

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10115

研究課題名(和文) SLPIが関与する接合上皮の感染防御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of SLPI in the defense mechanisms of gingival epithelium against infection

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：好中球から分泌される酵素の活性を阻害するセリンプロテアーゼインヒビターの一つであるSecretory Leukocyte Protease inhibitor(SLPI)は、近年、慢性関節リウマチや呼吸器疾患の動物モデルにおける治療効果が報告されている。しかしながら、SLPIと歯周病との関連は不明である。本研究では、ヒト歯肉上皮細胞株を用いて、LPSで刺激するとSlpiの発現の増加を認めた。LPS刺激下では、SLPIの制御によって細胞間接着に関わるE-cadherinの発現に変化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでSLPIと歯周病に着目した研究は、ほとんど報告されていない。本研究結果から、歯周病に対する接合上皮の防御機構においてSLPIが関与していることが示唆された。今後更なるSLPIに係るメカニズムの解明により、歯周病の予防、治療戦略構築のための有用なターゲットになり得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a serine protease inhibitor that inhibits the activity of enzymes secreted from neutrophils, has been reported to be effective in treating rheumatoid arthritis and respiratory disease in animal models in recent years. However, the relationship between SLPI and periodontal disease remains unclear. In this study, using a human gingival epithelial cell line, we found that stimulation with LPS increased the expression of Slpi. Under LPS stimulation, we found that the expression of E-cadherin, which is involved in cell-cell adhesion, was altered by the regulation of SLPI.

研究分野：歯周病学

キーワード：SLPI 歯肉上皮

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

歯周病は、口腔内の歯周病原細菌の感染によって、歯周組織の破壊を伴う慢性炎症性疾患である。歯周組織の最表層は、接合上皮、口腔上皮、歯肉溝上皮の3種類の歯肉上皮に大別される。接合上皮は、侵入した歯周病原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おり、物理的なバリアの最前線として機能している。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) マウス接合上皮における SLPI の特異的な発現

申請者が所属する研究室では、レーザー・マイクロダイセクション法を用い、接合上皮の単離と回収に成功した。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)。口腔常在菌の有無に関わらず、接合上皮において、SLPI が分泌され、自己の組織を保護する機構が存在することが推測された。

(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。これまで鼻腔粘膜、上気道粘膜、腸粘膜、皮膚表皮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彩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, Nugteren et al., *Cytokine and growth factor reviews*, 2021)。しかしながら、歯周病病態での接合上皮の感染防御機構における 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 の役割を検討することで、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、*Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS で刺激し、CCK-8 assay にて細胞生存率を評価し、LPS 濃度を検討した。

(2) LPS 存在・非存在下で、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 で刺激後、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。Slpi の遺伝子発現については、炎症性サイトカイン (IL-1B, TNF- α) 刺激においても定量的に解析した。

(3) LPS 存在下で、rhSLPI を添加し、real-time PCR 法を用いて E-cadherin、IL-6 の遺伝子発現を定量的に解析した。

(4) siRNA を用いた Slpi 遺伝子ノックダウンによる LPS 存在下での Ca9-22 の細胞増殖に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) において、*Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS 存在・非存在下では、細胞生存率に有意差は認められなかった。本研究では 1 μ g/ml、10 μ g/ml を用いることとした。

(2) real-time PCR 法を用いて LPS 存在下で Slpi 遺伝子の発現について検討したところ、Slpi の発現の増加を認めた。また、炎症性サイトカイン (IL-1B, TNF- α) 刺激により、Slpi の遺伝子発現の増加を認めた。

(3) これまで E-cadherin は接合上皮において発現が認められ、構造安定性を維持するために重要であることは報告されている。そこで rhSLPI を添加したところ、非添加と比較すると E-cadherin の遺伝子発現は増加を認めた。LPS 存在下では rhSLPI 添加により E-cadherin の遺

伝子発現の増加を認め、IL-6 の遺伝子発現の増加を認めた。

siRNA を用いた Slpi 遺伝子ノックダウンによる実験系は、更なる条件検討を要するが、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。また、SLPI はヒト歯肉上皮細胞株において、細胞間接着や炎症性サイトカインの発現に關与す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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------