



The Cytobiological Differences Between Two Odontogenic Cyst-lining Keratinocytes

Takata, Naoki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Date of Publication)

2012-01-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5385

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005385>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

The Cytobiological Differences Between Two Odontogenic Cyst-lining Keratinocytes

歯原性嚢胞裏装ケラチノサイトの細胞生物学的相違

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

口腔外科学

(指導教員：古森 孝英 教授)

高田 直樹

緒言

歯原性嚢胞は日常口腔外科診療において頻繁に遭遇する疾患の1つである。歯原性嚢胞には、細菌感染によりマラッセの上皮遺残が増殖・嚢胞化した炎症性嚢胞である歯根嚢胞、退縮エナメル上皮が發育し嚢胞化した含歯性嚢胞などがある。しかし、これら嚢胞裏装ケラチノサイトは發生由来や發育環境が嚢胞間で大きく異なり、それが上皮の形態表現型として現れている可能性がある。そこで我々は、上皮防御機構および細胞代謝機能の観点からこれら2つの歯原性嚢胞裏装ケラチノサイトの細胞生物学的相違を検討した。

細胞膜のリン脂質は、細胞機能と形態維持に必須で脂肪酸は細胞の増殖と分化を制御している。細胞膜を構成する脂肪酸の中でパルミチン酸(16:0)は基本単位であり、細胞の維持と増殖におけるエネルギー源として必要不可欠である。

リノール酸(18:2)やアラキドン酸(20:4)のような主要な必須脂肪酸は体内では合成されず、食餌より摂取する。必須脂肪酸はケラチノサイトの分化に必要不可欠であり、分化の亢進によってグルコース代謝は脂肪代謝へとシフトする。パルミチン酸(16:0)は解糖系により合成されるが、必須脂肪酸を除く他の脂肪酸はパルミチン酸(16:0)から合成される。細胞のエネルギー代謝能(増殖能)のパラメータとしてパルミチン酸(16:0)を分析し、分化能のパラメータとしてケラチノサイトの細胞膜の必須脂肪酸(18:2、20:4)を分析した。特にリノール酸(18:2)は分化において重要であるといわれている。

また、Human beta defensin-2(HBD-2)はヒト表皮、口腔粘膜に分布する抗菌ペプチドで、炎症刺激や微生物侵入などの抗原刺激でその発現量を増加させる。Granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)は様々な細胞から分泌される糖タンパクで、サイトカインや抗原、炎症物質等によりその分泌を増加させる。今回、HBD-2、GM-CSFの発現に着目し上皮の防御機構を比較検討した。

研究方法

1. 材料

この研究に同意が得られた患者から、口腔外科手術により摘出された歯原性嚢胞(歯根嚢胞5例、含歯性嚢胞4例)の裏装上皮を用いた。

0.05%トリプシン溶液(0.02%EDTA含有)にて室温で7時間放置し、0.05%トリプシンインヒビター溶液(0.02%EDTA含有)にて不活化させケラチノサイトを回収した。ケラチノサイトは機械的擦過により分離した。

2. 脂肪酸解析

Folch 法に従い脂質を抽出した。脂質成分は細胞膜成分を得るために、薄層クロマトグラフィーにより採取した。メチル化した後、ガスクロマトグラフにて細胞膜脂肪酸構成比について解析を行った。

3. 免疫組織化学染色

歯根嚢胞裏装上皮を、上皮が菲薄な領域（菲薄型）、上皮の肥厚した領域（肥厚型）、細胞間隙の拡大した領域（上皮破壊型）の3つに分類した。含歯性嚢胞裏装上皮を上皮下に炎症性細胞浸潤の著しい領域（炎症型）と炎症性細胞浸潤の認められない領域（非炎症型）に分類した。

HBD-2、GM-CSF、CD1a labeled Langerhans cell、CD4 labeled T cell、CD8 labeled T cell 抗体で免疫組織化学的染色を行い、1mm²における上皮内に浸潤した CD1a labeled Langerhans cell、CD4 labeled T cell、CD8 labeled T cell の数を算出した。

4. RNA 抽出と RT-PCR 分析

プロトコールに従って歯根嚢胞裏装上皮および含歯性嚢胞裏装上皮より HBD-2、GM-CSF の RNA 抽出を行い、RT-PCR 分析を行った。

5. 統計学的分析

Stat-View-J-4.5 software を用いてフィッシャーの PLSD 検定を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1. 歯根嚢胞、含歯性嚢胞および正常口腔粘膜ケラチノサイトの細胞膜構成脂肪酸

パルミチン酸 (16:0) は、含歯性嚢胞裏装ケラチノサイトより歯根嚢胞裏装ケラチノサイトで有意に高かった。必須脂肪酸(リノール酸 18:2+アラキドン酸 20:4)は、歯根嚢胞裏装ケラチノサイトより含歯性嚢胞裏装ケラチノサイトで有意に高かった。リノール酸(18:2)の組成比は歯根嚢胞裏装ケラチノサイトより含歯性嚢胞裏装ケラチノサイトで有意に高かったが、アラキドン酸(20:4)の組成比は有意な差を認めなかった。

2. 裏装上皮における HBD-2、GM-CSF タンパクの発現

HBD2、GM-CSF とも炎症の程度にしたがって強く発現していた。HBD2、GM-CSF とも基底細胞層には発現していなかった。歯根嚢胞上皮菲薄領域では裏装上皮全層に弱い HBD-2 発現が認められた。歯根嚢胞上皮肥厚領域では裏装上皮の上層で強い発現を認めた。歯根嚢胞上皮破壊領域では裏装上皮では、最表層できわめて強い発現を認めた。含歯性嚢胞では、非炎症型で

は裏装上皮最上層にのみその発現がみられたが、炎症型では裏装上皮全層に発現が認められた。

GM-CSF は、歯根嚢胞においては、各領域とも現状の炎症状態に関係なくほぼ同様に強い発現がみられた。含歯性嚢胞においては、炎症型にのみ発現がみられた。

3. 裏装上皮における CCR6 expressing cells の浸潤

CCR6 expressing cells の1つであるランゲルハンス細胞は歯根嚢胞、含歯性嚢胞裏装上皮ともに炎症性変化に伴い顕著に浸潤していたが、その数は正常歯肉に比較して極めて少なかった。歯根嚢胞裏装上皮において菲薄領域と肥厚領域では CD4 labeled T cell と CD8 labeled T cell の上皮内浸潤は同程度の比率であった。上皮破壊型においては T cell の総数は顕著に増加したが、CD8 labeled T cell は減少し、CD4 labeled T cell の増加による T cell の増加であった。含歯性嚢胞裏装上皮においては、非炎症型に比べて炎症型で上皮内浸潤 T cell は増加したが、これは CD8 labeled T cell の増加によるものであった。

4. HBD-2、GM-CSF の RT-PCR 分析

HBD-2 の発現は、歯根嚢胞裏装上皮においてわずかに強かった。GM-CSF の発現は歯根嚢胞裏装上皮において強かったが、含歯性嚢胞裏装上皮では発現が弱かった。

考察

この研究で我々は、初めて歯根嚢胞裏装上皮および含歯性嚢胞裏装上皮の脂肪酸組成、HBD-2、GM-CSF の発現を明らかにし、上皮防御機構と細胞代謝機能の観点から2つの歯原性嚢胞裏装ケラチノサイトの細胞生物学的相違を示した。

パルミチン酸(16:0)は含歯性嚢胞よりも歯根嚢胞で有意に高かった。リノール酸(18:2)は歯根嚢胞よりも含歯性嚢胞で有意に高かったが、アラキドン酸(20:4)は違いはなかった。これらのことより、歯根嚢胞は潜在的に高いエネルギー代謝能をもち、ケラチノサイトの分化はリノール酸(18:2)と関係があるといえる。上皮化は、パルミチン酸(16:0)を消費しケラチノサイトを増殖させる現象で、この増殖は後に分化へとシフトする。

HBD-2 は口腔微生物に対する防御機構として重要な役割がある。HBD-2 の発現は炎症や病原体の侵入で増加する。我々の研究では、HBD-2 の発現は含歯性嚢胞よりも歯根嚢胞で強かった。最近の *in vitro* での研究では HBD-2 は CCR6 をターゲットとし、CCR6 を発現した T cell や樹状細胞を走化性によっ

て誘導することが明らかとなった。つまり、皮膚や粘膜では、HBD-2 は CCR6 との相互作用で、T cell や樹状細胞を誘導することによって免疫応答に重要な役割を担っている。GM-CSF も *in vivo*でのランゲルハンス細胞の集積や *in vitro*でのランゲルハンス細胞の分化に重要である。成熟したランゲルハンス細胞は抗原提示細胞であり、CD4 labeled T cell を MHC class II によって誘導する。

根尖病巣の活動期では、CD4 labeled T cell が優位であるのに対して、安定期になると CD8 labeled T cell が優位になるとの報告がある。歯根嚢胞裏装上皮への T-cell 侵入は CD4 優位であるのに対して、含菌性嚢胞では CD8 が主体であった。つまり、HBD - CCR6 系免疫に加え、GM-CSF-ランゲルハンス細胞を介した MHC class II 系免疫が活性化されたと推測される。

歯根嚢胞や含菌性嚢胞におけるランゲルハンス細胞の浸潤は炎症の程度によって増強されるが、その数は正常歯肉に比べると著しく少なかった。つまり、歯原性嚢胞は正常歯肉に比べて樹状細胞系免疫が脆弱であると推測される。

我々は歯原性嚢胞裏装ケラチノサイトの細胞膜構成脂肪酸組成、HBD-2、GM-CSF 発現を初めて解明した。この研究によって、上皮防御機構および細胞代謝機能の観点から2つの歯原性嚢胞裏装ケラチノサイトの細胞生物学相違を明らかにした。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2217 号	氏 名	高田 直樹
論文題目 Title of Dissertation	The Cytobiological Differences Between Two Odontogenic Cyst-lining Keratinocytes 歯源性嚢胞嚢装ケラチノサイトの細胞生物学的相違		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner	田原 真也 丹生 隼一 横 崎 浩	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

歯源性嚢胞は日常臨床において頻繁に遭遇する疾患の1つである。歯源性嚢胞には、細菌感染によりマラッセの上皮遺残が増殖・嚢胞化した炎症性嚢胞である歯根嚢胞、退縮エナメル上皮が発育し嚢胞化した含歯性嚢胞などがあり、特にこれらは歯源性嚢胞の中でも頻度の高いものである。これら嚢胞嚢装ケラチノサイトは発生由来や発育環境が嚢胞間で大きく異なり、それが上皮の形態表現型として現れている可能性があるが、これまでにその相違を検討した報告はない。本研究では、上皮防御機構および細胞代謝機能の観点からこれら2つの歯源性嚢胞嚢装ケラチノサイトの細胞生物学的相違を検討した。細胞膜のリン脂質は細胞機能と形態維持に必須で、脂肪酸は細胞の増殖と分化を制御している。細胞膜を構成する脂肪酸の中でパルミチン酸(16:0)は基本単位であり、細胞の維持と増殖におけるエネルギー源として必要不可欠である。必須脂肪酸(リノール酸(18:2)やアラキドン酸(20:4))は細胞分化に必要な不可欠である。細胞のエネルギー代謝能のパラメータとしてパルミチン酸を、分化能のパラメータとして必須脂肪酸を分析した。また、Human beta defensin-2(HBD-2)はヒト表皮、口腔粘膜に分布する抗菌ペプチドで、炎症刺激や微生物侵入などの抗原刺激でその発現量を増加させる。Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) は様々な細胞から分泌される糖タンパクで、サイトカインや抗原、炎症物質等によりその分泌を増加させる。今回 HBD-2、GM-CSF の発現に着目し上皮防御機構を検討した。

方法としては、手術により摘出された歯源性嚢胞(歯根嚢胞5例、含歯性嚢胞4例)の嚢装上皮を用いた。歯源性嚢胞嚢装ケラチノサイトの細胞膜構成脂肪酸を解析した。歯根嚢胞嚢装上皮を、菲薄型、肥厚型、上皮破壊型に、また含歯性嚢胞嚢装上皮を炎症型と非炎症型に分類し、HBD-2、GM-CSF、CD1a、CD4、CD8抗体で免疫組織化学的染色を行った。HBD-2、GM-CSFについてRT-PCR分析を行った。

結果は、細胞膜構成脂肪酸組成は、パルミチン酸では含歯性嚢胞嚢装ケラチノサイトより歯根嚢胞嚢装ケラチノサイトで有意に高く、必須脂肪酸は歯根嚢胞嚢装ケラチノサイトより含歯性嚢胞嚢装ケラチノサイトで有意に高かった。リノール酸の組成比は歯根嚢胞嚢装ケラチノサイトより含歯性嚢胞嚢装ケラチノサイトで有意に高かったが、アラキドン酸の組成比は有意な差を認めなかった。嚢装上皮における HBD-2、GM-CSF の発現については、HBD2、GM-CSFとも炎症の程度にしたがって強く発現していたが、ともに基底細胞層には発現していなかった。ランゲルハンス細胞は歯根嚢胞、含歯性嚢胞嚢装上皮ともに炎症性変化に伴い顕著に浸潤していた。歯根嚢胞嚢装上皮において菲薄領域と肥厚領域では CD4 labeled T cell(CD4)と CD8 labeled T cell(CD8)の上皮内浸潤は同程度の比率であった。上皮破壊領域においては T cell の総数は顕著に増加したが、CD8 は減少し、CD4 の増加によるものであった。含歯性嚢胞嚢装上皮においては、非炎症型に比べて炎症型で上皮内浸潤 T cell は増加したが、これは CD8 の増加によるものであった。HBD-2、GM-CSF の RT-PCR 分析については、HBD-2 の発現は歯根嚢胞嚢装上皮においてわずかに強かった。GM-CSF の発現は歯

根嚢胞裏装上皮において強かったが、含菌性嚢胞裏装上皮では発現が弱かった。

この研究で歯根嚢胞および含菌性嚢胞裏装上皮の脂肪酸組成、HBD-2、GM-CSF の発現を明らかにし、上皮防御機構と細胞代謝機能の観点から2つの歯原性嚢胞裏装ケラチノサイトの細胞生物学的相違を示した。パルミチン酸は含菌性嚢胞よりも歯根嚢胞で有意に高かった。リノール酸は歯根嚢胞よりも含菌性嚢胞で有意に高かったが、アラキドン酸は違いはなかった。これらのことより、歯根嚢胞は潜在的に高いエネルギー代謝能をもち、ケラチノサイトの分化はリノール酸と関係があるといえる。また、最近の研究では HBD-2 は CCR6 をターゲットとし、CCR6 を発現した T cell や樹状細胞を走化性によって誘導することが明らかとなり、免疫応答に重要な役割を担っている。GM-CSF もランゲルハンス細胞の誘導や分化に重要である。成熟したランゲルハンス細胞は抗原提示細胞であり、CD4 を MHC class II によって誘導する。根尖病巣の活動期では CD4 が優位であるのに対して、安定期になると CD8 が優位になるとの報告がある。歯根嚢胞裏装上皮への T cell 侵入は CD4 優位であるのに対して、含菌性嚢胞では CD8 が主体であった。つまり歯根嚢胞裏装上皮では、HBD - CCR6 系免疫に加え、GM-CSF-ランゲルハンス細胞を介した MHC class II 系免疫が活性化されたと推測される。

本研究は歯原性嚢胞についてその裏装上皮ケラチノサイトの細胞生物学的相違を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった上皮防御機構および細胞代謝機能について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。