

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861592

研究課題名(和文)ラット歯髄樹状細胞の機能動態評価

研究課題名(英文)The analysis of dendritic cells in rat dental pulp

研究代表者

荒牧 音(Aramaki, Oto)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60634615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラット正常歯髄において、MHC classII陽性、CD11c陽性の樹状細胞が存在することを免疫染色にて確認し、更にこれまで報告のなかったCD103陽性の樹状細胞がラット歯髄に認められることを免疫染色にて示した。これらの結果より、ラット歯髄において樹状細胞を中心とした獲得免疫系の関与の可能性が示唆された。ラットにおける結果を踏まえ、ヒト抜去歯歯髄を用いて、共焦点レーザー顕微鏡の3次元解析により、歯髄最前線に分枝様のIba1陽性細胞が存在することを証明した。これらのことから歯髄最前線には、マクロファージが存在し、今まで樹状細胞と考えられていたものがマクロファージである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that there existed the MHC classII and CD11c positive dendritic cells in rat normal dental pulp by immunohistochemistry. And we also showed the CD103-positive dendritic cells in rat normal dental pulp. It is suggested that adaptive immunity (mainly dendritic cells) may play an important role in dental pulp. We further showed that there are Iba1 positive cells which have ramifications in the front of human dental pulp by three-dimensional analysis. From our findings, there are many macrophages in the front of dental pulp which may induce adaptive immunity.

研究分野：う蝕制御学

キーワード：歯髄 樹状細胞 う蝕

1. 研究開始当初の背景

う蝕は、いまだ克服されていない慢性感染症であり、う蝕による歯髄炎の病態メカニズムはいまだ解明されていない。病原体、微生物の侵入において、樹状細胞は組織の最前線に存在し、自然免疫のみならず獲得免疫を誘導する免疫応答の中心を担う細胞である。皮膚粘膜において、樹状細胞の研究は進み、樹状細胞のサブセットそれぞれの機能の解明により感染の病態機序が解明されて来ている。近年、マウスの歯髄には少なくとも2種類の樹状細胞がいることが報告されている (Zang J et al. *Int Immunol.* 2006)。しかし、詳細な樹状細胞のサブセット、それぞれの機能またう蝕モデルを用いた免疫学的検討はまだされていない。これまでに、マウス及びラットの歯髄において MHC classII 陽性、CD11c 陽性の樹状細胞が歯髄内に存在することはわかっているが、どのようなサブセットの樹状細胞が存在するかはまだわかっていない。近年、マウス皮膚においてランゲリン陽性真皮樹状細胞とランゲリン陰性真皮樹状細胞がインテグリン α 鎖である CD103 により区別でき、CD103 陽性であるランゲリン陰性樹状細胞は抗原提示に重要な役割を果たすことが報告されている (Poulin LF et al. *J Exp Med.* 2007)。

2. 研究の目的

本研究では、ラットう蝕モデルを作成し、ラット歯髄における樹状細胞のサブセット及び局在の検討、更に所属リンパ節での樹状細胞の機能を調べることで、う蝕による歯髄の感染の病態メカニズムの解明を目的とした。本研究が達成されれば歯髄樹状細胞の機能を用いることでう蝕による歯髄炎の発症を予防することができる可能性があると考えられる。

3. 研究の方法

(1)ラット正常歯髄における樹状細胞の解析

Whistar 系ラット臼歯を含めた下顎骨を採取し、新鮮顎骨凍結組織切片を作成する。樹状細胞サブセット及び局在を検討するため、F4/80, MHC classII, CD11b, CD11c, CD103 の免疫染色を行い、正常歯髄における樹状細胞の解析を行った。

(2) フローサイトメトリー法を用いたラット歯髄組織、リンパ節組織における樹状細胞サブセットの解析

①正常組織を用いた cell sorting

Whistar 系ラット歯髄組織およびリンパ節組織から細胞を分離し、cell sorting を行い、樹状細胞サブセットの違いを検討した。

②う蝕モデルにおける樹状細胞のサブセット解析

Whistar 系ラットを腹腔麻酔下、*S.mutans* 菌の口腔内接種を7日間連続で行い、う蝕

原生食を投与し、ラットう蝕モデルを作成した (Hamada S et al. *Microb Immunol.* 1978, Shimada Y et al. *Dent Mate.* 2004)。う蝕モデル作成後、経時的に (1,5,7,10,14 日後) にう蝕臼歯の歯髄を採取し、I 型コラゲナーゼを用いて、歯髄細胞浮遊液を得る。各種抗体 (F4/80, MHC classII, CD11b, CD11c, CD103) を用いて、樹状細胞のサブセットを解析した。

(3) ヒト抜去歯歯髄を用いた免疫細胞の whole mount 免疫染色法による解析

ヒト抜去歯歯髄を用い、歯髄組織を摘出後 4%PFA 固定を行い、抗 Iba1 抗体、抗 Factor XIIIa(FXIIIa) 抗体、抗 HLA-DR 抗体、抗 Neurofilament 抗体を用い免疫染色を行った (東京医科歯科大学倫理審査委員会承認 #948)。点レーザーマイクロスコープにて観察を行った。

4. 研究成果

(1)ラット正常歯髄における樹状細胞の解析

ラット正常歯髄において、これまでの報告同様 MHC classII 陽性、CD11c 陽性の樹状細胞が存在することを免疫染色にて確認した (図 1)。

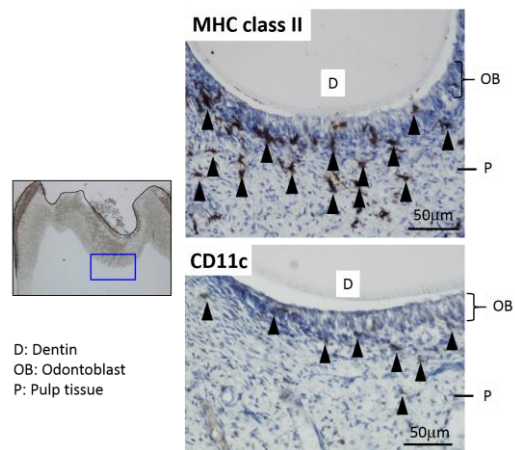


図 1 ラット歯髄における MHC classII、CD11c 免疫染色像

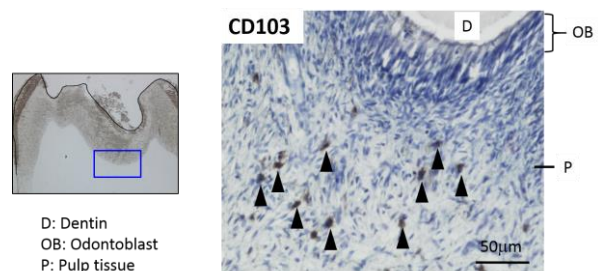


図 2 ラット歯髄における CD103 の免疫染色像

また、これまで報告のなかった CD103 陽性の樹状細胞がラット歯髄に認められることを免疫染色にて示し(図 2)、これらの結果より、ラット歯髄において樹状細胞を中心とした獲得免疫系の関与の可能性が示唆された。

(2) フローサイトメトリー法を用いたラット歯髄組織、リンパ節組織における樹状細胞サブセットの解析

① 正常組織を用いた cell sorting

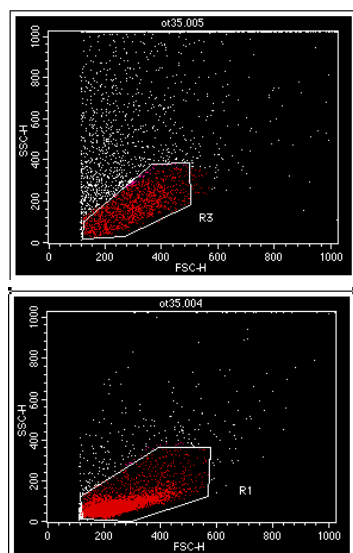


図 3 正常マウス歯髄における樹状細胞のフローサイトメトリー解析

歯髄から得られた細胞群(図 3 上)とリンパ節から得られた細胞群(図 3 下)が異なる分布を示していることが示された。

② う蝕モデルにおける樹状細胞のサブセット解析

現在サンプル数を増やし、解析中である。

(3) ヒト抜去歯歯髄を用いた免疫細胞の whole mount 免疫染色法による解析

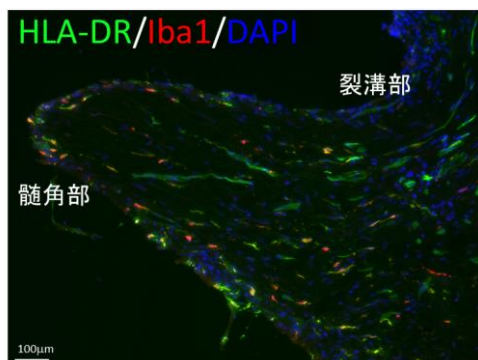


図 4 ヒト歯髄における Iba1(赤), HLA-DR(緑)免疫染色像

歯髄では、Iba1 陽性細胞は全て HLA-DR 陽性であった(図 4)。

Iba1 陽性細胞は、FXIIIa 陽性であった(図 5:△)。また、FXIIIa 単独の陽性細胞が認められた。

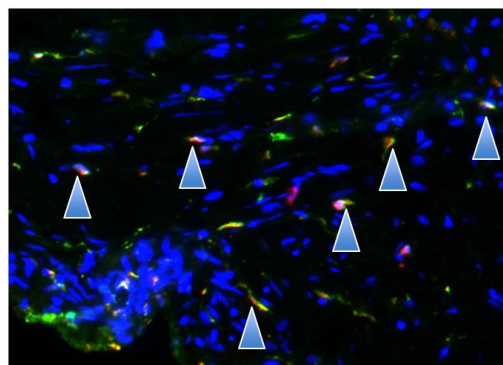


図 5 ヒト歯髄における Iba1(赤), FXIIIa(緑)免疫染色像

Iba1 陽性細胞の形態をより詳細に観察するため、陽性細胞を高倍で 3 次元的に解析を行った結果、Iba1 陽性細胞は細長い突起を持ち、分枝型の形態を呈していた(図 6)。

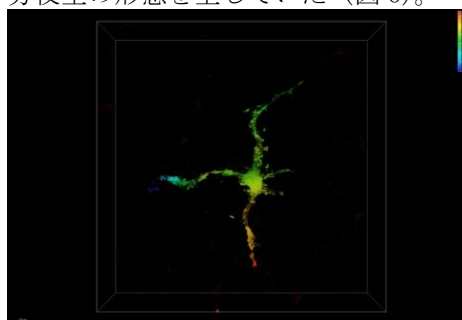


図 6 ヒト歯髄における Iba1 陽性細胞の形態

歯髄の最前線に樹状細胞が存在し、抗原の獲得を行っているとの報告があったが、我々は、共焦点レーザー顕微鏡の 3 次元解析により、歯髄最前線に分枝様の Iba1 陽性細胞が存在することを証明した。これらのことから歯髄最前線には、マクロファージが存在し、今まで樹状細胞と考えられていたものがマクロファージである可能性が示唆された。これらの成果は、国内外の学会で報告を行った。

今後フローサイトメトリー法を用い、Iba1 陽性細胞および CD103 陽性樹状細胞のソーティング、そして機能解析を行い、歯髄樹状細胞の機能解析を加え、現在論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. Oto Aramaki, Three-dimensional analysis of Iba1+ Macrophages in human dental pulp using whole mount immunostaining, International Association for Dental Research, 2016.6.21-25, ソウル (韓国).

2. 荒牧音、whole mount 免疫染色による Iba1 陽性マクロファージのヒト歯髄における三次元解析、日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会 (第 142 回)、2015 年 6 月 25 日～26 日、西日本総合展示場・北九州国際会議場 (福岡県北九州市)

[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

荒牧 音 (Oto Aramaki)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：60634615