

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11840

研究課題名(和文) 口腔粘膜における核酸認識と抗菌ペプチドによる新規応答調節機構の解明

研究課題名(英文) Nucleic acid recognition in oral mucosa and investigation of novel regulatory mechanism of antimicrobial peptides

研究代表者

太田 耕司(Ohta, Kouji)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：20335681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜の核酸認識機構は明らかにされていない。また抗菌ペプチドLL-37と核酸で誘導される口腔粘膜の炎症応答機構は不明である。そこで不死化口腔粘膜上皮細胞における核酸で誘導される炎症応答に対するLL-37の影響を検討した。今回の結果から、LL-37が口腔粘膜上皮細胞の核酸で誘導されるCXCL10やNF- κ Bの活性化を増加することが示された。さらにLL-37が口腔粘膜上皮細胞外の核酸を細胞内に導入することを明らかにした。本研究によって、LL-37が口腔粘膜上皮細胞の核酸に関連する炎症応答を活性化することで口腔粘膜の炎症性疾患の病態形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によって口腔粘膜細胞が、自己DNAや非自己DNAと結合し、T細胞活性化因子などの炎症性遺伝子の発現誘導を行っていること、また唾液など工区に存在する抗菌ペプチドLL-37がそれらの自己、非自己DNAを口腔粘膜上皮細胞内に導入し、核酸で誘導される免疫応答を調節している可能性を明らかにした。今回の研究成果は、口腔粘膜の新規免疫応答機構を解明するだけでなく、口腔粘膜炎症性疾患に対する新たな治療や、検査法への開発につながることを期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of nucleic acid recognition in oral mucosa is unknown. On the other hand, the antimicrobial peptide LL-37 is detected in epithelial inflammatory diseases. However, it is well unknown whether LL-37 is associated with inflammatory responses induced by nucleic acid, in oral mucosa. Therefore, we examined the effect of LL-37 on nucleic acid-mediated inflammatory responses in immortalized human oral keratinocytes (RT7). From those results, LL-37 dramatically increased self and non-self nucleotides-mediated CXCL10 expression in RT7, and those inductions were associated with NF- κ B signaling activation. We found that LL-37 enables those nucleic acids to translocate into cytoplasm. In conclusion, LL-37 promotes exogenous nucleic acids-mediated inflammatory responses in oral keratinocytes, and that may be involved in the development of oral mucosal inflammatory diseases.

研究分野：外科系歯学

キーワード：核酸認識機構 口腔粘膜上皮細胞 抗菌ペプチド 口腔粘膜炎症性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜はウイルスの細胞内侵入に対して初期免疫防御応答を行っている。我々はこれまでの研究で口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞が Toll-like receptor (TLR) だけでなく細胞内受容体 RIG-I を発現し、ウイルス由来 RNA を認識し、STAT1 経路を介してウイルス防御応答を行うことを明らかにした。しかしながら口腔粘膜細胞における核酸認識応答機構は国内外でも明らかにされていない。これら口腔粘膜の発現する核酸認識受容体による免疫応答はウイルス防御だけでなく、炎症誘導経路を活性化させることによって粘膜炎症を増悪させる可能性を考えている。また近年、組織破壊によって放出される自己核酸が TLR9 等の核酸受容体を介して炎症応答を誘導し、皮膚炎、肝炎が増悪することが報告されている。申請者らの予備実験において口腔粘膜上皮細胞の自己壊死画分を同細胞に添加すると T 細胞遊走因子が誘導されること、また自己壊死画分の核酸分解酵素処理によってその誘導が抑制される結果を得ている。この結果は、口腔粘膜が非自己だけでなく自己核酸認識機能をもつことを示唆している。口腔粘膜における自己 DNA 認識機構の存在は報告がない。

一方、唾液中にみられる LL-37 は、細菌感染により好中球から発現される抗菌ペプチドである。LL-37 は強い抗菌作用を持つだけでなく、創傷治癒や血管新生など様々な生理活性をもつことが知られている。また近年では、腸粘膜や皮膚などの炎症性疾患組織における LL-37 の発現の増加が報告されている。しかしながら、口腔粘膜における LL-37 と核酸依存性の炎症誘導機構の関連については報告されていない。

今回の研究は口腔粘膜細胞における自己、非自己核酸認識機構の解明と抗菌ペプチドによる核酸認識機構への新規作用を明らかにすることである。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は口腔粘膜細胞の自己、非自己 DNA 認識機構の解明と、LL-37 による核酸受容体に対する新規作用を明らかにし、口腔粘膜炎症性疾患による核酸認識機構の関与を検討することである。このために不死化口腔粘膜上皮細胞 (RT7) の自己壊死画分 (Necrotic Cell Supernatants: NCS) を作製し単独添加あるいは LL-37 と同時添加することで、RT7 における炎症応答性遺伝子の発現について検討した。また、様々な構造を有した核酸と LL-37 を添加した際の核酸認識受容体の同定と炎症応答性遺伝子の発現誘導機構の解明を行った。

3. 研究の方法

1) 研究に用いた細胞

細胞は hTERT 遺伝子を導入することによって不死化させた口腔粘膜上皮細胞 RT7 を用いた。表皮角化基本培地で培養を行った。

2) 自己壊死画分の調整方法

壊死細胞上清の作製は Diana らの方法に従った。すなわち、RT7 をそれぞれの培地に 1×10^6 個/mL となるよう懸濁し凍結融解を 5 回繰り返した。その後、遠心分離することで得られた上清を自己壊死画分として実験に供した。

3) 研究に用いた核酸

核酸は TLR8 のアゴニストである single-stranded RNA (ssRNA) [ssPolyU], TLR9 のアゴニストである single-stranded DNA (ssDNA) [CpG-ODN], TLR3 のアゴニストである double-stranded RNA (dsRNA) [Poly(I:C)], 細胞質 DNA センサー (CDS) のアゴニストである double-stranded DNA (dsDNA) [Poly(dA:dT)] を用いた。ペプチドはリコンビナント human LL-37 を使用した。

4) 自己壊死画分、様々な核酸で誘導される CXCL10 mRNA 発現に対する LL-37 の影響

RT7 に自己壊死画分，様々な核酸，LL-37 を同時添加培養後，RNA を抽出し，逆転写酵素によって，逆転写した cDNA をテンプレートに，Real-time PCR を行い，T 細胞遊走因子である CXCL10 などの炎症性遺伝子の発現誘導を検討した。

5) 核酸で誘導される炎症性シグナル伝達経路に対する LL-37 の影響

RT7 に核酸，LL-37 を同時添加培養後，タンパクを抽出し，電気泳動後，Total NF- κ B 抗体，Phospho-NF- κ B 抗体を用いた Western blotting を行った。

6) 核酸，LL-37 の結合の検討

Poly(I:C) または Poly(dA:dT) を LL-37 を反応させたものを ethidium bromide を含む 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い，Printgraph ゲルイメージングシステムにより記録した。

7) LL-37 による核酸の細胞内導入の影響

Fluorescein-labeled Poly(I:C)，Rhodamine-labeled Poly(dA:dT) を単独添加あるいは LL-37 と同時添加を行い，Becton Dickinson FACS Caliber™ (Becton Dickinson and company) を使用し，Fluorescence activated cell sorting (FACS) を行った。これらの解析には，FACS Diva ソフトウェアを用いた。

8) LL-37 による核酸の口腔粘膜上皮細胞内局在の観察

チャンバースライドに RT を播種，サブコンフルエントまで培養後，RT7 に LL-37 ，Fluorescein-labeled Poly(I:C)，Rhodamine-labeled Poly(dA:dT) を同時添加培養した後，パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液による固定，膜透過処理を行った後，蛍光顕微鏡を用いて核酸の細胞内局在を観察した。

4. 研究成果

1) 自己壊死画分の添加によって T 細胞活性化因子である CXCL10 の発現誘導が増加した。自己壊死画分を RNA 分解酵素で前処理し RT7 に添加したところ CXCL10 の発現誘導が減少した。また，LL-37 を同時添加することで自己壊死画分誘導性の CXCL10 に対する影響を検討した。自己壊死画分に LL-37 を混和したものを RT7 に添加したところ自己壊死画分単独添加と比較して CXCL10 の発現誘導が増加した。自己壊死画分を RNA 分解酵素で前処理し LL-37 と混和したものを RT7 に添加したところ自己壊死画分・LL-37 同時添加と比較して CXCL10 の発現誘導が減少した

2) RT7 に様々な構造の核酸を単独添加あるいは LL-37 と同時添加し核酸依存性の炎症応答に対する LL-37 の影響について検討し結果，ssDNA や ssRNA を単独添加あるいは LL-37 と同時添加したところ CXCL10 の発現誘導に影響は認めなかった。次に，dsDNA である Poly(dA:dT) や dsRNA である Poly(I:C) を単独添加あるいは LL-37 と同時添加したところ，核酸と LL-37 の同時添加において CXCL10 の発現誘導が増加した。

3) NF- κ B 関連シグナル伝達阻害剤である BX795，Bay11-7082 により CXCL10 の発現誘導が著明に減少した。NF- κ B の活性化で生じる p65 ダイマーのリン酸化について検討したところ，dsRNA 単独添加と比較して dsRNA/LL-37 同時添加では NF- κ B のリン酸化の増加を認めた。

4) 核酸と LL-37 を混和したものを電気泳動にかけ，移動する核酸量の比較により LL-37 と核酸の結合親和性について検討した結果，LL-37 の混和量を増加することに依存して電気泳動で移動する核酸が減少することが明らかとなった。

5) RT7 に蛍光標識した核酸の単独添加あるいは LL-37 と蛍光標識した核酸の複合体を添加することで蛍光される細胞について Flow cytometry にて検討した。核酸の単独添加と比較して，核酸/LL-37 複合体添加では蛍光される細胞が増加することが明らかとなった。また，dsDNA と比

較して dsRNA の方が蛍光される細胞が多く認められた。さらに、それらの細胞を蛍光顕微鏡にて観察したところ、核酸単独添加と比較して核酸/LL-37 複合体添加により蛍光される細胞が多く観察された。

本研究によって、抗菌ペプチド LL-37 が口腔粘膜上皮細胞の自己壊死などから放出される核酸や非自己の核酸と結合し、上皮細胞内に複合物を導入することによって炎症応答が活性化されることが示唆された。抗菌ペプチド LL-37 と口腔粘膜の核酸認識機構が口腔粘膜の炎症性疾患の病態形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 抗菌ペプチドLL-37の核酸導入能力と細胞内受容体RIG-I を介した炎症誘導機構
3. 学会等名 第72回NPO法人日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞における抗菌ペプチドLL-37の細胞内受容体を介した核酸依存性炎症誘導の活性化
3. 学会等名 第28回日本口腔内科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞における抗菌ペプチドLL-37による核酸依存性炎症応答の活性化
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 福井暁子, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞における核酸依存性炎症誘導に対する抗菌ペプチドLL-37の影響
3. 学会等名 第54回日本口腔組織培養学会学術大会, 総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 福井暁子, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞における抗菌ペプチドLL-37の核酸細胞内導入を介した炎症誘導機構
3. 学会等名 第27回日本口腔内科学会 第29回日本口腔診断学会 合同学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 福井暁子, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 Cathelicidin 型抗菌ペプチドLL-37の口腔粘膜上皮細胞への核酸導入能力
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H Kato, K Ohta, T Naruse, Y Ishida, H Shigeishi, M Takechi.
2. 発表標題 Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 promotes exogenous nucleic acid-mediated immune response via RIG-I / NF- B axis
3. 学会等名 第51回広島大学歯学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 大喜, 太田 耕司, 石田 陽子, 鳴瀬 貴子, 武知 正晃
2. 発表標題 口腔粘膜細胞における核酸の細胞内導入による ZAP の発現
3. 学会等名 第71回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞における抗菌ペプチドLL-37のendocytosisを介した核酸導入機構と炎症応答
3. 学会等名 第73回 NPO法人 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤大喜, 太田耕司, 佐久間美雪, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 抗菌ペプチドLL-37は口腔粘膜上皮細胞においてendocytosisを介し核酸を細胞内導入する
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武知 正晃 (Takechi Masaaki) (00304535)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授 (15401)	
研究分担者	重石 英生 (Shigeishi Hideo) (90397943)	広島大学・医系科学研究科(歯)・講師 (15401)	