

機関番号：32409

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592343

研究課題名 (和文) アフタ病態解明に向けた糖質コルチコイド変動と  $\gamma\delta T$  細胞免疫応答能の解析研究課題名 (英文) Studies of aphthous stomatitis on the response to glucocorticoids or immunocompetence of  $\gamma\delta T$  cells.

研究代表者

小林 明男 (KOBAYASHI AKIO)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60129153

研究成果の概要 (和文)：

アフタ発症のメカニズムは未だ不明な点が多く、診断はもっぱら現病歴や臨床所見に基づいたものでしかない。それゆえに根拠となる客観的な指針がないのが現状である。治療法においても根本的な方法は確立されておらず、現時点では対症的な方法にとどまっている。本研究ではアフタ性口内炎の要因として挙げられるストレス、免疫機構の関わりについて探求を試みた。唾液中のストレスマーカーを測定した結果、口内炎がしやすいと感じる体質の程度によって変動する可能性が示唆された。糖質コルチコイド(GC)に呼応して免疫細胞の時計遺伝子が誘導性に発現することや、 $\gamma\delta T$  細胞の免疫応答能を有する可能性が示唆された。またサーカディアンリズムにはストレスシグナルが直接影響していることが示された。以上より、アフタ発症にはストレスに起因する GC の変動やサーカディアンリズムの異常が関わっている可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

The mechanism of onset of aphtha has not been well-elucidated, and diagnosis of aphtha is based entirely on current medical history and clinical findings. As a result, no objective guidelines that serve as the basis of diagnosis are currently available. No fundamental treatments have been established, and only palliative care is given at present. In the present study, we investigated the roles of stress and immune mechanisms, which are known to be causes of aphthous stomatitis. Measurement of salivary stress markers revealed the possibility that these markers vary depending on the sensitivity of the individual to stomatitis. The results indicated the possibility that clock genes in immunocytes are inducibly expressed in response to glucocorticoids (GC), and that  $\gamma\delta T$  cells have immunocompetence. In addition, the circadian rhythm was found to be directly influenced by stress signals. The above findings suggest that onset of aphtha may be related to variations in GC caused by stress and abnormalities in circadian rhythm.

交付決定額

(金額単位：円)

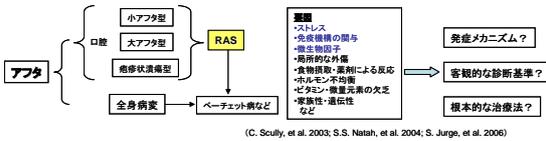
	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：アフタ、ストレス、糖質コルチコイド、クロモグラニン A、 $\gamma\delta TCR$

## 1. 研究開始当初の背景



(C. Scully, et al. 2003; S.S. Natch, et al. 2004; S. Jurge, et al. 2006)

[糖質コルチコイド:概日リズム調節機構とストレス応答に関する背景]

日常の診療においてアフタ有病患者に遭遇するとき、程度の差はあるものの、不規則な生活習慣や仕事上での疲労・不安感、睡眠不足といった心的ストレスを背景に抱えている方が多いことをわれわれはしばしば経験する。文献的にもアフタとストレス要因との因果関係を指摘する報告は散見される (Miller MF. et al. 1977, Chiappelli F. et al. 2004). ストレス時の生体防御反応の中心的な役割を果たすのが糖質コルチコイド (GC) である。GC は副腎皮質より産生される他、鉱質コルチコイドやアンドロゲンも産生され、電解質、血圧、糖代謝の調節にも関与している。コルチゾールの分泌量として、ヒトでは1日あたりおよそ10mg とされるが、ストレス時には少なくとも10倍以上の分泌量に増大する (Schimmer BP. et al. 1996 ; Degroot LJ. et al. 2005). ストレス時の分泌は視床下部 (CRH: corticotropin-releasing hormone) — 下垂体前葉細胞 (ACTH: adrenocorticotrophic hormone) の

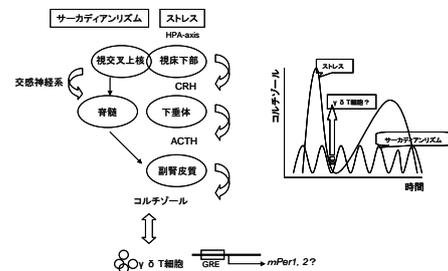
HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal)-axis 系によって制御されるが、生理的分泌は振幅を伴う概日リズムによって変動していることが知られている (Takahashi JS. et al. 2001). リズムの位相は、ヒトでは起床時にピークを示し、反対に夜行性のマウスでは完全に逆相位であることが知られている (Keenan DM. et al. 2004). リズムを発振する中枢の制御系は視床下部視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) といわれ、時計遺伝子といわれる因子によってネガティブフィードバック機構で調節されている (Kriegsfeld LJ. Et al. 2002). SCN からのサーカディアンシグナルは脊髄交感神経節前ニューロンの神経支配によって副腎皮質ホルモンを調節することが最近の研究で明らかになってきており (Ishida A. et al. 2005), GC が末梢細胞に時を伝えるメッセンジャーとしての役割を担っていると考えられる。つまり、SCN—交感神経という中枢性のリズム制御系が副腎皮質ホルモン情報へと変換され、全身の細胞にリズム入力シグナルを伝えるという伝達経路が存在すると考えられる。最近、時計遺伝子 *mPeriod* (*Per*) 1 のプロモーターに GC 応答領域 (GRE) があり、GRE を介して *mPer1* の転写が制御されていることが明らかとなった (Koyanagi S. et

al. 2006). また、合成ステロイド剤を末梢臓器の初代培養系や細胞株に用いた実験で、投与によってリズム発振が誘導されることや、副腎皮質ホルモンの生体への連続投与で行動リズムが攪乱されるなど、GC がリズム調節を末梢臓器に伝えるメッセンジャーとしての作用があることが分子レベルで明らかにされてきている。

## 2. 研究の目的

ストレスや口内炎体質が GC シグナル系に応答するのか、またサーカディアンシグナル系に直接影響を及ぼすのかを明らかにするため、以下の検討を行った。

- (1) アフト患者群、健常群における唾液中ストレスマーカーを測定し、変動の相違を明らかにする。
- (2) アフトに関与する粘膜免疫系細胞における時計遺伝子 *per1, 2* の発現に対する GC の影響を検討する。
- (3) 免疫不全マウスモデルに細胞移植、GC 処理を行なうことで、 $\gamma \delta$  T 細胞の免疫応答能の相違について検討する。
- (4) リズム異常を持つ *mPer2* ノックアウトマウスを入手し、ステロイド処理による  $\gamma \delta$  T 細胞の活性化変動の相違を比較検討する。



## 3. 研究の方法

(1) 看護学生の唾液中ストレスマーカーを用いた口内炎体質の測定調査

今回われわれは埼玉医科大学の看護学校生60名に対して、研究の目的を説明し同意を得たうえで唾液を採取し、ストレスマーカーとされるコルチゾール、クロモグラニンA、および分泌型IgAを測定し、口内炎のきやすさによる体質別の測定調査を行った。EIA法を用いた唾液中のコルチゾール測定は、cortisol-binding globulinによって干渉する血漿測定よりもHPA-axisのコルチゾール活性をより反映しているとの報告がなされたことから (WS. Gozansky et al., 2005), この方法を用いた。コルチゾールの分泌量は起床時前後に最も高く、午前中には減少し、午後安定するというサーカディアンリズムをもつことが知られている。クロモグラニンA,

および分泌型 IgA も同様に ELISA 法に測定した。唾液は採取 5 分以内の飲水および 30 分以内の歯磨きを制限し、食事のものとした。また必要量を排出できない者に対しては測定に影響しないガムを咀嚼してもらい採取した。女性の口紅は落としてもらった。採取後、 $-20^{\circ}\text{C}$ での凍結および融解後、 $1500\text{ g} \times 15$ 分遠心しムチンを沈殿させ、上精を  $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し測定は全サンプルを同時に行なった。

60 名の学生は事前のアンケートにより口内炎に 1) できにくい人, 2) たまにできる人, 3) よくできる人の体質別に振り分けた。また、現在口内炎がある人、ない人についても別途記入してもらった。これらの内訳により上記マーカーの測定値について検討を加えた。

(2) リンパ球系細胞を用いた糖質コルチコイドによる時計遺伝子 *per1, 2* の発現応答の検討

アフタをもたらす粘膜上皮において重要な役割をもつのが免疫系細胞であり、その作用がアフタ発症に深く関わっていることが考えられる。そこでマウス由来のマクロファージ細胞株を用いて、デキサメタゾンを処理することにより継時的な時計遺伝子 *per1, 2* の発現応答を検討した。発現は RT-PCR を用いて半定量的な測定により検討した。

(3) ヒト末梢血単核細胞 (hPBMCs) の単離ならびに免疫不全マウスへの移植

hPBMCs はヘパリン Na または EDTA 入りの採血管 (BD Vacutainer) を使用してボランティアの健常人全血から、Ficoll-Hypaque 比重遠心法によって分離し、単離した。

免疫不全マウスにはチャールズ・リバー社から入手可能な NOD. CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J mice を用いた。本系統は補体活性の欠損、骨髄球分化および抗原提示機能の欠損、低 NK 細胞活性、放射性抵抗性を呈することを特徴とする。免疫応答可能な T, B 細胞を欠損していることから、ヒト細胞による細胞移植に適しているとされている。細胞移植は腹腔内より注入した。

(4) 移植マウスでのプレドニゾン (PSL) 処理による脾臓内  $\gamma\delta$  T 細胞の測定

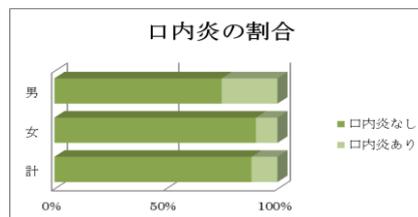
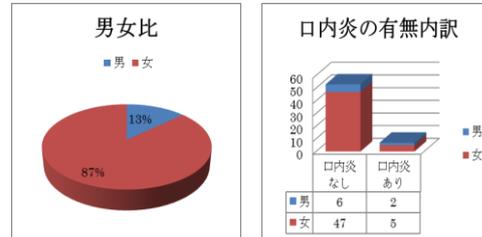
hPBMCs を腹腔内に移植した。これに 21 日間徐放性ペレットである PSL (1.5mg) もしくは Placebo (1.5mg) を皮下へ埋入し、ペレットが吸収される 3 週目で下顎骨膜下に LPS ( $10\mu\text{g}$ ) を局注し 4 週目で脾臓を採取した。ヒト  $\gamma\delta$  T 細胞はフローサイトメトリーにより定量した。

(5) *Per2* ノックアウトマウスを用いたコルチゾン A の測定

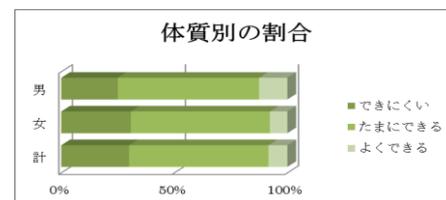
サーカディアンリズムを制御する時計遺伝子が GC の動態に直接影響を及ぼすのかを検証するため、最もリズム異常の表現型が顕著とされる *per2* ノックアウトマウス (KO) を入手し、血中コルチゾン A の動態を測定した。WT 群と KO 群にそれぞれ PSL を IV と同様に処

理し、同時に骨への影響を考慮し、ビスフォスフォネート製剤 (ゾメタ; ノバルティスファーマ) を週 1 回投与のうえ、4 週目に血液を採取した。測定は ELISA 法を用いた。

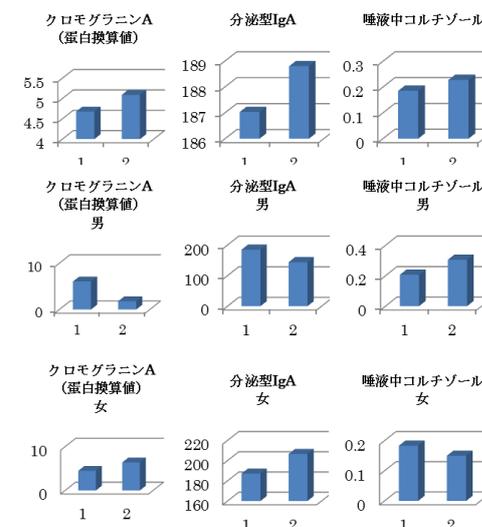
#### 4. 研究成果



(1) 看護学生 60 名 (平均年齢  $20.89 \pm 3.7$  歳) の内訳は男 8 名 (平均年齢  $21.6 \pm 4.3$  歳), 女 52 名 (平均年齢  $20.78 \pm 2.6$  歳) であった。口内炎は 7 名 (12%) に認められ、男 25%, 女 9.6% と男性に多い傾向であった。

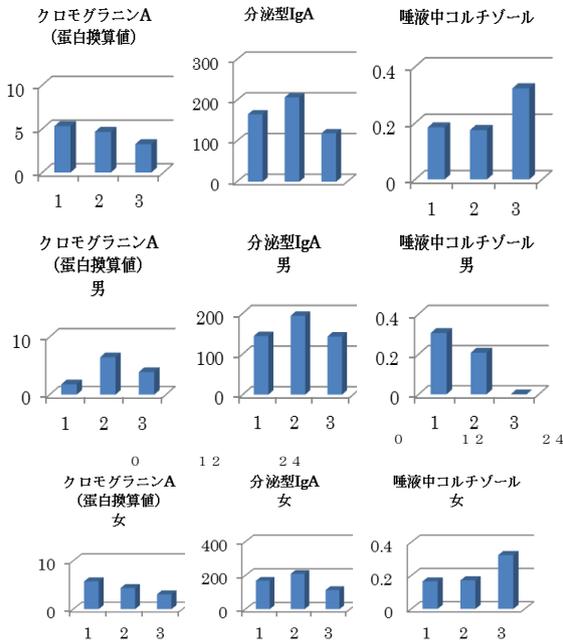


体質別にみると、70%の方が“できる”と答え、たまにできる人が 62%と多かった。男女別にみても同様の傾向であった。



1: 口内炎なし, 2: 口内炎あり

ストレスマーカーの測定では、全体でいずれも口内炎がある人に高値の傾向であったが、男女別にみると相反する傾向がみられた。統計的有意差は得られなかった。母集団が少ないことが原因と思われた。

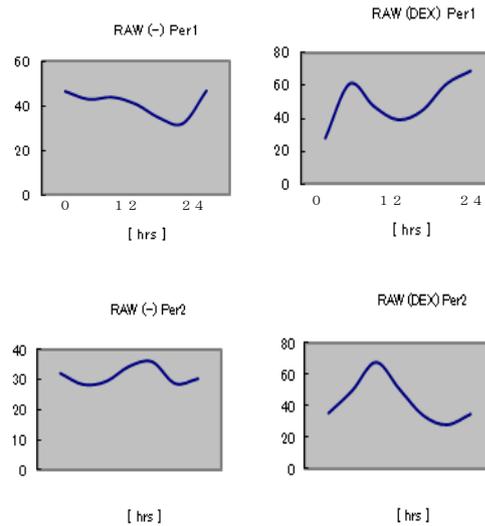


1; できにくい, 2; たまにできる, 3; よくできる

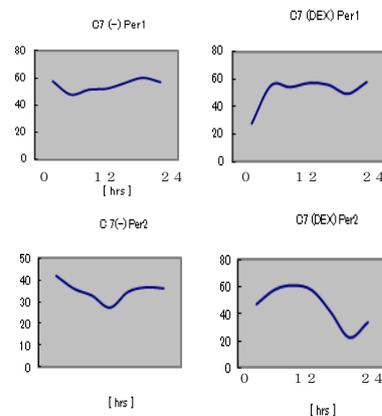
クロモグラニン A ではできやすさに相関して低値の傾向を示したが、男女別では異なるパターンであった。分泌型 IgA は“たまにできる群”で比較的高値の傾向を示した。口腔免疫能を反映していることから、興味深いパターンであった。コルチゾールは検出限界以下の値を含むため、いずれも傾向を示すのみであるが、男女別では相反するパターンを示した。全体ではよくできる人に高値の傾向であった。統計的有意差はいずれもなかったが、体質として口内炎ができやすいと感じる人に一定の特徴が示唆される結果であった。今回サンプリングした母集団が少数であったため、今後は人数を増やし、さらなる検討を進めていきたい。

まとめ；口内炎有病者には唾液中ストレスマーカーが高値傾向を示した。口内炎ができやすい人ほどクロモグラニン A が低い傾向が、またコルチゾールが高い傾向があった。分泌型 IgA は口内炎が強くてできやすいと感じる人に比較し、軽い人には高い傾向があった。

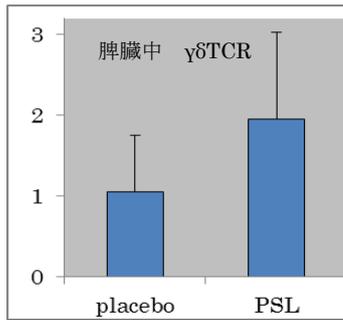
(2)



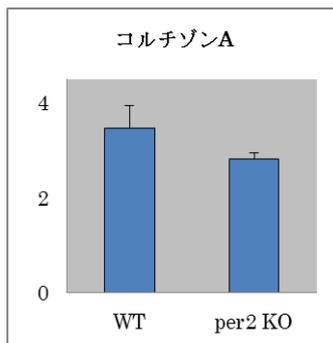
マクロファージ系の細胞株である RAW 細胞および C7 細胞を用いた、in vitro の系において、デキサメタゾン処理した後、4 時間毎に RNA を回収し 24 時間の連続サンプリングを行ったところ、未処理群と比較して時計遺伝子 per1, 2 の発現がいずれも誘導性に上昇した。このことはストレス時に誘導される HPA-axis 系の GC が、生理的サーカディアンリズムを制御する時計遺伝子 per1, 2 の発現にตอบสนองし、末梢の免疫系細胞においてもいわゆるリズムのリセット機能に関与することが示唆された。<sup>24</sup>



(3) マウス免疫細胞が GC に応答して時計遺伝子の発現を誘導することは示されたが、ヒト免疫系細胞において in vivo で応答するかを検証するために移植実験を試みた。hPBMCs は GC の投与により、脾臓内での  $\gamma \delta$  TCR 発現細胞の増加傾向が示された。統計学的有意差は得られなかった。さらなる検討を行う必要があるが、 $\gamma \delta$  T 細胞が GC によって粘膜上皮系の免疫機構にตอบสนองする可能性が示唆された。



(4) 生理的サーカディアンリズム制御系とストレス応答の HPA-axis 系との関連を検証するため per2 ノックアウトマウスを用いて、PSL 投与でのコルチゾン A の血中濃度を比較した。Per2 KO マウスでは優位にコルチゾン A の低下を認めた。時計遺伝子 per2 が欠失することで GC に応答する発現が誘導されないことから、リズムを制御するフィードバック機構に影響することが示唆された。このことは、ストレスシグナルがサーカディアンリズムに直接作用し、生理的状态に影響を及ぼすことを意味するものと思われる。



結語；本研究では口内炎のできやすい体質の程度によりストレスマーカーが変動している可能性が示唆された。ストレスに呼応して免疫細胞の時計遺伝子が応答すること、また生理的サーカディアンリズムにストレスシグナルが直接影響していることが示された。

#### 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 2 2 件)

① Sato T, Chida D, Iwata T, Usui M, Hatori K, Abe T, Takeda S, Yoda T. Non-neuronal regulation and repertoire of cholinergic receptors in organs. *BioMolecular Concepts* 2010 (in press).

② Sato T, Nakamoto N, Abe T, Fukushima Y, Tomaru Y, Sakata Y, Nakazawa M, Nakamoto A, Kawasaki H, Wada Y, Ohara H, Araki R, Tanaka

J, Yoda T. Preliminary results of a study comparing conventional radiography with phase-contrast radiography for assessing root morphology of mandibular third molars.

*Dentomaxillofac Radiol* 2010 (in press)

③ Sato T, Abe T, Chida D, Nakamoto N, Hori N, Kokabu S, Sakata Y, Tomaru Y, Iwata T, Usui M, Akio K, Yoda T. Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. *FEBS Letters* 584; 817-824, 2010. 査読有り.

④ 中本紀道, 依田哲也, 中本文, 安部貴大, 佐藤毅, 坂田康彰. 両側下顎埋伏過剰歯の抜去後に同部位に新たな過剰歯が発生した 1 例. *日本口腔外科学会雑誌* 56(9); 506-510, 2010. 査読有り

⑤ Abe T, Sato T, Tomaru Y, Sakata Y, Kokabu S, Hori N, Kobayashi A, Yoda T.

IgG4-related sclerosing sialadenitis: Report of 2 cases and review of the literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 108(4); 544-550, 2009. 査読有り.

⑥ Motosugi U, Ogawa I, Yoda T, Abe T, Sugawara M, Murata S, Yasuda M, Sakurai T, Shimizu Y, Shimizu M. Ghost cell odontogenic carcinoma arising in calcifying odontogenic cyst. *Ann Diagn Pathol* 13; 394-397, 2009. 査読有り.

⑦ Yoda T, Sato T, Abe T, Sakamoto I, Tomaru Y, Omura K, Hatano N, Takato T, Ishii Y. Long-term results of surgical therapy for masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia accompanied by limited mouth opening. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 38; 1143-1147, 2009. 査読有り.

⑧ 嶋村由美子, 安部貴大, 小林明男, 依田哲也. HTLV-1 キャリアに発症した舌癌の 1 例. *日本口腔腫瘍学会誌* 21(3); 211-216, 2009. 査読有り

⑨ Sato T, Abe T, Nakamoto N, Tomaru Y, Koshikiya N, Nojima J, Kokabu S, Sakata Y, Kobayashi A, Yoda T. Nicotine induces cell proliferation in association with cyclin D1 up-regulation and inhibits cell differentiation in association with p53 regulation in a murine pre-osteoblastic cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377; 126-130, 2008. 査読有り.

⑩ Kokabu S, Sakata Y, Sato T, Fukushima Y, Kobayashi A, Yoda T; Radiation-induced carotid artery stenosis developed in a

patient with mandibular osteoradionecrosis. Hospital Dentistry & Oral Maxillofacial Surgery 20: 131-133, 2008. 査読有り.

⑪ Imai K, Kokabu S, Abe T, Tomaru Y, Kobayashi A, Yoda T; A case of bilateral eruption cyst in an 11-month infant complicated by post-resuscitation encephalopathy. Japanese Journal of Oral Diagnosis/Oral Medicine 21:149-151, 2008. 査読有り.

⑫ Kokabu S, Sakata S, Imai K, Yosuke F, Kobayashi A, Yoda T; Two cases of oral angioedema associated with long-term angiotensin-converting enzyme inhibitors therapy. Japanese Journal of Oral Diagnosis/Oral Medicine 21: 145-148, 2008. 査読有り.

⑬ Kokabu S, Imai K, Sakata Y, Sato T, Kobayashi A, Yoda T; Mandibular alveolar bone fracture with upper airway obstruction. Hospital Dentistry & Oral Maxillofacial Surgery 20:23-25, 2008. 査読有り.

⑭ Sato T, Abe T, Ichikawa M, Fukushima Y, Nakamoto N, Koshikiya N, Kobayashi A, Yoda T. A randomized controlled trial assessing the effectiveness of professional oral care by dental hygienists. Int J Dent Hyg 6: 63-67, 2008. 査読有り.

⑮ 安部貴大, 小林明男, 今井謙一郎, 坂田康彰, 佐藤毅, 依田哲也. 自己免疫性膵炎を合併した IgG4 関連慢性硬化性顎下腺炎の 1 例. 日本口腔外科学会雑誌 54(10); 558-562, 2008. 査読有り

⑯ 嶋村由美子, 小林明男, 安部貴大, 富高優子, 福島洋介, 依田哲也. 両側に発生したガマ腫の 1 例. 日本口腔診断学会雑誌 21(2); 292-296, 2008. 査読有り

⑰ 中澤麻有子, 坂田康彰, 古株彰一郎, 福島洋介, 中本紀道, 安部貴大, 小林明男, 依田哲也. 矯正用アンカースクリューを固定源として整復した歯槽骨骨折の 1 例. 日本口腔外傷学会誌 6(1); 13-18, 2008. 査読有り

⑱ 安部貴大, 今井謙一郎, 坂田康彰, 中本紀道, 小林明男, 依田哲也. 骨破壊を呈した顎放線菌症 1 例. 日本口腔診断学会誌 21(1); 49-54, 2008. 査読有り

⑲ 安部貴大, 依田哲也, 坂本一郎, 今井英樹, 須田里香, 櫻井仁亨, 田口茂和, 今井謙一郎, 小林明男, 小村健. 紹介患者からみる顎関節症の鑑別診断に関する実態調査. 日本顎関節学会誌 19(2); 33-37, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 1 1 件)

① 堀直子: NOD-scid マウスへのゾレドロン酸投与による骨形態評価と RANKL/OPG 発現に関

する検討. 第 55 回日本口腔外科学会, 幕張, 2010. 10. 17, (ゴールドリボン賞)

② 安部貴大: ヒト末梢血単核球細胞移植マウスにおけるゾレドロン酸の影響. 第 64 回日本口腔科学会, 札幌, 2010. 6. 25, (優秀ポスター賞)

③ 安部貴大: ゴレドロン酸およびコルチコステロイド併用による RANKL/OPG への影響. 第 54 回日本口腔外科学会, 札幌, 2009. 10. 10, (ゴールドリボン賞)

④ 古株彰一郎: Smad のホスファターゼ PPM1A による BMP シグナルの抑制機構. 第 54 回日本口腔外科学会, 札幌, 2009. 10. 9, (ゴールドリボン賞)

⑤ 安部貴大: IgG4 関連疾患と考えられる自己免疫性膵炎合併ミクリッツ病の 1 例. 第 62 回日本口腔科学会, 福岡, 2008. 4. 17

[図書] (計 1 件)

① 安部貴大; 高戸毅監修, 医師・歯科医師のための口腔診療必携 - 困ったときのマニュアル・ヒント集 202 - : Q102 喉に異物を誤飲・誤嚥させたら? 133 頁, Q105 タービンなどで口唇・舌・頬粘膜・口腔底粘膜を損傷したら? 136 頁, 金原出版, 2010 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 明男 (KOBAYASHI AKIO)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60129153

### (2) 研究分担者

安部 貴大 (ABE TAKAHIRO)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20383250  
佐藤 毅 (SATO TUYOSHI)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60406494