

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17592146  
 研究課題名（和文） 抗菌タンパクβディフェンシン遺伝子導入によるう蝕予防の実験的研究  
 研究課題名（英文） Experimental study on caries prevention by gene transfer of anti microbial peptides beta-defensins  
 研究代表者  
 五十嵐清治  
 北海道医療大学・歯学部・教授  
 研究者番号：20001943

研究成果の概要：βディフェンシンは口腔上皮での細菌防御機構に関与しており、特にβディフェンシン2が、う蝕の病原菌の増殖を抑制するという報告がある。本研究ではβディフェンシン遺伝子導入による抗う蝕能を検討することを目的とした。研究結果から、βディフェンシン2とβディフェンシン3は唾液腺導管上皮の感染防御機構に関与していることが示唆された。またβディフェンシンは単に抗菌作用のみならず免疫系に関与しているが、本研究により細胞増殖や細胞分化にも関与することが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17年度	1,200,000	0	1,200,000
18年度	1,000,000	0	1,000,000
19年度	500,000	150,000	650,000
20年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：小児歯科

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：βディフェンシン； 抗菌ペプチド； う蝕； マウス唾液腺

## 1. 研究開始当初の背景

βディフェンシンは主に上皮で発現している抗菌性ペプチドであり、グラム陽性およびグラム陰性菌などの感染を抑制することが報告されている。このβディフェンシンは口腔上皮での発現も明らかになっており、口腔上皮での細菌感染防御機構に大きく関与していることが示唆されてきている。研究分担者の安彦らは、口腔上皮でのβディフェンシンの発現様式について培養細胞を用いた検索と、口腔上皮性疾患の組織学的検索を行い、βディフェンシンが口腔上皮での防御機

構にも関与していることを明らかにしてきた。また研究分担者の齊藤らは、歯肉息肉や歯肉増殖などにより切除採取した健常小児の歯肉からβディフェンシン-1、-2、-3の発現量と歯肉の炎症程度を比較した結果、歯肉の炎症程度とβディフェンシン-2、-3の発現が有意に相関しており、βディフェンシンの発現は歯肉炎と密接に関わりあっていることを報告している。このようにβディフェンシンは口腔上皮での細菌防御機構への関与が明らかになってきており、近年ではβディフェンシン-2が、う蝕の病原菌である

Streptococci 群の増殖を抑制するという報告がある

## 2. 研究の目的

本研究では、最もう蝕病原菌性が高い *Streptococcus mutans* (S. mutans) を感染させたう蝕誘発マウスを作製し、アデノウイルスベクターに組み込んだβディフェンシン遺伝子を、う蝕誘発マウスの唾液腺に感染させる。う蝕誘発マウスの口腔内に唾液を介しβディフェンシン蛋白を大量に誘導し、βディフェンシン遺伝子導入による抗う蝕能を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ラット唾液腺にβディフェンシン-アデノウイルスを感染するための前実験として、マウス唾液腺におけるβディフェンシンの発現確認を行った。アデノウイルスを感染させる際、唾液腺に炎症反応が起こるとの報告があることから、経時的に自己免疫性唾液腺炎を自然発症する MRL/lpr マウスの顎下腺におけるβディフェンシンの発現変化を検索した。方法として 4、8、10、12、14 および 16 週齢の顎下腺を摘出し、組織切片を作製。切片は H. E 染色ならびに抗 hBD-2 抗体、抗 hBD-3 抗体を用いて免疫染色を行った。またそれぞれの組織から total RNA を抽出し cDNA を作製した後、TaqMan real-time RT-PCR を行った。

(2) βディフェンシン-アデノウイルスを感染するための前実験として、培養細胞にβディフェンシン遺伝子を導入もしくはノックダウンし、細胞の変化、特に細胞増殖および分化の変化についての解析を行った。ヒト角化上皮細胞株 HaCaT 細胞に、ヒトβディフェンシン 1~3 の遺伝子を導入し、βディフェンシン強発現細胞を作製、これらの細胞の特性を検索した。さらにβディフェンシン 1~3 の siRNA を HaCaT 細胞に導入し、βディフェンシン発現減弱細胞を作製、細胞変化を確認した。

(3) ヒト唾液中におけるディフェンシンの発現量を解析した。

(4) βディフェンシン 3-アデノウイルスプラスミドの作製およびβディフェンシン 3-アデノウイルスの精製・抽出を実施した。

## 4. 研究成果

(1) の結果として、real-time RT-PCR では BD-1 の発現には変化がみられなかったが、BD-2 は 16 週齢で 4 週と 8 週より有意に発現が上昇しており、mBD-3 は 14 週齢での発現が最も強くなっていた。免疫染色では、hBD-2 は陽性反応がみられなかったものの、hBD-3 は導管上皮での局在を認め、リンパ球浸潤の強いところでは、消失傾向にあった。以上のことから、BD-2 と -3 は唾液腺炎で唾液腺導

管が破壊される前まで、導管上皮の感染防御機構に関与していることが示唆された。

(2) βディフェンシンが強発現した細胞はコントロールと比較し有意に細胞増殖および細胞遊走の性質を抑制し、これらの細胞増殖は Cyclin dependent kinase inhibitor である p21/waf1 および p27/kip1 に制御されていること示した。また、βディフェンシンが強発現細胞では、keratin10 や involucrin など角化上皮細胞の分化マーカーの発現上昇がみられ、βディフェンシンが細胞分化に関与するという知見も得た。一方、βディフェンシン 1~3 の発現減弱細胞で、細胞の増殖が認められ、細胞分化マーカーの発現低下が確認された。βディフェンシン蛋白は単に抗菌作用のみならず免疫系に深くかかわることが最近報告されているが、本研究により細胞増殖や細胞分化にも関与することが示唆された。

(3) では、ヒト全唾液中に含まれるディフェンシンの多くはαディフェンシンであり、それは歯肉溝浸出液の好中球由来であることを確認した。以上からαディフェンシンはう蝕や歯周病と関連していることが示唆された。

(4) では、コントロールの CAT 遺伝子を含むアデノウイルスプラスミドは作製できたが、βディフェンシン 3 を含むウイルスでは、ディフェンシンの抗菌性および抗ウイルス性が作用し、使用できるウイルスプラスミドの精製・抽出は作製できなかった。

## 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 5 件)

- ① Saitoh M, Kurashige Y, Yamazaki M, Nishimura M, Nakamura S, Noro D, Takeshima M, Arakawa T, Takuma T, Igarashi S, Kaku T, Inoue T, Abiko Y. Increased expression of beta-defensin-2 and -3 during the development of autoimmune sialoadenitis in MRL/lpr mice. Med Mol Morphol. 40:157-162, 2007. 査読有
- ② Abiko Y, Saitoh M. Salivary defensins and their importance in oral health and disease. Curr Pharm Des. 13:3065-3072, 2007. 査読有
- ③ Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D, Kaku T. Role of beta-defensins in oral epithelial health and disease. Med Mol Morphol. 40:179-184, 2007. 査読有
- ④ Kurashige Y, Saitoh M, Nishimura M, Noro

D, Kaku T, Igarashi S, Takuma T, Arakawa T, Inoue T, Abiko Y. Profiling of differentially expressed genes in porcine epithelial cells derived from periodontal ligament and gingiva by DNA microarray. Arch Oral Biol. 53:437-442, 2008. 査読有

- ⑤佐藤惇、齊藤正人、畠山翔太、堀内美帆子、清水重善、倉重圭史、松坂賢一、井上孝、五十嵐清治、安彦善裕. 歯肉溝滲出液における抗細菌性ペプチド・ $\alpha$ ディフェンシンの定量的評価. 口腔検査誌. 1:24-27, 2009. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① Saitoh M, Yamazaki M, Nishimura M, Shimizu S, Noro D, Igarashi S, Abiko Y. Expression of keratinocyte differentiation markers accompanied by alteration of beta-defensins. 84<sup>th</sup> International Association for Dental Research. 2006.
- ② Noro D, Saitoh M, Igarashi S, Nishimura M, Yamazaki M, Abiko Y. Effect of Malassez-epithelial cells on osteoblast cells in co-culture system. 84<sup>th</sup> International Association for Dental Research. 2006.
- ③ Saitoh M, Yamazaki M, Kurashige Y, Takeshima M, Nakamura S, Igarashi S, Noro D, Abiko Y. Expression of  $\beta$ -defensins in autoimmune sialoadenitis of MRL/lpr mice. 85<sup>th</sup> International Association for Dental Research. 2007.
- ④ Noro D, Saitoh M, Yamazaki M, Nishimura M, Horiuchi M, Igarashi S, Abiko Y. Malassez epithelial cells inhibit osteoblastic mineralization in co-culture systems. 85<sup>th</sup> International Association for Dental Research. 2007.
- ⑤ Saitoh M, Kurashige Y, Noro D, Yamazaki M, Nakamura S, Takeshima M, Horiuchi M, Igarashi S, Abiko Y. Increased expression of  $\beta$ -defensins during of sialoadenitis in MRL/lpr-mice. 21st International Association for Dental Research - South East Asia Division. 2007.
- ⑥ Noro D, Saitoh M, Yamazaki M, Nishimura M, Horiuchi M, Igarashi S, Abiko Y. Malassez-epithelial cells promote osteoblastic cell proliferation and migration in co-culture. 21st International Association for Dental Research - South East Asia Division. 2007.

- ⑦ Saitoh M, Yamazaki M, Nakamura S, Horiuchi M, Kurashige Y, Noro D, Nishimura M, Igarashi S, Abiko Y. Decreased expression of beta-defensins alters keratinocyte proliferation and differentiation. 86<sup>th</sup> International Association for Dental Research. 2008.

- ⑧ Horiuchi M, Saitoh M, Nakamura S, Nishimura M, Yamazaki M, Kurashige Y, Igarashi S, Abiko Y. Effect of corticosteroid on beta-defensins expression stimulated with TLR agonists. 86<sup>th</sup> International Association for Dental Research. 2008.

- ⑨ Horiuchi M, Saitoh M, Nakamura S, Nishimura M, Yamazaki M, Kurashige Y, Kaku T, Igarashi S, Abiko Y. Corticosteroid affects upregulated expression of beta-defensins in keratinocytes. 56th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 2008.

[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]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五十嵐 清治 (IGARASHI SEIJI)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：20001943

### (2) 研究分担者

安彦善裕 (ABIKO YOSHIHIRO)

北海道医療大学・個体差医療科学センター・

教授

研究者番号：90260819

齊藤正人 (SAITOH MASATO)

北海道医療大学・個体差医療科学センター・

講師

研究者番号：50337036

### (3) 連携研究者