

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390422

研究課題名(和文) T細胞免疫応答型口腔粘膜疾患の進行機序の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of T cell-mediated immune disorders in oral mucosa

研究代表者

大野 純 (Ohno, Jun)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10152208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：lupus型およびsatellitosis型におけるエフェクター細胞の上皮親和性機構について検討した。lupus型では、classIIおよびED1陽性マクロファージ群がエフェクター細胞として関与し、局所でのTh2免疫応答を展開した。一方、Th1型免疫応答により誘導されるsatellitosis型病変でのエフェクター細胞であるCD8陽性T細胞は、細胞表面にマンノースを発現して上皮親和性を展開していることが示唆された。エフェクター細胞の性状が上皮親和性機構を制御することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In oral mucosal lesions developed by mercury-induced autoimmune response, MHC classII- and ED1-positive macrophages infiltrated into the basement membrane (BM) zone of surface epithelium. A lupus-band was observed in the oral epithelial BM in addition to renal glomeruli. Local autoimmune responses may be involved in the pathogenesis of lupus-like lesions of the oral mucosa. In the satellitosis-typed oral mucosal lesions developed by systemic graft-versus-reaction, binding of mannose (Man)-specific LCA lectin expanded to the epithelial layers. An expansion of LCA binding was related to the increased expression of mannosyltransferase in the oral mucosa. Effector cells of the satellitosis-typed lesions expressed Man-binding protein (MBP) and migrated to the medium containing Man. These results suggest that the migration and/or adhesion of effector cells in the epithelium may be mediated in part by the MBP/Man-binding pathway during the development of satellitosis-typed lesions.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔粘膜疾患 T細胞 上皮親和性 マクロファージ 自己免疫応答 エフェクター細胞

1. 研究開始当初の背景

T細胞免疫応答に関連した口腔粘膜疾患は、エフェクター細胞の上皮組織への侵襲様式により、satellitosis型、lichenoid型とlupus型(抗基底膜自己抗体沈着と同部へのエフェクター細胞浸潤)の3型に分類される。病変の発症および進行機序は、病変の特徴であるエフェクター細胞の上皮親和性機構が重要である。そして、免疫応答型口腔粘膜病変は期(Initiation: 病変局所における免疫応答の発現、肥満細胞の活性化)、期(Homing: エフェクター細胞の上皮指向性)および期(Targeting: 基底膜の破壊、上皮細胞とエフェクター細胞の接着)の3ステップを経て進行することが推測される。lupus型病変は明らかに自己免疫関連の免疫応答が関与することが明らかである。しかしながら、その他の病変においては、自己免疫応答が病変発症に関与するかは、明らかにされていないが、それぞれの病変発症に関与する病変局所での免疫応答について検討しなければならない。さらに、それらの免疫応答を誘導する因子について明らかにしなければならない。期においては、エフェクター細胞の上皮指向性に関与するケモカインなどを因子が明らかにされていない。同様に、それらの走化性に関与するレセプターについても不明である。最後に期については、上皮指向性を示すエフェクター細胞が上皮組織内に進入する病態を説明しなければならない。上皮組織への進入は、上皮基底膜(BM)である。したがって、BM破壊機序についての検討が必要である。具体的なBM破壊への候補としては、プロテアーゼなどの関与が考えられる。次に、期においては上皮内に進入したエフェクター細胞と上皮細胞との相互作用を明らかとすることが必要である。すなわち、エフェクター細胞による上皮細胞への傷害細胞は、エフェクター細胞の上皮細胞への接着から、細胞死の誘導とのステップによると考えられる。したがって、上皮細胞への接着および細胞死の誘導機構の検索が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、3型の免疫応答型口腔粘膜病変モデルを作製して、前述した病変の発症および進行ステップを明らかにすることである。具体的には、1)各病変の発症への自己免疫応答の関与をTh2型サイトカイン発現および自己抗体沈着の有無および2)各病変におけるエフェクター細胞の上皮指向性機序を検討した。

3. 研究の方法

1)各型口腔粘膜病変の動物モデル作製: satellitosis型およびlichenoid型口腔粘膜病変モデルは、P-F1セミアロ・リンパ球移入移植片宿主反応(GVH反応)を応用して作成する。lupus型病変は、水銀に感受性である

BNラットの皮下に塩化水銀を頻回投与して作製する。

2)各口腔粘膜病変の病理組織学的検討

3)自己免疫応答発現の検討: (1)血清抗核抗体試験(HEp-2細胞テスト)、(2)抗基底膜抗体試験、(3)Lupus-band test (immune complex沈着性の判定)

4)病変部でのサイトカインおよびケモカインの組織発現

4. 研究成果

1) Lupus型口腔粘膜病変における局所免疫応答とエフェクター細胞の動態

(1)免疫担当細胞の分布様式による口腔粘膜病変の程度分類: 非投与コントロール群においては、classII陽性のランゲルハンス細胞(LC)、樹状細胞(DC)およびマクロファージが上皮基底細胞層および粘膜固有層に少数分布した。ED1陽性マクロファージは、粘膜固有層および粘膜下層に散在性に認められた。T細胞(CD5)は、ごくわずかに粘膜固有層に分布した。水銀投与後4~5日(phase I)では、MHC class II陽性細胞が上皮直下固有層に浸潤する傾向がみられた。ED1陽性マクロファージもコントロールと比較すると増加した。T細胞に関しては、浸潤程度に変化はみられなかった。phase IIにおいては、T細胞以外の免疫担当細胞は、浸潤程度の増強がみとめられた。水銀投与12日以降のphase IIIでは、class IIおよびED1陽性細胞は、上皮基底膜に付着するように浸潤し、浸潤細胞数も増加した。一方、T細胞はこのphase IIIにおいて、上皮直下固有層に限局性に浸潤する傾向がみられた(図1)。

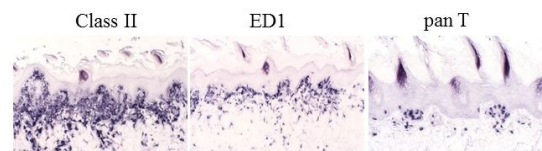


図1 phase IIIでの免疫担当細胞の分布様式 (2)口腔粘膜病変局所におけるIL-4 mRNAの局所発現: 水銀病ラットの標的臓器では、Th2型免疫応答が誘導することが知られている。口腔粘膜病変においても、phase Iからphase IIIでIL-4mRNA発現がreal-time RT-PCR法にて確認された。Th1型免疫応答に関与するinterferon-gamma(IFN-g)は、phase IIIで発現が認められた(図2)。

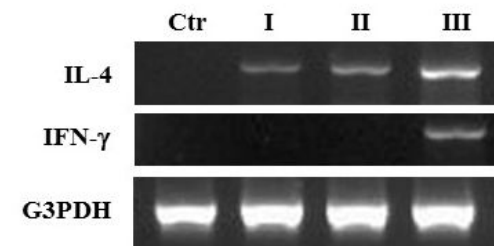


図2 各 phase 口腔粘膜病変でのサイトカイン発現

(3)水銀病ラット血清中の自己抗体産生:

HEp-2細胞を用いて、水銀病ラット血清中には、ANAが検出された。また、コントロールラット腎臓および舌凍結切片に実験群ラットの血清を反応させた間接免疫蛍光法を行った。その結果、腎臓の糸球体毛細血管および口腔粘膜上皮基底膜に線状の蛍光性を認めた。この結果は、水銀病ラット血清中には、ANAおよび抗基底膜自己抗体が産生されていることが明らかとなった。

(4) 口腔粘膜病変の上皮基底膜でのlupu-band反応：水銀誘発自己免疫疾患モデルの特徴として、腎臓糸球体に免疫複合体(IC)の沈着が知られている。そこで、lupus-band test(LBT)により、口腔粘膜病変でのIC沈着を検討した。phase I病態においては、明らかなLBTは腎臓および口腔粘膜でみられなかった。しかし、病変が進行するにつれて基底膜でのIC蛍光性が明瞭となった。phase IIIでは、腎臓糸球体および口腔粘膜基底膜部において、明瞭なlupus-bandを認めた(図3)。

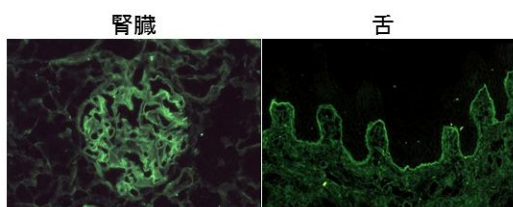


図3 腎臓および舌でのLBT

以上の結果から、水銀投与により誘導される全身性自己免疫疾患による口腔粘膜病変は、lupus様自己免疫疾患であることが明らかとなった。本病変の発症には、class IIあるいはED1陽性マクローファージがエフェクター細胞として関与することが示唆された。本研究の成果は、BCM Immunol(2013)に掲載された。

2) satellitosis型口腔粘膜病変におけるエフェクター細胞の性状

移植片対宿主(GVH)反応によるsatellitosis型口腔粘膜病変でのエフェクター細胞であるT細胞の上皮親和性機構の一部は、ICAM-1/LFA-1接着経路を利用することを報告した(Ohno J et al Histol Histopathol 2011)。本研究では、病変部上皮細胞における細胞表面の糖鎖構造変化を検討した。

(1) satellitosis型口腔粘膜病変でのLCA結合性：全身性GVH反応による口腔粘膜病変部では、粘膜上皮細胞でのICAM1発現に伴い、CD8陽性T細胞が上皮内に浸潤する病態を示した。病変部上皮細胞ではマンノース(Mann)特異的なLCAレクチンが、棘細胞層にまで発現が拡張することが明らかとなった(図4)。

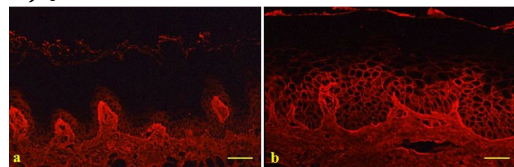


図4 LCA発現(a:コントロール, b:病変)

また、病変部上皮組織においてはmannosyltransferase complexが発現することを確認した。この結果は、LCAレクチンで確認された病変部でのMan発現範囲の拡張は、mannosyltransferaseによる可能性が示唆された。

(2) エフェクター細胞でのMBP発現：病変の特徴である上皮親和性を示すCD8陽性エフェクター細胞は、Man結合タンパク(MBP)を発現することが免疫組織化学およびwestern blotting法で確認した。Transwell migration assayおよびStamper-Woodruff binding assayにより、病変部上皮細胞でのMan発現とエフェクター細胞でのMBP発現が、病変の発症・進行に関与することが明らかとなった。本研究の成果は、BCM Oral Health(2014)に掲載された。

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9件)

Yamaguchi Y, Ohno J*, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. BMC Biotechnol 14:105, 2014. DOI: 10.1186/s12896-014-0150-9. *corresponding author. (査読有)

Toda M, Ohno J*, Shinozaki Y, Ozaki M, Fukushima T. Osteogenic potential for replacing cells in rat cranial defects implanted with a DNA/protamine complex paste. Bone 67: 237-245, 2014. DOI:10.1016/j.bone.2014.07.018. *corresponding author. (査読有)

Shinozaki Y, Toda M, Ohno J, Kawaguchi M, Kido H, Fukushima T. Evaluation of bone formation guided by DNA/protamine complex with FGF-2 in an adult rat calvarial defect model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 102: 1669-1676, 2014. DOI: 10.1002/jbm.b.33143. (査読有)

Hanada H, Ohno J*, Seno K, Ota N, Taniguchi K. Dynamic changes in cell-surface expression of mannose in the oral epithelium during the development of graft-versus-host disease of the oral mucosa in rats. BMC Oral Health 14:5, 2014. DOI: 10.1186/1472-6831-14-5. *corresponding author. (査読有)

Ota N, Ohno J*, Seno K, Taniguchi K, Ozeki S. In vitro and in vivo expression of aldehyde dehydrogenase 1 in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol 44: 435-442, 2014. DOI: 10.3892/ijo.2013.2188. *corresponding author. (査読有)

Seno K, Ohno J*, Ota N, Hirofuji T, Taniguchi K. Lupu-like oral mucosal lesions in mercury-induced autoimmune response in Brown Norway rats. BMC Immunol 14:47, 2014. DOI: 10.1186/1471-2172-14-47. *corresponding author.

(査読有)

Mori N, Ohno J, Sakagami R, Hayakawa T, Fukushima T. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 101: 743-751, 2014. DOI: 10.1002/jbm.b.32877. (査読有)

Ozasa R, Ohno J*, Iwahashi T, Taniguchi K. Tumor-induced lymphangiogenesis in cervical lymph nodes in oral melanoma-bearing mice. J Exp Clin Cancer Res 31: 83, 2012. DOI: 10.1186/1756-9966-31-83. *corresponding author. (査読有)

Kawaguchi M, Yamazaki J, Ohno J, Fukushima T. Int J Nanomedicine 7:4363-4371, 2012. DOI: 10.2147/IJN.S34202. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

萩尾佳那子、大野 純、山口真広、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄 「LPS 刺激によるヒトケラチノサイトでのオートファジー誘導」 第 141 回日本歯科保存学会・秋期学術大会 2014 年 11 月 29 日 大阪

大野 純、瀬野恵衣、谷口邦久 「T 細胞免疫応答型口腔粘膜病変におけるエフェクター細胞の上皮親和性機構」 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 25 日 広島

瀬野恵衣、大野 純、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄 「ラット歯肉炎モデルでの免疫応答 なぜ臨床的態度にちがいができるのか？」 第 140 回日本歯科保存学会・春期学術大会 2014 年 6 月 19 日 大津

瀬野恵衣、大野 純、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄 「ラット全身性免疫応答モデルにおける歯肉炎の病態」 第 139 回日本歯科保存学会・秋期学術大会 2013 年 10 月 17 日 秋田

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大野 純 (OHNO, Jun)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号 : 10152208

(2) 研究分担者

岡村 和彦 (OKAMURA, Kazuhiko)
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授
研究者番号 : 00224056

川口 稔 (KAWAGUCHI, Minoru)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号 : 10122780

福島 忠男 (FUKUSHIMA, Tadao)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号 : 80084250

(3) 連携研究者
なし