

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792346

研究課題名(和文) Toll-like receptor を介した難治性口腔粘膜疾患発症機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of oral mucosal inflammatory disease developing mechanism via Toll-like receptor

研究代表者

西 裕美 (Nishi, Hiromi)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：70403558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜上皮細胞，線維芽細胞は病原体の侵入に対して宿主免疫応答を惹起すると考えられる。しかしながら口腔粘膜細胞における微生物の特異的分子パターンによる炎症性蛋白の発現や口腔粘膜炎症性疾患との関与は不明である。本実験において口腔粘膜細胞がToll-like receptor (TLR)を発現し，TLR agonists によってIL-8やCXCL10といった炎症性ケモカインを発現誘導することが明らかになった。口腔粘膜上皮細胞，線維芽細胞による微生物の病原体分子パターンによる認識は，炎症性ケモカインの発現誘導を介した宿主防御応答と口腔粘膜炎症性疾患の増悪に重要な役割をしている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Oral keratinocytes and fibroblasts may augment host defense and inflammatory responses against oral microorganisms invasion. However, it remains unclear whether oral keratinocytes and fibroblasts produce specific inflammatory proteins in response to Pathogen-associated molecular patterns (PAMP S) and associated with oral mucosal inflammatory diseases. Our results showed that oral keratinocytes and fibroblasts expressed mRNA of TLRs 1-10. IL-8 and CXCL10 production from oral keratinocytes and fibroblasts was induced by treatment with various TLR agonists. These findings suggest that recognition of microorganism-derived pathogen in oral keratinocytes and fibroblasts by TLR may have important role to orchestrate host immune responses and promoting hyper/hypo reactions related to oral inflammatory diseases via production of various chemokines.

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔粘膜炎症性疾患 口腔粘膜上皮細胞 歯肉線維芽細胞 Toll-like receptor

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜を構成する上皮細胞，線維芽細胞は病原性微生物の付着，侵入に対して防御的な自然免疫機能を有する一方で，炎症性生理活性物質を分泌し，炎症の惹起に積極的な役割を果たしていると考えられている．しかしながら細菌，ウイルス由来の特異的病原体の付着，侵入に対する口腔粘膜上皮細胞，線維芽細胞の免疫応答と炎症性口腔粘膜疾患の発症に関するについては明らかにされていない．

一方，Toll-like receptor (TLR) は病原体に特有な構造(pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs)を認識する膜タンパク質であり，自然免疫応答に関与する．ヒトにおいてはTLR1からTLR10が同定されている．TLRがPAMPsを認識すると細胞内シグナルが生じ，炎症性遺伝子が誘導されると報告されている．

しかしながら口腔粘膜におけるTLRを介した病原体認識や炎症性遺伝子誘導機構には不明なことが多い．

2. 研究の目的

今回，我々は，口腔粘膜細胞のPAMPs認識とTLRを介した炎症性遺伝子誘導機構を検討するため，口腔粘膜上皮細胞，線維芽細胞のTLRの発現とによるTLRを介した炎症性ケモカインの発現誘導を検討した．

3. 研究の方法

1) 用いた細胞

細胞はhTERT遺伝子を導入することによって不死化させた口腔粘膜上皮細胞RT7と歯肉線維芽細胞GT1を用いた．RT7は表皮角化細胞用増殖培地，GT1は10%血清含有ダルベッコ改変イーグル培地で培養を行った．

2) TLR mRNA の発現解析

コンフレンスにしたRT7,GT1よりmRNAを抽出し，cDNAを作製，RT-PCR法によってTLR1-10 mRNAの発現を検討した．さらに正常口腔粘膜上皮から樹立した上皮細胞，線維芽細胞よりmRNAを抽出し，同様の検討を行っ

た．

3) 炎症性サイトカインによるTLRの発現誘導

RT7, GT1をIFN- γ , TNF- α を添加し12時間後の，mRNAを抽出，Real-time PCR法によってmRNAの発現の増加を検討した．

4) PAMPsによるケモカイン mRNA, 蛋白の発現誘導

TLR agonistsである特異的細菌由来成分(Pam3CSK4 (TLR1/2), poly I:C (TLR3), *Escherichia coli* lipopolysaccharide, LPS (TLR4), Flagellin (TLR5), Macrophage-activating lipopeptide, MALP-2 (TLR2/6) and CpG motif oligodeoxynucleotide, CpG-ODN (TLR9)を添加し12時間後の，mRNAを抽出，Real-time PCR法によってIL-8, CXCL10 mRNAの発現の増加を検討した．さらに同様にTLR agonistを添加し，48時間後，上清を採取し，IL-8, CXCL10蛋白の定量をELISA法を行った．

5) 炎症性サイトカインで誘導されるケモカイン蛋白に対するPAMPsの影響

RT7, GT1にPAMPs, TNF- α を同時添加し，48時間後，上清を採取し，IL-8, CXCL10蛋白の定量をELISA法を行った．

4. 研究成果

1) TLR mRNA の発現解析

RT7, GT1, 正常歯肉上皮細胞，線維芽細胞において定常的なTLR1-10 mRNAの発現が認められた．

2) 炎症性サイトカインによるTLRの発現誘導

RT7, GT1は各種TLRはTNF- α , IFN- γ により異なる発現の増加を示したが，特にTNF- α は非添加時の細胞と比較して約2-10倍と様々なTLRの発現を誘導した．

3) PAMPsによるケモカイン mRNA, 蛋白の発現誘導

IL-8のmRNA, 蛋白の発現を検討した結果 RT7で Pam3CSK4, Poly I:C, *E. coli* LPS,

Flagellin, MALP-2, CpG-ODN の添加によって IL-8 mRNA, 蛋白 の増加が認められた (Figure.1) . GT1 においては Pam3CSK4, poly I:C, *E.coli* LPS, Flagellin, MALP-2 の添加によって IL-8 mRNA, 蛋白 の増加が認められた . 一方, CXCL10 の mRNA, 蛋白の発現を検討した結果, RT7 で Poly I:C, Flagellin, の添加によって CXCL10 mRNA, 蛋白 の増加が認められた (Figure.1) . GT1 においては Pam3CSK4, Poly I:C, *E.coli* LPS, Flagellin の添加によって CXCL10 mRNA, 蛋白の増加が認められた .

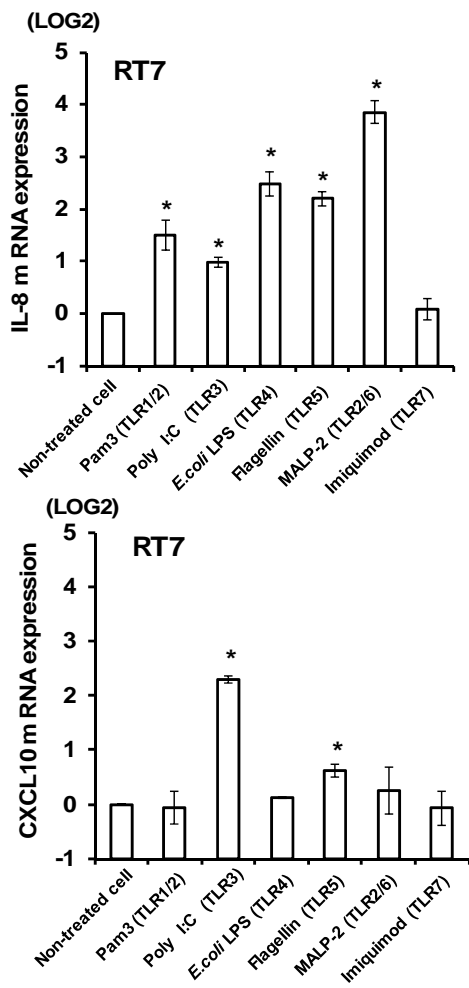


Fig1. RT7 における TLR agonists による IL-8, CXCL10 mRNA の発現誘導

4) 炎症性サイトカインで誘導されるケモカイン蛋白に対する PAMPS の影響

TNF- α と TLR agonists を同時添加すること Pam3CSK4, Poly I:C, LPS, Flagellin, MALP-2 は TNF- α で誘導される IL-8 の発現

誘導を増加した (Figure.2) . Pam3CSK4, Poly I:C は両細胞の TNF- α で誘導される CXCL10 の発現誘導を増加した . CpG-ODN は RT7 において TNF- α で誘導される CXCL10 の発現を増加したが, GT1 における TNF- α で誘導される CXCL10 の発現を減少した .

今回の研究の成果から口腔粘膜上皮細胞 線維芽細胞が TLR1-10 を発現していること . TLR を介して PAMPS を認識して炎症性ケモカインを認識すること, また PAMPS が TNF- α で誘導される炎症性ケモカインの発現を相加 相乗的に増大することが示された . これらの結果から口腔粘膜上皮細胞 線維芽細胞による微生物の病原体分子パターンによる認識は 炎症性ケモカインの発現誘導を介した宿主の防御応答と口腔粘膜炎症性疾患の増悪に重要な役割をしている可能性がある .

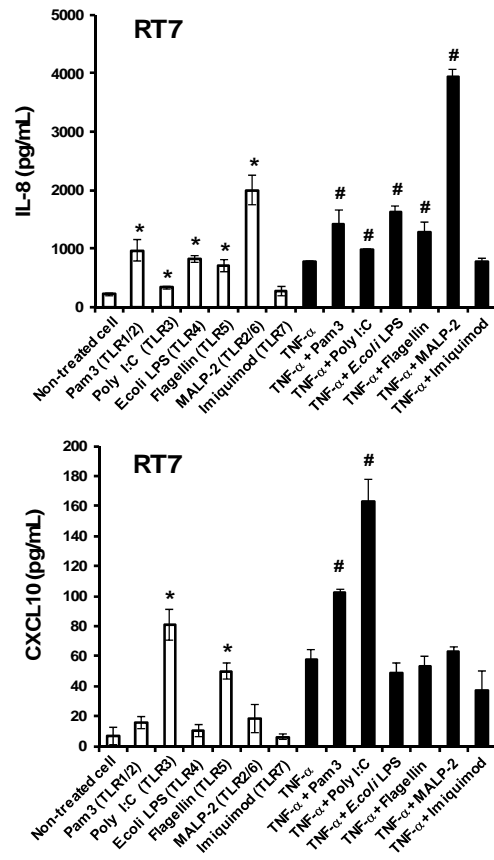


Fig2. RT7 における TNF- α で誘導される IL-8, CXCL10 の発現誘導に対する TLR agonists の影響

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)

1) Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated IL-8 production by human submandibular gland epithelial cells.

Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Mizuta K, Nishi H, Takechi M, Kamata N

Mol Med Rep. accepted. (査読あり)

2) Itraconazole inhibits TNF- α -induced CXCL10 expression in oral fibroblasts.

Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Nishi H, Naruse T, Takechi M, Kamata N. Oral Dis. 2014.

doi: 10.1111/odi.12226. (査読あり)

3) Interleukin-8 and CXCL10 expressions in oral keratinocytes and fibroblasts via Toll-like receptors.

Fukui A, Ohta K, Nishi H, Shigeishi H, Tobiume K, Takechi M, Kamata N. *Microbiol Immunol* 57:198-206,

2013. (査読あり)

[学会発表](計12件)

1) 口腔粘膜上皮細胞における *Candida*

albicans β -glucan による酸化ストレスと Hemeoxygenase-1 の発現誘導: 石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 鳴瀬貴子, 武知正晃, 鎌田伸之: 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念大会・総会(2013. 11.23 東京)

2) 口腔粘膜上皮細胞における *Candida*

albicans β -glucan による Hemeoxygenase-1 の発現誘導: 石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 鳴瀬貴子, 武知正晃, 鎌田伸之: 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会(2013. 10.12 福岡)

3) 口腔粘膜上皮細胞における *Candida*

albicans β -glucan による Hemeoxygenase-1 の発現誘導と酸化ストレスに対する防御応答: 石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 鳴瀬貴子, 武知正

晃, 鎌田伸之: 第 23 回口腔内科学会・第 26 回口腔診断学会 合同学術大会(2013. 9.13 東京)

4) 口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* による Hemeoxygenase-1 の発現誘導:

石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 鳴瀬貴子, 武知正晃, 鎌田伸之: 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術大会(2013.5.22 宇都宮)

5) 歯肉線維芽細胞における炎症性ケモカイン発現誘導に対するアゾール系抗真菌剤イトコナゾールの抑制作用の検討:

石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 武知正晃, 鎌田伸之: 第 49 回日本口腔組織培養学会学術大会(2012.11.17 広島)

6) 歯肉線維芽細胞の炎症性ケモカイン発現誘導に対するイトコナゾールの抑制作用の

検討: 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 石田陽子, 武知正晃, 鎌田伸之: 第 25 回日本口腔粘膜学会・第 22 回日本口腔粘膜学会合同学術大会(2012. 9.20 東京)

7) 口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞における抗真菌剤イトコナゾールの抗炎症作用の検

討: 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 石田陽子, 武知正晃, 鎌田伸之: 第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2012. 5.17 広島)

8) 口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞における RIG-I シグナルの機能解析: 福井暁子, 太田耕司, 重石英生, 西裕美, 武知正晃, 鎌田伸之: 第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会(2011. 10.22 大阪)

9) Expression and function of Retionic acid-inducible gene-1 (RIG-I) in oral

keratinocyte and fibroblast: Fukui A, Ohta K, Shigeishi H, Nishi H, Takechi M, Kamata N: 4th Hiroshima Conference on Education and science in Dentistry (2011. 10.10 Hiroshima)

10) 口腔粘膜上皮細胞，歯肉線維芽細胞における Toll-like receptor を介した炎症性ケモカインの発現誘導：太田 耕司，福井 暁子，西 裕美，重石 英生，武知 正晃，鎌田 伸之：第 21 回日本口腔粘膜学会総会・学術大会(2011. 9.24 鹿児島)

11) 口腔粘膜上皮細胞，歯肉線維芽細胞における RIG-I の発現とシグナル伝達経路の機能解析：福井 暁子，太田 耕司，重石 英生，西 裕美，武知 正晃，鎌田 伸之：第 21 回日本口腔粘膜学会総会・学術大会(2011. 9.24 鹿児島)

12) 口腔粘膜上皮細胞，歯肉線維芽細胞における RIG-I を介した炎症性ケモカインの発現とシグナル伝達経路の解析：福井 暁子，太田 耕司，重石 英生，西 裕美，武知 正晃，鎌田 伸之：第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2011. 4.21 東京)

6. 研究組織

研究分担者 西 裕美 (Nishi, Hiromi)
広島大学・病院・助教
研究者番号：70403558