

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463232

研究課題名(和文) Toll様受容体とケモカインに着目した歯槽骨代謝機構の解明

研究課題名(英文) A study on the mechanism of alveolar bone metabolism focusing on Toll-like receptor and chemokines

研究代表者

中村 公也 (NAKAMURA, KIMIYA)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00261313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Toll様受容体5リガンドであるフラジェリンを骨芽細胞様MC3T3-E1(E1)細胞に作用させたところ、ケモカインであるCX3CL1およびCXCL12 mRNAの発現が時間依存的に誘導された。また、フラジェリンとともにTNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインでE1細胞を刺激するとこれらケモカインの発現レベルはさらに上昇した。以上より、骨芽細胞はこれらケモカインを産生する主要な細胞の一つであることが示唆された。また、骨芽細胞は骨代謝に関係するだけでなく、局所における生体防御機構にも寄与しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Flagellin, the ligand of toll like receptor 5, induced expression of CX3CL1 mRNA, CXCL12 mRNA, in a dose-dependent manner on osteoblastic MC3T3-E1(E1) cells. In addition, the combination of flagellin and inflammatory cytokine such as TNF- α and IL-1 β , markedly increased gene expression of these chemokines on E1 cells. These results indicate that osteoblasts are one of the main cells which produce these chemokines and may play roles in host defense as well as bone metabolism.

研究分野：予防歯科学

キーワード：Toll様受容体5 フラジェリン ケモカイン 歯槽骨 骨芽細胞 TNF- α IL-1 β

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ケモカインは、特定の白血球遊走・活性化作用を有する塩基性の強いポリペプチドの総称である。生活習慣病のひとつである歯周疾患は慢性の経過をたどり、歯周組織には白血球の浸潤が認められる。それゆえ、ある種のケモカインが歯周疾患の進行に関与していることが推測された。

(2) 自然免疫系は細菌やウイルスなどの病原体の侵入を感知し、それを排除する生体防御システムであり、この微生物等の認識に関与している受容体として Toll 様受容体 (TLR) が知られている。進行した歯周疾患では歯槽骨の破壊・吸収がみられることから、TLR が歯槽骨の破壊・吸収において重要な働きをしていることが推測された。

(3) 研究代表者はこれまでの予防歯科臨床を通して、歯周疾患の進行抑制を考えるためには骨代謝機構を理解することが重要であると考え、マウス骨芽細胞様細胞を用いて、TLRに関する分子生物学的解析を行ってきた。その結果、TLR3, 5のリガンドである polyI:C, フラジェリンが骨芽細胞様細胞においていくつかのケモカインを誘導することが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究と同様に Toll 様受容体 5 リガンドであるフラジェリンに着目し、それを骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に作用させた際の影響をケモカインの発現に着目して確認する。また、そのケモカインと炎症性サイトカインとの相互作用について明らかにし、歯槽骨におけるサイトカインネットワークの一端を解明することを目的と設定した。

3. 研究の方法

(1) 試薬

- Flagellin isolated from *Salmonella typhimurium*
- TNF- α
- IFN- γ
- IL-1 β

(2) 細胞培養

細胞は、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (E1) 細胞を用い、10%牛胎仔血清 (FBS) 含有 α -MEM 培地にて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ の気相下で通常に従い培養した。

(3) リアルタイム RT-PCR

E1 細胞がコンフルエンスになった後、フラジェリン (1ng/mL-100ng/mL) 処理し、TaqMan[®] Gene Expression Cells-to-Ct Kit を用いて、cDNA を合成した。リアルタイム PCR は、Taqman[®] gene expression assay および Taqman[®] gene expression master mix

を使用し、ABI 7300 Real-time PCR system にて行った。

使用した Taqman[®] gene expression assay は、次の通りである。

CX3CL1: Mm00436454_m1

CX3CR1: Mm02620111_s1

CXCL12: Mm00445553_m1

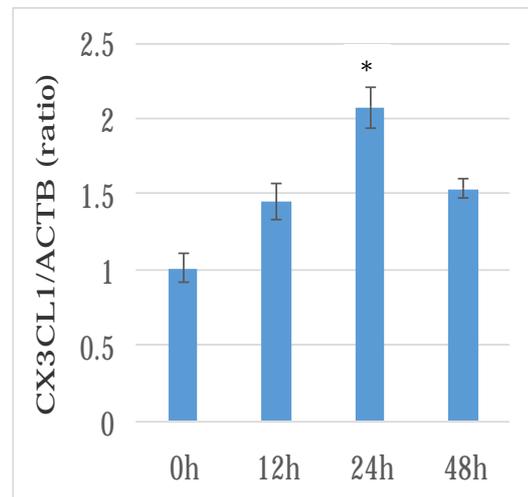
CXCR4 : Mm01996749_s1

OPG: Mm01205928_m1

β -actin: 4352341E

4. 研究成果

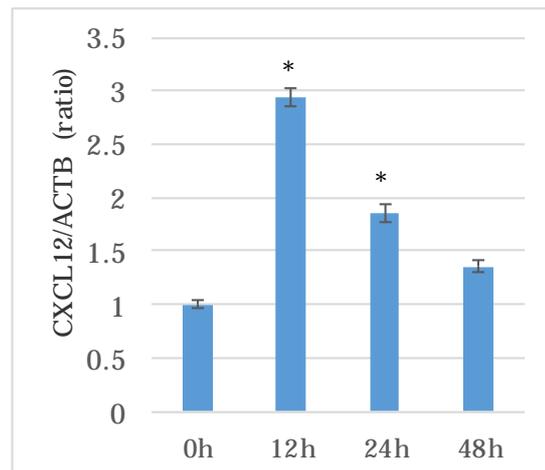
(1) フラジェリン (100 ng/mL) は CX3CL1 mRNA の発現を刺激後 24h をピークに誘導した (図 1)。



* P<0.01 (vs 0h)

図 1

(2) フラジェリン (100 ng/mL) は CXCL12 mRNA の発現を刺激後 12h をピークに誘導した (図 2)。

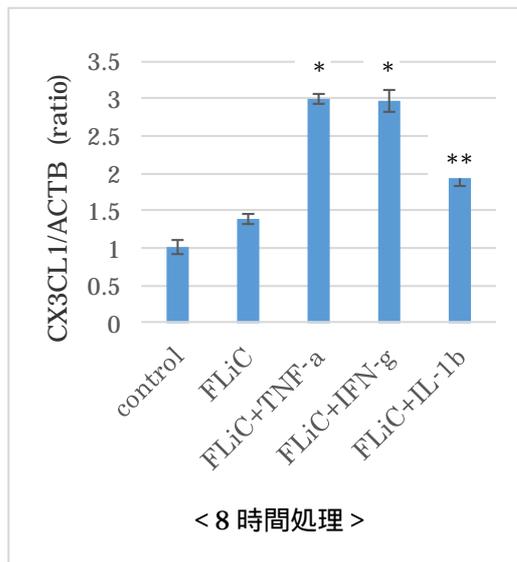


* P<0.01 (vs 0h)

図 2

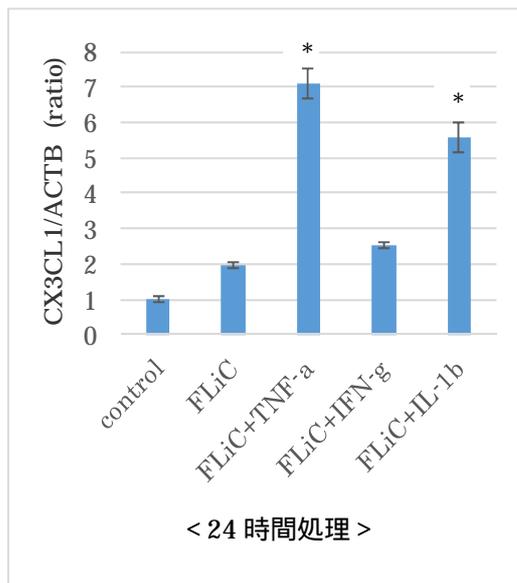
(3) CX3CL1, CXCL12 のレセプターである CX3CR1 および CXCR4 mRNA は MC3T3-E1 細胞に構成的に発現していた。また, フラジェリンで刺激してもその発現パターンに明かな変化は認められなかった。

(4) フラジェリンと炎症性サイトカインである TNF- α , IFN- γ , IL-1 β を培地に添加し, 8 時間および 24 時間刺激した。その結果, CX3CL1 mRNA は, 特に TNF- α , IL-1 β を添加した時にその発現レベルが有意に上昇した(図3, 4)。



* P<0.01(vs FLiC)
** P<0.05(vs FLiC)

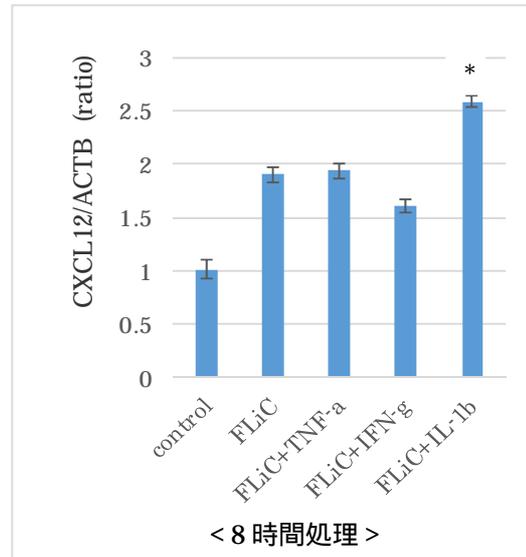
図3



* P<0.01(vs FLiC)

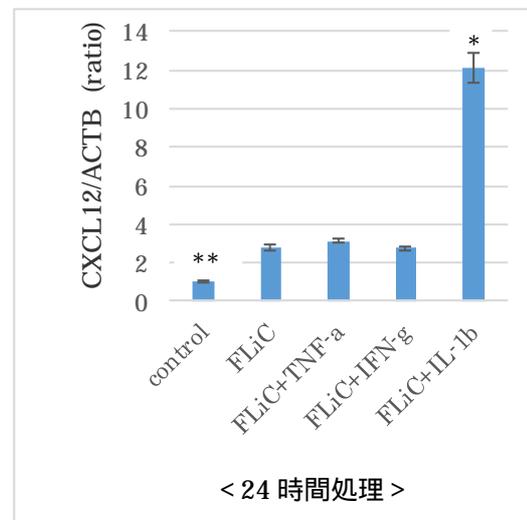
図4

(5) (4)と同様の条件で, CXCL12 mRNA の発現状態の変化を確認したところ, フラジェリンとともに IL-1 β を添加した時のみその発現レベルが有意に上昇した(図5, 6)。



* P<0.01(vs FLiC)

図5

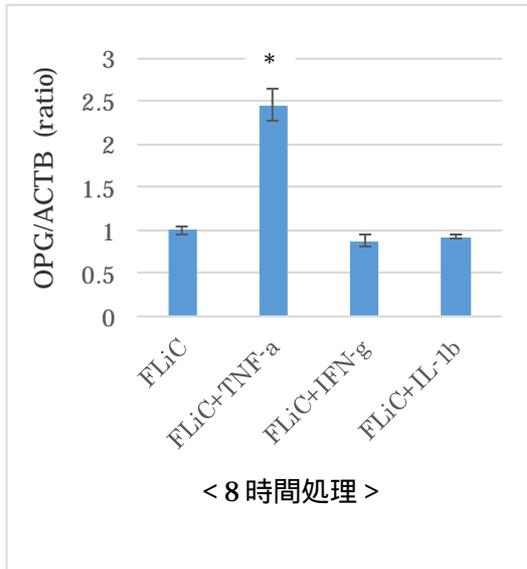


* P<0.01(vs FLiC)

** P<0.05(vs FLiC)

図6

(6) 上記の炎症性サイトカインとフラジェリンを同時に添加(8 時間)し, OPG mRNA の発現・誘導について確認した。その結果, TNF- α を添加した時のみ, 有意にその発現レベルが上昇した(図7)。

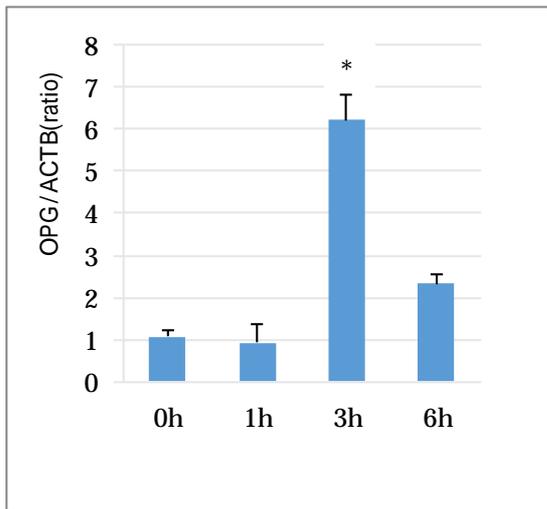


< 8 時間処理 >

* P<0.01(vs FLiC)

図 7

(7) 以前われわれが実施した研究で、フラジェリンは OPG mRNA を有意に抑制し、その抑制は MCP-1 中和抗体を添加することで、さらに増強されることが示されていた。そこで、MC3T3-E1 細胞を MCP-1 で刺激し、OPG mRNA の発現動態について検討した。その結果、MCP-1 は OPG mRNA の発現を刺激後 3 時間をピークに誘導していることが明らかとなった(図 8)。



* P<0.01(vs 0h)

図 8

上述してきた結果より、

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、TLR5 リガンドであるフラジェリンは、ケモカインである CX3CL1 および CXCL12 の発現を時間依存的に誘導すること

CX3CL1 mRNA の発現が TNF- α , IL-1 β の存在により増強されること

CXCL12 mRNA の発現が IL-1 β の存在下で増強されること

骨吸収性サイトカインである TNF- α とフラジェリンを添加した培地で E1 細胞を刺激したところ、破骨細胞形成抑制因子である OPG mRNA の発現が誘導されたこと

フラジェリン刺激により E1 細胞が産生する MCP-1 が OPG の調節に関与していること

などが明らかになり、骨芽細胞が CX3CL1 および CXCL12 を産生する主要な細胞の一つであり、局所における免疫系制御機構に関与することが示唆された。

今後は、これらケモカインおよび炎症性サイトカインが歯槽骨サイトカインネットワークの中でどのような役割を有しているのかを解明し、歯周疾患の進行を抑制させるための具体的な方策を検討していく必要があると思われた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

中村公也, 竹原順次, 三宅 亮, 高野知承, 兼平 孝, 骨芽細胞様細胞における TLR5 リガンドによる破骨細胞形成抑制因子の発現・誘導, 日本口腔衛生学会, 2014 年 5 月 29 日 - 2014 年 5 月 31 日, 熊本市市民会館 崇城大学ホール (熊本市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 公也 (NAKAMURA KIMIYA)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：00261313

(2) 研究分担者

出山 義昭 (DEYAMA YOSHIAKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：80271667
(削除：平成26年5月23日)

兼平 孝 (KANEHIRA TAKASHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：90194935

(3) 連携研究者

なし