

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792426

研究課題名(和文) ダウン症候群の早期発症型歯周炎における Toll 様受容体シグナルの解析

研究課題名(英文) Analysis of Toll-like receptor signaling in Down syndrome with early onset periodontitis

研究代表者

村上 旬平 (MURAKAMI, Jumpei)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70362689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群では若年から重度の歯周病になりやすい。この早期発症型歯周炎の発症メカニズムを明らかにするため、ダウン症候群の人の歯肉細胞の表面にある感染防御に必要な Toll 様受容体とその働きについて調べた。その結果、ダウン症候群ではこの Toll 様受容体がいつも多く発現したり、受容体の反応が通常より過剰であることが分かり、免疫が過剰になっている可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Early onset periodontitis is likely to develop in young persons with Down syndrome. Toll-like receptors(TLR), which initiate key inflammatory responses, and their signaling was investigated in gingival cells derived from persons with Down syndrome. More TLRs and TLR signal molecules are expressed in the cells from Down syndrome than from non-Down syndrome. It seems that overreaction on immune system in Down syndrome is associated with early onset periodontitis.

研究分野：矯正小児系・歯学

科研費の分科・細目：小児歯科学

キーワード：ダウン症候群 歯周炎 TLR

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群では、10代で早期に歯周病に罹患し、30代までに急速に進行して歯の喪失につながるが多かった。近年の医学の進歩によりダウン症候群の平均寿命は、延長し50~60代のダウン症候群の人も増加している。口腔ケアの意識の高まりによって、家庭でのブラッシングや早期からの歯科受診によって、30代での歯の喪失は減少した。しかし40代以降の歯周疾患の進行は現在も生じている。この原因としてダウン症候群にみられる早期老化現象、免疫不全や小児期より歯周病原細菌のひとつである *Porphyromonas gingivalis* が定着することなどが報告されているが、これまでにダウン症候群の早期発症型急速進行性歯周炎の発症メカニズムは分かっていない。

これまでダウン症候群由来歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞を、歯周病原細菌 *P. gingivalis* のリポ多糖 (LPS) で刺激したときに、自然免疫に関係する Toll 様受容体 (TLR) 2 と炎症性サイトカイン (IL-6、IL-8) の発現が増加することがわかった。このことから、ダウン症候群由来細胞と非ダウン症候群由来細胞との間に、歯周炎における自然免疫系の違いが存在することが明らかになった。このことから自然免疫系の反応がダウン症候群の歯周疾患に関連しているのではないかと考えた。しかし、これまでダウン症候群の歯周組織の TLR やそのシグナルについて詳細に検討されたことはなく、歯周炎との関連やその動態は不明であった。

2. 研究の目的

ダウン症候群における早期発症型歯周炎のうち、TLR を介した発症メカニズムについて明らかにするため、ダウン症候群由来歯肉線維芽細胞および非ダウン症候群由来歯肉線維芽細胞における TLR 分子および TLR シグナル分子の発現 (図1) を解析する。

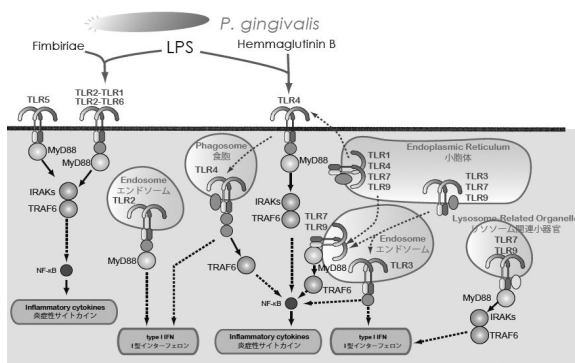


図1 TLR系を介する *P. gingivalis* 関連分子の認識機構

3. 研究の方法

SV40 largeT 抗原遺伝子をトランスフェクションすることにより、ダウン症候群由来歯肉上皮細胞の長期培養可能株 DS-HGE を作成した。

ダウン症候群由来歯肉上皮細胞 DS-HGE および非ダウン症候群歯肉上皮細胞 NOR-HGE に対し、50 μg/ml *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激による TLR 分子および TLR シグナル分子の発現を RT-PCR 法にて以下の手順で解析した。

P. gingivalis LPS を最終濃度 50 μg/ml で添加

0, 6, 12 および 24 時間後
Trypsin-EDTA にて細胞を回収

QuickGene-800 (FUJIFILM) による totalRNA 抽出

PrimeScript® 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) で逆転写

特異的プライマー (GAPDH, TLR1-10 および TLR シグナルの MyD88, TRAF6, IRAK1 および IRAK4) による PCR

Scion Image によるバンド解析

4. 研究成果

ダウン症候群由来歯肉上皮細胞の長期培養可能株の作成
通常継代不可能であったダウン症候群歯肉上皮細胞を7代培養することに成功した。

TLR 分子の発現変化 (表1)
DS-HGE および NOR-HGE において LPS 非添加時および添加後 12 時間後の TLR1-10 の各分子発現を調査した。

- (1) LPS を添加しないときの TLR 分子発現
NOR-HGE では TLR1 が常時発現していたが、DS-HGE では TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR9

表1 各 TLR 分子の mRNA 発現

TLR	LPS 非添加		LPS 添加 12 時間後	
	NOR	DS	NOR	DS
1	+	+	+	+
2	-	+	+	+
3	-	-	-	-
4	-	+	+	+
5	-	-	+	+
6	-	-	-	-
7	-	+	+	+
8	-	-	-	-
9	-	+	+	+
10	-	-	-	-

-: 検出せず, +: 検出

が常時発現していた。

- (2) *P. gingivalis* LPS 添加時の TLR 分子発現
 NOR-HGE では TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 および TLR9 は発現した。
 DS-HGE においても TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 および TLR9 が発現していた。

TLR シグナル分子の発現変化

MyD88, TRAF6, IRAK1, IRAK4 発現について調査した。

- (1) LPS を添加しないときの TLR シグナル分子発現(表 2)
 NOR-HGE では IRAK1 と TRAF の常時発現を確認した。
 DS-HE では MyD88, IRAK1 および TRAF6 が常時発現していた。

表 2 LPS 非添加時の TLR シグナル分子発現

	NOR	DS
MyD88	-	+
IRAK1	-	+
IRAK4	-	-
TRAF6	+	+

—: 検出せず, +: 検出

- (2) *P. gingivalis* LPS 添加時の TLR 分子発現 (図 2)
 NOR-HGE では IRAK1 および TRAF の発現が継続していたが、発現量に差はなかった。
 DS-HGE では MyD88, IRAK1, TRAF6 の発現を確認し、IRAK1, TRAF6 は有意に発現量が増加することが分かった。

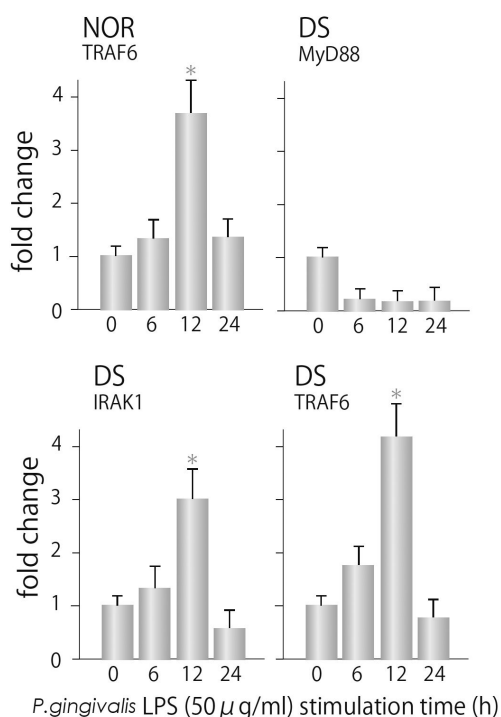


図 2 LPS 非添加時の TLR シグナル分子の mRNA 発現

以上のことから、ダウン症候群由来上皮細胞では、非ダウン症候群由来の細胞と比較して、多くの TLR 分子および TLR シグナル分子が mRNA レベルで恒常的に発現していることが明らかとなった。

また *P. gingivalis* LPS を添加したときには、主に細菌成分に反応する TLR 群である TLR1, TLR2, TLR4 が両由来細胞において発現していた。しかし、ダウン症候群由来細胞と非ダウン症候群由来細胞では、TLR 分子発現および TLR シグナル発現とも異なる結果となった。

ダウン症候群由来細胞では、数多くの TLR 分子が恒常発現していたことから、自然免疫系の亢進とその常態化が生じている可能性を示している。すなわち本研究において、ダウン症候群における早期発症型歯周炎の発症やその病態に自然免疫系の異常が関与する可能性が示された。

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 1 件)

Murakami J, Terao Y, Morisaki I, Hamada S, Kawabata S. Group A Streptococcus Adheres to Pharyngeal Epithelial Cells with Salivary Proline-rich Proteins via GrpE Chaperone Protein. J Biol Chem. 287: 22266-75, 2012. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

齋藤 知子, 村上 旬平ほか. ヒト歯肉由来線維芽細胞における ATP および炎症性サイトカイン発現に対するニフェジピン添加の影響 第 30 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2013/10/12-13, 神戸.

村上 旬平ほか. 歯肉線維芽細胞への *Porphyromonas gingivalis* 付着・侵入におけるニフェジピン添加の影響. 第 29 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2012/9/29, 札幌.

村上 旬平ほか. ダウン症候群由来の歯肉上皮細胞における Toll 様受容体とシグナル分子の発現. 第 28 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2011/11/6, 福岡.

〔図書〕(計 1 件)

村上 旬平. 第 4 章障害の分類と特徴 - 2. 知的障害(精神遅滞)の口腔の特徴. pp29-34. 5. 精神障害と口腔所見. pp49-55. 歯科衛生士講座 障害者歯科. 緒方克也, 柿木保明 編集主管. 一戸達也, 白川哲夫, 關田俊介, 筒井睦, 弘中祥司, 八若保孝 編集. 総 185 ページ. 株式会社 永末書店. 京都. 2014 年 3 月.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村上 旬平 (MURAKAMI Jumpei)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70362689