、顎下リンパ節、口蓋扁桃）を材料とした in vivo の検索を行う。

なお、採取組織は、老化マーカーp16^{INK4a} および senescence-associated acidic β -galactosidase (SA- β -Gal) の応用により、老化した組織と老化していない組織を明確に区別することが可能となる。また、臨床的に炎症症状が存在し、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色により白血球の著しい浸潤が認められる組織を炎症組織とする。

<免疫染色を用いた免疫組織化学的検索>

- ①凍結連続切片を作製し、1枚目の切片では H-E 染色で炎症の有無を確認するとともに SA- β -Gal 染色で老化組織と老化していない組織を区別する。
- ②2枚目の切片に対しては、白血球接着因子である platelet endothelial cell

adhesion molecule-1 (PECAM-1) および LYVE-1 に対する特異抗体を用いた 2 重染色を行い、リンパ管の同定および PECAM-1 の発現を検索する。

③3 枚目、4 枚目ならびに 5 枚目の切片に対しては、それぞれ TLR2、TLR4 ならびに CCL21 に対する特異抗体を用い、②で同定したリンパ管における TLR2、TLR4、ならびに CCL21 の発現を検索する。

(2) In vitro の検索

①細胞の分離・培養・継代

健常ヒト頬粘膜由来リンパ管内皮細胞の分離・培養：採取組織は免疫組織学的に組織内毛細リンパ管の数が多く粘膜下組織の交織の緩い頬粘膜とし、以下のように行う。

①-1：採取された頬粘膜から上皮を除去。

①-2：残された組織を細分化し、内皮細胞専用の培地にて混合細胞の培養を行う。

①-3：混合細胞から、リンパ管特異的な LYVE-1 および CD31 に対する抗体接合磁気ビーズ、および血管内皮細胞特異的な CD34 に対する抗体接合磁気ビーズを用いることによって分離した LYVE-1 陽性・CD34 陰性・CD31 陽性細胞をリンパ管内皮細胞とする。

②市販ヒト正常リンパ管内皮細胞の培養

現在、複数社からヒト皮膚および肺リンパ管内皮細胞が分離され市販されている。これらの細胞を購入し、専用培地にて培養・継代を行う。

③①または②により樹立された細胞における In vitro の検索

③-1：樹立された培養リンパ管内皮細胞が種々のリンパ管特異抗原 (desmoplakin、LYVE-1、podoplanin、*prox-1*) に対して反応陽性であることを確認する。

③-2：培養リンパ管内皮細胞に対して、RT-PCR、ウェスタンブロッティング、免疫染色を用い PECAM-1、TLR2、TLR4 ならびに CCL21 の発現を検索する。

③-3：老化マーカー (SA- β -Gal 染色、p16^{INK4a}、ならびに Ki-67) を用いて老化した細胞群を選別し、③-2 と同様の手技を行う。

③-4：老化した、および老化していないリンパ管内皮細胞を、TLR2 および TLR4 リガンドでそれぞれ処理し、③-2 と同様の手技を行う。

③-5：③-2～③-4 で得られたデータを比較解析する。

4. 研究成果

【研究の主な成果】

(1) In vivo の検索

①ヒト歯肉組織についての検索

①-1：健常組織

- ・全てのリンパ管は、PECAM-1 および CCL21 を発現する。
- ・結合組織乳頭部における毛細リンパ管は TLR2 および TLR4 を発現しない。
- ・粘膜固有層における集合リンパ管の約半数は TLR2 および TLR4 を同時発現し、残りの半数は TLR2 および TLR4 を発現しない。
- ・すべての血管は、CCL21、TLR2 ならびに TLR4 を発現しない。

- ・老化組織においては老化していない組織と比較して発現様式に大きな変化が認められない（ただし、老化組織の絶対数が不足）。

②-1：炎症組織

- ・すべてのリンパ管は、PECAM-1 を発現する。
- ・すべてのリンパ管および血管は、CCL21、TLR2 ならびに TLR4 を発現しない。
- ・老化炎症組織は絶対数がほぼゼロに等しく成果としては現在不明。

②ヒト舌組織についての検索

②-1：健常組織

- ・全てのリンパ管は、PECAM-1 および CCL21 を発現する。
- ・結合組織乳頭部における毛細リンパ管、ならびに粘膜固有層における集合リンパ管の全てが TLR2 および TLR4 を発現する。
- ・すべての血管は、CCL21、TLR2 ならびに TLR4 を発現しない。
- ・老化組織においては老化していない組織と比較して発現様式に大きな変化が認められない（ただし、老化組織の絶対数が不足）。

②-2：炎症組織

- ・すべてのリンパ管は、PECAM-1 を発現する。
- ・すべてのリンパ管および血管は、CCL21、TLR2 ならびに TLR4 を発現しない。
- ・老化炎症組織は組織提供を受けることができなかったため不明である。

(2) In vitro の検索

- ①健常ヒト頬粘膜由来リンパ管内皮細胞の分離・培養

提供を受ける頬粘膜組織の絶対数が不足していたため細胞株の樹立を行えなかった。また、その他の口腔組織においては、1回採取量が著しく少なくリンパ管内皮細胞株の樹立には至らなかった。

②市販ヒト正常リンパ管内皮細胞の培養

①の理由から、申請者は市販ヒト正常皮膚または肺リンパ管内皮細胞株を培養・継代し、これらを用い、本研究を行った。

しかしながら口腔組織リンパ管内皮細胞が、他の組織におけるリンパ管内皮細胞と異なる分子生物学的特性を有している場合、これを検索することはできない。

③リガンド未処理の培養リンパ管内皮細胞における PECAM-1、CCL21、TLR2 ならびに TLR4 の発現

- ・リガンド未処理の老化していないリンパ管内皮細胞は、PECAM-1、CCL21、TLR2 ならびに TLR4 を遺伝子およびタンパク質レベルで通常発現する。
- ・リガンド未処理の老化したリンパ管内皮細胞は、PECAM-1、CCL21、TLR2 ならびに TLR4 を遺伝子レベルで発現し、PECAM-1、CCL21、ならびに TLR4 をタンパク質レベルで発現するが、TLR2 に関してはタンパク質レベルで発現が抑制される。
- ・リガンド処理を行ったリンパ管内皮細胞の検索に関してはデータ不足である。

【得られた成果の国内外における位置づけとインパクト】

2004年の段階で、リンパ管内皮細胞の白血球接着因子、ケモカインならびに TLR に関する

る検索は、申請者が大学院生として参画してきた研究のみであり、現時点においても申請者らの研究、ならびに、2008年にPeguらが市販ヒト正常皮膚リンパ管内皮細胞を用い遺伝子レベルで行った検索以外見当たらず、ましてや口腔組織リンパ管内皮細胞に焦点を絞った検索は国内外を通して一切存在しない。

一方、今回申請者が組織学および分子細胞学的に明らかにした事柄は、リンパ管内皮細胞が白血球接着因子、ケモカイン、ならびにTLRを介して免疫機構に大きく貢献する可能性を強く示唆するものであり、リンパ管が従来言われてきたような単なる下水道ではなく、組織内白血球のリンパ管内への移動や所属リンパ節への輸送に積極的な役割を担い、さらにリンパ管内皮細胞自身も外来抗原に対してその処理能力を有する重要な器官である可能性を示したことは非常に強いインパクトであると考えられる。

【今後の展望】

(1) リガンド処理した老化していないリンパ管内皮細胞、ならびにリガンド処理した老化したリンパ管内皮細胞におけるケモカインおよびTLRの細胞内分子動態を明らかにすることで口腔組織に特異的な免疫治療システムの開発・応用に欠かすことのできない分子生物学的基盤の確立に一層近づくことができる。

(2) 口腔領域における悪性腫瘍患者の問題点のひとつに転移が挙げられ、血管およびリンパ管を介して行われることが明らかにされている。転移と血管に関する分子生物学的検索は詳細に行われている一方で、転移とリンパ管に関する分子生物学的な検索はほとんど行われていないのが実情であり、悪性腫

瘍に関連が強い白血球接着因子、ケモカインならびにTLR(免疫のみならず腫瘍にも関連があることは検索されている)といったリンパ管における分子動態が明らかになれば、頭頸部腫瘍のみならず悪性腫瘍全般における治療システムの開発・応用に必要不可欠な分子生物学的基盤の確立に貢献できると考えられる。

(3) 現在日本が抱える大きな問題である超高齢化社会に対し、老化免疫の分子生物学的基盤を多方面から早期に構築して臨床応用を早め、誰もが受けることのできる治療方法の開発に貢献できると考える。

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 Taishi 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)

[学会発表] (計2件)

- ① 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)
- ② 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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒嶋伸一郎 (KUROSHIMA SHINICHIRO)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40443915

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし