

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791987

研究課題名（和文）

疾患動物モデルにおける唾液腺由来神経成長因子による免疫調節作用機序の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Immune Modulation by Nerve Growth Factor (NGF)
in Salivary Gland in the animal disease model

研究代表者

家森 正志 (YAMORI MASASHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90402916

研究成果の概要（和文）：

われわれの研究グループでは *H.pylori* の経口免疫において effector T 細胞の胃粘膜への浸潤の誘導や維持に唾液腺が必要であることを明らかにしている。われわれは唾液腺に多量に存在し、肥満細胞やマクロファージ、リンパ球など免疫系の細胞に作用する神経成長因子 (NGF) に注目し、唾液腺に存在する NGF の免疫調節性について経口免疫モデルを用いて解析を行って検討を行った。唾液腺摘出術 (SALX) を施行した後で経口免疫を行ってもワクチン効果は得られなかった。しかし、SALX を施行した群であっても NGF を投与したマウスではワクチン効果が得られ、経口免疫において Th 2-type 免疫応答を誘導していた。また各群のパイエル板の B 細胞、T 細胞、樹状細胞それぞれの局在を検討したところ、SALX を行ったマウスでは他のマウスとことなった細胞局在を示した。これらのことから NGF は経口免疫における粘膜免疫応答において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We reported that salivary glands (SMG) are necessary for the induction and maintenance in oral immunization. But it is unknown that what kinds of salivary factors affected in those response. The SMG produces significant quantities of nerve growth factor (NGF), and epidermal growth factor (EGF), which are secreted into the saliva and might affect immune response on the mucosal tissues and nerve endings in the gastrointestinal tract. In the present study, we demonstrated the role of salivary NGF for immune response in the gastrointestinal tract, using sialoadenectomized mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：(1)免疫・感染・炎症 (2)疾患モデル動物 (3)口腔生理学

1. 研究開始当初の背景

世界の総人口の約半数が *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) に感染している。*H. pylori* は慢性胃炎や消化性潰瘍をはじめ胃癌や胃腺種、過形成ポリープ、MALT リンパ腫など多くの良悪性疾患の原因と考えられている。*H. pylori* のゲノムの全塩基配列が決定された今日においても、多様な臨床病型、疾患予後の決定は、菌側因子のみでは説明困難である。われわれは *H. pylori* 感染性胃炎の多様性は宿主免疫反応に依存し、局所に浸潤する抗原特異的な T helper (Th) 1-type の免疫応答が胃粘膜上皮の細胞回転やアポトーシスを亢進させることを報告した (Yamori M, et al, 2004)。

口腔は 500 種を超える微生物が常在すると同時に、鼻腔とともに消化管や呼吸器への微生物の侵入する最初の入り口である。口腔内では大小の唾液腺の開口部から非特異的な抗菌因子であるリゾチームや唾液ペルオキシダーゼ、特異的抗菌因子である分泌型免疫グロブリン IgA などの抗菌因子が分泌され、生体の免疫防御の最前線となっている。粘膜組織における生体防御システムは分泌型 IgA 抗体応答を誘導成立させるにあたって重要な役割をはたす common mucosal immune system (CMIS) という全身免疫ではみられない特殊性を持っている。

2. 研究の目的

われわれの研究グループでは *H. pylori* の経口免疫 (O. I.) において effector T 細胞の胃粘膜への浸潤の誘導や維持に唾液腺が必要であることを報告した (Shirai Y, et al, 2000)。しかし、いかなる唾液由来の因子がどのようなメカニズムで宿主免疫応答を調整しているのか詳細は不明である。そこでわれわれは唾液腺に多量に存在する神経成長因子 (NGF) に注目した。NGF は末梢や中枢の神経システムに関連した細胞だけでなく、肥満細胞やマクロファージ、リンパ球など免疫系の細胞に作用することが最近報告されている。唾液腺に存在する NGF の免疫調節性についての報告は存在せず、われわれが既に開発している経口免疫モデルを用いて解析を行い、消化管におけるその作用の詳細を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

① 唾液および血清に存在する NGF 量の検討
マウスは 6 週の C57BL/6 雄マウスを用いる。I 群はコントロール抗体を投与したもの、II 群は唾液腺の摘出術 (SALX) を施行したマウ

ス、III 群は SALX を施行したマウスに NGF を投与したもの、IV 群は anti-NGF 投与したマウスとする。

NGF はマウスの顎下腺由来の 2.5S NGF とし、抗体は Rabbit anti-mouse 2.5S NGF polyclonal antibody を用いる。

各群のマウスに 1 mg 卵白アルブミン (OVA) と 5 μ g の Cholera toxin (CT) をもちいて経口免疫後に唾液中および血清中の NGF 量について ELISA を用いて検討する。

SALX したマウスに投与する NGF の投与量を検討するため投与量をそれぞれ 5ng, 10ng, 20ng とする。

② in vitro における抗体価の検討

コントロール抗体や NGF で前処置した 1×10^5 /well の splenic B 細胞を 96 穴のプレートにいれ、LPS や anti-NGF のある、なしで 1 2 日間培養し、IgG および IgA の産生量を ELISA にて測定する。

③ in vivo における OVA に特異的な抗体価の検討

各群において OVA に特異的な便中の分泌型 IgA や OVA に特異的な血清 IgG, IgG subclass について検討をおこなう。

④ パイエル板における細胞組織学的検討

各群のパイエル板を採取し B 細胞 (B220)、T 細胞 (CD3)、樹状細胞 (CD11c) の染色をおこない、各群でそれぞれの局在を検討する。BrdU 染色、TUNEL 染色を行い、それぞれの局在について各細胞について比較検討を行う。

4. 研究成果

① 経口免疫したマウスを用いて唾液中の NGF の濃度を anti-NGF 投与の有無で検討を行った。anti-NGF 投与を行ったマウスでは anti-NGF 投与をしていないマウスにくらべて唾液中の NGF の濃度は 5 分の 1 以下に低下していた。次に経口免疫による血中の NGF の濃度を検討するため 12h おきに 48h まで測定した。経口免疫したマウスの血中の NGF の濃度は 48h 後には経口免疫した唾液中の NGF の濃度のおよそ半分程度まで上昇していた。しかし SALX 行うとその上昇は認めず、48h の NGF の濃度は経口免疫をしていないマウスとほぼ同程度であった。また anti-NGF 投与を行ったマウスでも同様に 48h 経過しても NGF の上昇は認めなかった。

これらのことから、経口免疫によって血中の NGF の濃度が上昇することが明らかとなった。

NGF の投与量を検討するため、SALX

マウスにNGFをそれぞれ5ng, 10ng, 20ng投与し血中NGFの濃度を測定したところ、NGFを20ng投与することで、経口免疫した際に血中に認めるNGFの濃度と同程度になることが分かった。

②B細胞の抗体産生におけるNGFの効果について検討した。B細胞をLPSで刺激してIgGおよびIgAの抗体濃度を測定したところそれぞれ30ng/ml程度の抗体産生を認めた。anti-NGFを添加して培養したものは抗体量は半分以下に減少していた。また、NGFを添加することでそれぞれの抗体の濃度が上昇し、NGFを100ng/ml添加した群では60ng/mlまで抗体濃度の上昇を認めた。

③in vivoにおける抗原特異的な抗体価の検討を行ったところ、血中の抗原特異的なIgGの産生はSALXおよびanti-NGF投与を行ったマウスで有意に低下していた。SALXを行ってもNGFを投与することで、抗原特異的なIgGの産生は回復していた。便中の抗原特異的なIgAについて検討したところ、同様の結果であった。このことから唾液由来のNGFは抗原特異的な抗体産生に関与していることがあきらかになった。

④NGFが抗体産生にどのような形で関連しているかを検討する目的で、各群のマウスのパリエル板に注目して検討を行ったところ、SALXおよびanti-NGF投与を行ったマウスではB細胞数の低下を認めた。このことからNGFはパリエル板の細胞構成に変化を与えることで抗体産生などの免疫応答をコントロールしていることが示唆された。

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3件)

Sakata T., Yamori M., et al., A case of Aspiration Pneumonitis Upon Induction of General Anesthesia for Orthognatic Surgery. Jpn J Jaw Deform 20 : 228-233 2010

Ueno Y., Yamori M., et al., A case of erupted compound odontoma in the maxillary molar region. Jpn J Oral Diag/Oral Med 58:78-79 2010.

Takafuji H., Yamori M., et al A case of osteo chorondroma of the coronoid process Jpn J Oral Maxillofac surg. 57:25-29 2011

[学会発表] (計11件)

Asai K., Yamori M., et al., Association between Oral Health and Risk Factor of Hypertension among Australian Aboliginals Revealed by a Pilot Epidemiological Study 23nd Scientific Meeting of International Society of Hypertension Vancouver, 2010. 9. 26-30

Asai K., Yamori M., et al., Association between Oral Health and Risk Factor of Hypertension among Australian Aboliginals Revealed by a Pilot Epidemiological Study the International Symposium of Kyoto University Grobal COE. Awaji2010. 11. 5-6

田中絵美 家森正志 他 ビスフォスフォネート関連顎骨壊死患者の口腔衛生状態の評価 第54回日本口腔外科学会総会 H21. 10. 9

山崎亨 家森正志 他 当院乳腺外科における注射用ビスフォスフォネート製剤投与患者を対象とした後ろ向き研究 第63回日本口腔科学会総会 H21. 4. 16

浅井啓太 家森正志 他 人工化関節置換術が必要であったビスフォスフォネート関連顎骨壊死患者の2例 第55回日本口腔外科学会総会 H22. 10. 16

山崎亨 家森正志 他 当院における抜歯後顎骨壊死発生に関する統計学的検討：コホート研究 第55回日本口腔外科学会総会 H22. 10. 16

浅井啓太 家森正志 他 オーストラリア先住民の口腔疾患と生活習慣病に関するJAPAN-AUSTRALIA HEART studyにおけるパイロット研究 第64回日本口腔科学会総会 H22. 6. 23

高未来 家森正志 他 鼻咽腔閉鎖機能不全を伴った唇顎口蓋裂患者に対して上顎骨延長術を行った1例 第20回日本顎変形症学会 2010. 6. 15

家森正志 高藤洋之 他筋突起に生じた骨軟骨腫により開口障害を生じた1例 第41回日本口腔科学会近畿地方会 2010. 6. 19

中田雅代 家森正志 他 片側性唇顎口蓋裂患者におけるNAM床による術前顎矯正治療効果の検討 第22回日本口腔科学会近畿地方会 2010. 11. 27

山崎亨 家森正志 他 病的骨折を伴うビス
スフォスフォネート関連顎骨壊死患者の治
療経験 第 22 回京都府歯科医学大会
2010.2.21

[その他]
ホームページ等

http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~oral_surg/Oral_Surg_index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家森 正志 (YAMORI MASASHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90402916