

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17358

研究課題名(和文) 歯肉上皮のバリア機構におけるセリンプロテアーゼインヒビターの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Secretory Leukocyte Protease inhibitor on gingival epithelial barrier.

研究代表者

三森 香織(Mimori, Kaori)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00453647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Secretory Leukocyte Protease inhibitor(SLPI)は、好中球から分泌される酵素NE (Neutrophil Elastase)の活性を阻害する機能をもつセリンプロテアーゼインヒビターの一つである。SLPIは、創傷治癒の促進、抗菌活性、過度な炎症反応の抑制等多様な機能をもつことが報告されているが、歯周病病態における接合上皮のバリア機構でのSLPIの詳細なメカニズムについては十分に解明されていない。本研究では、Ca9-22細胞においてLPS刺激や炎症性サイトカイン刺激によるSLPIの発現の変化を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、歯肉上皮細胞Ca9-22において、LPS刺激や炎症性サイトカイン刺激によりSLPIの発現に影響を与えることが示唆された。歯肉上皮におけるSLPIの発現を検討することで、歯肉上皮のバリア機構におけるSLPIの役割を解明することにつながり、歯周病の予防・治療戦略に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Secretory Leukocyte Protease inhibitor (SLPI) is a potent inhibitor of serine protease secreted from neutrophils. It is known that SLPI plays an important role in the wound healing, anti-bacterial and anti-inflammatory properties. However, underlying mechanism have not been fully elucidated in junctional epithelium of periodontitis. In this study, we examined the effect of lipopolysaccharide (LPS), and inflammatory cytokines on the expression of SLPI in Ca9-22 cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：セリンプロテアーゼインヒビター 歯肉上皮

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

（1）歯肉上皮

歯周組織の最表層に位置する歯肉上皮は、接合上皮、口腔上皮、歯肉溝上皮の3種類に大別される。歯周病の初発病変は、歯周病原細菌と最初に遭遇する歯肉の接合上皮において認められる。侵入した細菌に対して好中球等が遊走し、抗菌タンパク等を分泌し、歯周組織を細菌感染から防御している。接合上皮は、物理的なバリアとして機能しており、その中でも好中球が深く関与していると考えられる。しかしながら、接合上皮と好中球との相互作用については、未だ解明されていないことが多い。

（2）マウス接合上皮での特異的な発現

申請者らの研究室では、レーザー・マイクロダイセクション法を用い、接合上皮の単離・回収に成功し、通常飼育マウスの接合上皮の網羅的遺伝子解析を行った結果、口腔上皮と比較して、分泌性白血球プロテアーゼ阻害剤 Secretory Leukocyte Protease inhibitor（SLPI）が、107.6倍高く発現した。また、免疫染色法にて、通常飼育マウス及び無菌飼育マウスにおいても接合上皮の外側基板から内側基板にかけて広く陽性細胞の存在を確認することができた（Hayashi et al., *J Periodontal Res.*, 2010）。

（3）SLPI

SLPIは、好中球から分泌される酵素 Neutrophil elastase の活性を阻害する機能をもつセリンプロテアーゼインヒビターの一つである。これまで肺、肝臓、脾臓、小腸の上皮細胞などから産生されることが明らかにされている。近年、SLPIは、創傷治癒の促進、抗菌活性、過度な炎症反応の抑制等多様な機能をもつことが報告された。

一方、口腔においては、SLPIが慢性歯周炎患者の歯肉溝浸出液中や唾液中に含まれることが示されている（S. W. Cox et al., *J Periodontal Res.*, 2006）。しかしながら、歯周病病態における接合上皮の感染防御機構でのSLPIのメカニズムについては十分に解明されていない。

2．研究の目的

本研究の目的は、歯肉上皮におけるSLPIの発現様式を検討することで、歯周病病態における接合上皮のバリア機構でのSLPIの役割を明らかにすることである。

3．研究の方法

（1）ヒト歯肉上皮細胞株（Ca9-22）を用いて、LPSで刺激し、total RNAを抽出し、逆転写反応を行い、cDNAを合成した。合成したcDNAを用いて、real-time PCRを行い、SLPIの遺伝子発現を定量的に解析した。また、LPSで刺激し、細胞培養上清を用いて、ELISA法にてSLPIのタンパク発現を評価した。

（2）LPS刺激時のCell viability assayを行い、細胞障害性を評価した。

（3）Ca9-22を用いて、炎症性サイトカインで刺激し、real-time PCR法を用いてSLPIの遺伝子発現を定量的に解析した。

（4）Ca9-22を用いて、TLR4のアンタゴニストを用いて、LPS刺激時におけるSLPIの遺伝子発現への影響を検討した。

4．研究成果

（1）ヒト歯肉上皮細胞株（Ca9-22）において、SLPIの遺伝子発現を認めた。LPSでの刺激時間によって、SLPIの遺伝子発現は変動を認めた。

LPS刺激において、LPS非刺激群と比較して、SLPIの遺伝子発現が増加傾向を認める場合の炎症性サイトカイン（IL-1β, IL-6）の遺伝子発現は、減少傾向を認めた。

（2）LPS刺激濃度での細胞生存率は、非刺激時と比較して変化は認められなかった。

（3）Ca9-22において、炎症性サイトカイン（IL-1β, TNF-α）刺激におけるSLPIの遺伝子発現は、増加傾向を認めた。

（4）Ca9-22において、LPS刺激時に、TLR4アンタゴニストを添加したところ、LPS非刺激時と比較して、SLPIの発現は変化が認められなかった。アンタゴニストに関しては、異なる試薬や条件等で再検討することとした。

これらの結果から、ヒト歯肉上皮細胞株においてSLPIの発現は認められ、歯周病の病態で認

められる LPS や炎症性サイトカイン刺激によって、SLPI の発現が変化することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----