

Title	歯周組織構成細胞におけるTLRを介した炎症反応制御の解析
Author(s)	森, 健太
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34355
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (森 健太)

論文題名

歯周組織構成細胞におけるTLRを介した炎症反応制御の解析

論文内容の要旨

【研究目的】

歯周炎は、歯周病原性細菌が主たる原因となり発症し、歯周組織の破壊に至る慢性炎症性疾患である。歯周炎罹患患者の病変部においては炎症性細胞浸潤、ポケットの形成、歯槽骨の破壊等に加え歯肉上皮の断裂・壊死などが認められる。近年様々な慢性炎症性疾患において壊死細胞由来の自己核酸が、Toll-like receptors (TLR)を介して炎症の遷延化に関与しているとの報告がなされている。しかしながら、歯周炎の病態形成における壊死細胞由来物質とTLRとの相互作用の関与についての報告はなされていない。そこで、本研究では自己由来の核酸を認識すると報告されているTLR3および歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* LPS (*P.g.* LPS)の主要な受容体であるTLR2に着目し、歯周組織構成細胞が壊死細胞から放出される自己核酸に曝露されることにより、どのような炎症反応および免疫応答を惹起するか検討した。

【材料および方法】

① 歯周組織構成細胞に及ぼす壊死細胞の影響

壊死細胞上清を作製するため、ヒト歯肉上皮細胞株(epi 4)およびヒト歯肉線維芽細胞(HGF)をそれぞれの培地に 1×10^6 個となるよう懸濁した後、凍結融解を5回繰り返し、遠心分離(1500 rpm、4°C、5分)することで得られた上清をNecrosis Cell Supernatant(NCS)として実験に用いた。epi 4およびHGFをNCSで24時間刺激した後の培養上清中のIL-6、IL-8産生量をELISA法を用いて検討した。また、epi 4 およびHGFにおけるTLRの発現をRT-PCR法を用いて検討した。さらに、epi 4およびHGFの *TLR3* mRNA発現をTLR3特異的small interfering RNA(si RNA)をトランスフェクションすることによりTLR3発現を抑制した細胞株を作製し、NCSで24時間刺激した後の培養上清中のIL-6、IL-8産生量をELISA法を用いて検討した。

② TLR3刺激による歯周組織構成細胞におけるTLR発現の変化

epi 4、HGFをTLR3のアゴニストであるPoly(I:C)(5 µg/ml)で24時間刺激した後、*TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR6* mRNA発現をReal-time PCR法にて検討した。また、epi 4およびHGFをTLR1/2のアゴニストであるPam3CysSerLys4(Pam3CSK4)(0.5 µg/ml)、TLR2のアゴニストである *P.g.* LPS(1 µg/ml)、TLR3のアゴニストであるPoly(I:C) (5 µg/ml)、TLR5のアゴニストである *Salmonella typhimurium* flagellin(ST-FLA)(1 µg/ml)、TLR6/2のアゴニストである Pam2CGDPKHPKSF(FSL-2)(1 µg/ml)で24時間刺激した後の *TLR2*、*TLR3* mRNA発現をReal-time PCR法にて検討した。さらに、epi 4およびHGFをPoly(I:C) (5 µg/ml)で48時間刺激した後のTLR2、TLR3発現をフローサイトメトリー法を用いて検討した。また、Poly(I:C) (5 µg/ml)で48時間前処理したepi 4を、*P.g.* LPS (1 µg/ml)で24時間刺激した後の培養上清中のIL-6、IL-8産生量をELISA法を用いて検討した。

③ インターフェロンβ(IFN β)刺激によって誘導されるヒト歯肉上皮細胞におけるTLR2発現の変化

epi 4をPoly(I:C) (5 µg/ml)で8時間刺激した後のIFNαおよびIFN β産生量をELISA法を用いて検討した。次にepi 4をIFN β(100~10000 units/ml)で24時間刺激した後の *TLR2* mRNA発現をReal-time PCR法を用いて検討した。また、epi 4をIFN β(5000 units/ml)で48時間刺激した後のTLR2発現をフローサイトメトリー法を用いて検討した。さらに、IFN β(5000 units/ml)で48時間前処理したepi 4を、*P.g.* LPS (1 µg/ml)で24時間刺激した後の培養上清中のIL-6、IL-8産生量をELISA法を用いて検討し

た。

【結果】

- ① NCSは濃度依存的にepi 4、HGFからのIL-6、IL-8の産生量を増加させた。また、epi 4は*TLR2*、*TLR3*、*TLR5*、*TLR6*、*TLR9* mRNAを、HGFは*TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR6*、*TLR9* mRNAをそれぞれ発現していた。TLR3発現を抑制したepi 4においてNCS刺激により誘導されるIL-6およびIL-8産生は有意に抑制された。また、epi 4にHGF由来のNCS、HGFにepi 4由来のNCSを作用させた群においてIL-6産生が誘導され、それぞれのTLR3発現抑制株においてIL-6産生は有意に抑制された。
- ② Poly(I:C)刺激によりepi 4において*TLR2*、*TLR3*、*TLR5*、*TLR6* mRNAの中で*TLR2*、*TLR3* mRNA発現が上昇し、HGFにおいて*TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR6* mRNAの中で*TLR2*、*TLR3*、*TLR4* mRNA発現が上昇した。一方epi 4およびHGFにおいて、Poly(I:C)刺激により認められた*TLR2*、*TLR3* mRNA発現上昇はPam3CSK4、*P.g.* LPS、ST-FLA、FSL-2刺激では認められなかった。さらに、epi 4においてPoly(I:C)刺激48時間後にTLR2、TLR3タンパク発現の上昇を認めたが、HGFにおいては同様の变化は認められなかった。また、epi 4においてPoly(I:C)による48時間前処理後の*P.g.* LPS刺激によるIL-6、IL-8産生量は増加した。
- ③ epi 4をPoly(I:C)で刺激して8時間後の培養上清中にIFN α の産生は認められなかったがIFN β の産生を認めた。また、epi 4においてIFN β 濃度依存的に*TLR2* mRNA発現およびTLR2タンパク発現の上昇を認めた。さらにepi 4において48時間 IFN β 前処理を行うことにより*P.g.* LPS刺激によるIL-6、IL-8産生量は増加した。

【結論および考察】

本研究結果から、歯周組織構成細胞は歯周組織の破壊により歯周組織構成細胞が壊死することで放出される内因性起炎因子をTLR3を介して認識し、炎症性サイトカインを産生することを明らかにした。また、歯肉上皮細胞においてはTLR3誘導性にIFN β を産生することによりTLR2発現が上昇し、同細胞からの*P.g.* LPS誘導性の炎症性サイトカイン産生量を増加させることにより、歯周炎を遷延化・増悪をきたす可能性が示唆された。この新たな知見は、慢性炎症性疾患として知られている歯周病の病態を理解する上で、重要な知見を与えるものと期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (森 健 太)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学 教授 村上 伸也
	副 査	大阪大学 教授 野田 健司
	副 査	大阪大学 准教授 和田 孝一郎
	副 査	大阪大学 講師 伊藤 祥作
論文審査の結果の要旨		
<p>本研究は感染、ストレス、外傷等によって歯周組織に生じた細胞壊死が周囲の歯周組織構成細胞に及ぼす影響について、自然免疫の代表的なレセプターの一つであり内因性起炎因子の認識にも関与する Toll like Receptor (TLR)に着目して、その制御機構について解析したものである。</p> <p>その結果、歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞において内因性起炎因子は少なくとも部分的に TLR3 を介して認識され IL-6、IL-8 産生を誘導すること、歯肉上皮細胞は TLR3 を介した刺激を受けることにより IFNβの産生を誘導することでTLR2 の発現を上昇させ、その結果 <i>Porphyromonas gingivalis</i> LPS に対する反応性を高めることが明らかとなった。以上の研究成果は、慢性炎症性疾患として知られている歯周病の病態を理解する上で、内因性起炎因子と TLR の関連の一端を明らかにし、歯周病の病態を解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。</p>		