

研究者：福原 大樹（所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 予防歯科学分野）

研究題目：常在菌が唾液腺の感染防御機構に与える影響

目的：

常在菌は腸内の免疫応答や組織の構造に多大な影響を与えている。申請者らの研究グループは、腸だけでなく、口腔内においても、常在菌が免疫応答を活性化させており、顎骨の構造に影響を与えることを明らかにした。さらに、唾液腺の大きさが常在菌の有無によって異なることを発見した。唾液腺は、唾液分泌を介して口腔内の免疫応答に重要な役割を果たしている。そこで、本研究では無菌状態の germ-free (GF) マウスおよび常在菌を有する specific-pathogen-free (SPF) マウスを用いて、常在菌が唾液腺にどのように影響を及ぼすのかを解明することを目的とした。

対象および方法：

8週齢 IQI/JIC 系雄性の GF マウス（4匹）と SPF マウス（4匹）を実験動物中央研究所（神奈川、日本）で購入した。屠殺後、顎下腺を摘出した。採取した顎下腺から mRNA を抽出し、免疫関連因子を調べるために、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、関連する遺伝子をリアルタイム PCR で調べた。さらに、顎下腺から切片を作製し、形態比較のため、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。

結果：

マイクロアレイ解析により、GF マウス群と SPF マウス群における顎下腺の免疫関連因子の発現量を比較したところ、GF マウスと比較して、SPF マウスでは *Ifna2* 遺伝子の発現量が高く、*Icam1*、*Mxl1*、*Myd88*、*Stat4*、*Tlr2* 遺伝子の発現量が低いことが分かった（Figure 1）。

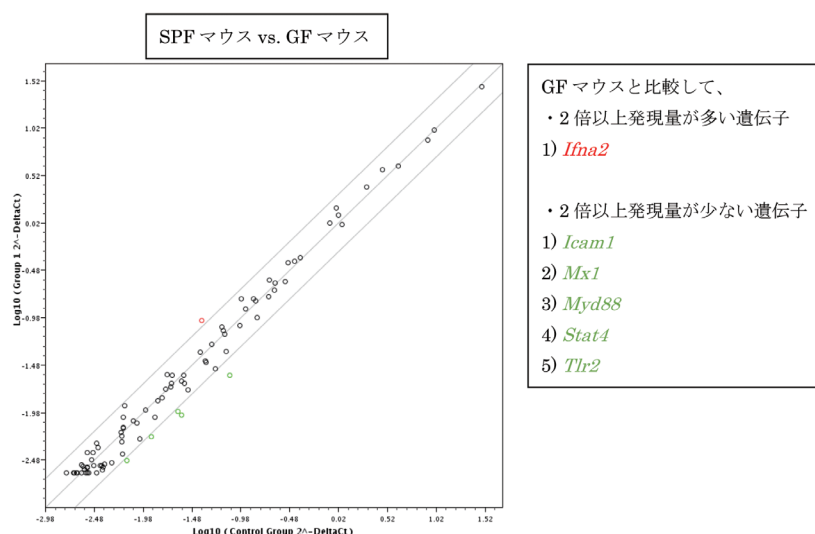


Figure 1. SPF マウス (n=3) vs. GF マウス (n=3) におけるマイクロアレイ結果 GF マウスと比較して、SPF マウスの顎下腺における mRNA 発現量が 2 倍以上多い遺伝子（赤色）と 2 倍以上少ない遺伝子（緑色）。

マイクロアレイ解析結果を参考に、GF・SPF マウスの顎下腺における各遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム PCR にて評価した。GF マウスと比較して、SPF マウスにおける *Icam1*、*Mx1*、*Myd88* および *Tlr2* の発現量は有意に低かった (Figure 2) ($P < 0.05$)。

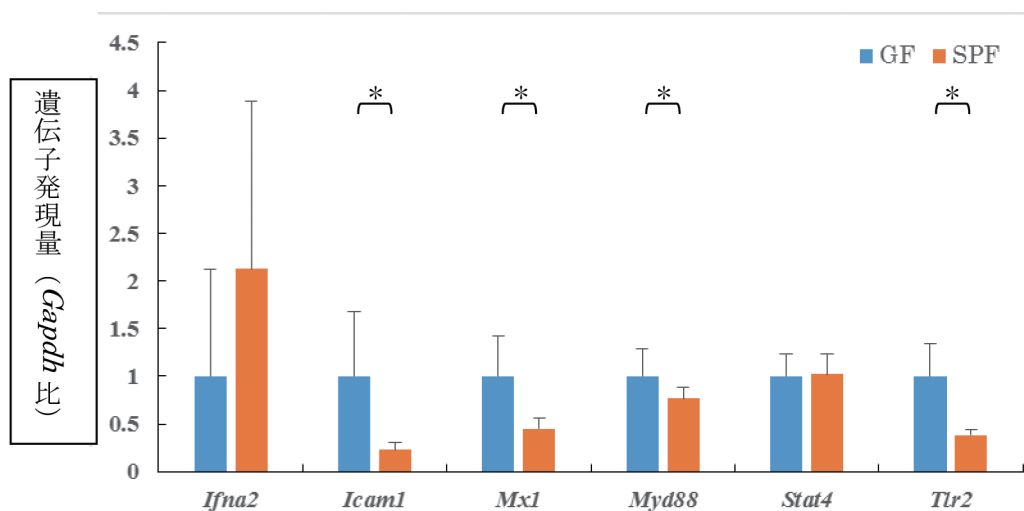


Figure 2. 顎下腺における各遺伝子の mRNA 発現レベル *Ifna2*: Interferon alpha-2, *Icam1*: intercellular adhesion molecule-1, *Mx1*: Myxovirus resistance protein 1, *Myd88*: Myeloid differentiation primary response 88, *Stat4*: Signal transducer and activator of transcription 4, *Tlr2*: Toll-like receptor 2, n=4, * $P < 0.05$, Mann-Whitney U 検定。

GF・SPF マウスの顎下腺の組織切片に HE 染色を行い、組織構造を比較した。GF マウスと比較して、SPF マウスの方が粘液性細胞内の空胞の割合が大きかった (Figure 3)。

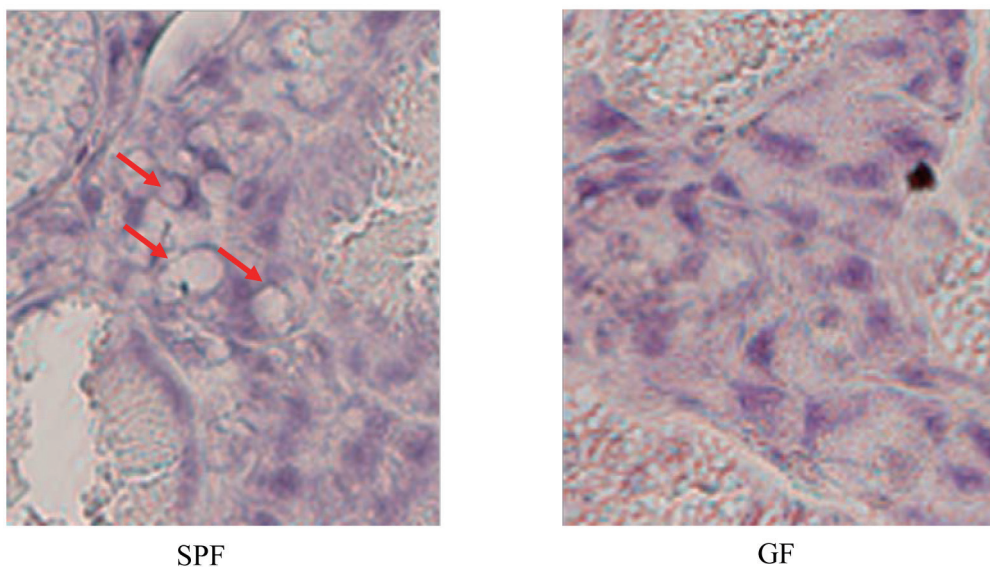


Figure 3. ヘマトキシリン・エオジン染色による顎下腺組織構造の比較 赤矢印: 細胞内の空胞、 $\times 400$ 倍

考 察：

マイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR により、GF マウスと比較して、SPF マウスの Icam1、Mx1、Myd88 および Tlr2 の発現量は有意に低いことが分かった。Icam1 は血中の白血球細胞が組織へ移行するのに必要な血管内皮細胞の接着因子である (Yang et al. 2005)¹。また、Mx1 は IFN- α や IFN- β によって発現を誘導され、広範囲のウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが知られている (Haller et al. 2007)²。さらに、Tlr2 は細菌の細胞膜に存在するリポタンパクやペプチドグリカンを認識し、Myd88 経路を通じて炎症を誘発する (Borrello et al. 2011)³。以上のことにより、GF マウスと比較して、SPF マウスでは細菌などの病原因子を察知する能力、また、病原因子に対する免疫応答が低下している可能性が示唆される。しかし、大腸における Tlr2 遺伝子発現量は SPF マウスの方が多という報告もあり⁴、免疫の寛容が常在菌の存在によって引き起こされている可能性がある。今後も、さらなる解明が必要である。

一方、HE 染色された組織切片では、GF マウスと比較して、SPF マウスでは粘液性細胞内の空胞の割合が大きいことが分かった。粘液細胞は唾液分泌に関わる細胞である。空胞変性が生じることにより唾液分泌能が低下している可能性がある。しかし、HE 染色を行うにあたり、酸性多糖類を含む粘液成分は除去される。そのため、粘液細胞内の空胞が多いことは、粘液成分を産生する細胞が多い可能性も示唆している。実際に酸性多糖類を含む粘液成分を調査していく必要がある。

結 論：

GF マウスと比較して、SPF マウスでは顎下腺における Icam1、Mx1、Myd88 と Tlr2 遺伝子発現量が低下し、また、唾液産生細胞に空胞を生じた。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

第 29 回 近畿・中国・四国 口腔衛生学会 (2018 年 9 月 23 日、愛媛) で発表予定

1. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 2005 ; 106 (2) : 584-92.
2. Haller O, Staeheli P, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*. 2007 ; 89 (6-7) : 812-8.
3. Borrello S, Nicolò C, Delogu G, Pandolfi F, Ria F. TLR2 : a crossroads between infections and autoimmunity ` *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 ; 24 (3) : 549-56.
4. Fink LN, Metzдорff SB, Zeuthen LH, Nellemann C, Kristensen MB, Licht TR, Frøkiær H. Establishment of tolerance to commensal bacteria requires a complex microbiota and is accompanied by decreased intestinal chemokine expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 ; 302 (1) : G55-65.