

機関番号：34408
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21792137
 研究課題名（和文） Beta-defensin-2 産生による歯周自然免疫活性化機構のメカニズム解析
 研究課題名（英文） Analysis of the periodontal natural immunity activation mechanism by Beta-defensin-2 production
 研究代表者
 田口 洋一郎（TAGUCHI YOICHIRO）
 大阪歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：60434792

研究成果の概要（和文）：ヒト beta-defensin-2 (hBD-2) は、上皮細胞から放出される抗菌ペプチドの一つであり、グラム陰性菌に対してより強い抗菌作用を示し、粘膜表面での初期防御に関与する。

我々は過去に慢性歯周炎でよく検出される *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*)で刺激した HGEC から hBD-2 が刺激時間に応じて発現することを明らかにした。しかし、歯周疾患が慢性疾患であり増悪期と緩解期を繰り返すことから考えると病態変化における hBD-2 の役割はまだ不明である。そこで今回、*P. gingivalis* の濃度によって hBD-2 の発現と IL-8 の発現との関連性について比較検討した。

その結果、*P. gingivalis* は HGEC において経時的に IL-8 および hBD-2 の発現を有意に上昇させ、それらは経時的に関連性が認められたが、刺激濃度に依存する発現の差異は認められなかった。したがって、刺激時の HGEC における IL-8 および hBD-2 の発現は炎症の強さに関わらず炎症性因子が存在すれば生じ、感染初期における自然免疫機構の一端を司ることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Human β -defensin-2 (hBD-2) is one of antimicrobial peptides produced by epithelium cells after stimulation by microorganisms and inflammatory mediators. We reported that expression of hBD-2 mRNA in HGEC was *P. gingivalis*-dependently induced according to stimulation time and was connected with the initial stage of inflammatory responses after infection by pathogenic periodontal bacteria, with ultimately migration of neutrophils to infection sites. We investigated the difference between the expression of hBD-2 and the production of IL-8 in HGEC stimulated with various concentrations of *P. gingivalis* by RT-PCR and ELISA. Although the levels of hBD-2 mRNA and IL-8 production stimulated with *P. gingivalis* tended to increase with exposure time, the levels were not significantly changed by variations in concentration. These findings suggest that the expression of hBD-2 and IL-8 was observed in *P. gingivalis*-stimulated HGEC regardless of the severity of the inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：ペプチド、上皮細胞、炎症、歯周病治療

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は大学院の学位に関する研究で、指導教授より歯周病原菌と歯肉上皮細胞を用いてポケット上皮表層に起こる初期免疫の解明についてのテーマを与えられ、学位論文 (Expression of β -defensin-2 in human gingival epithelial cells in response to challenge with *Porphyromonas gingivalis* in vitro. Journal of Periodontal Research, 2006 ; 41 : 334-339.) で炎症性サイトカインである IL-8 の産生と Human β -defensin-2 mRNA との発現の経時的な相関性が *P. gingivalis* 感染の有無によって異なることを証明した。すなわち、歯肉上皮細胞からの Human β -defensin-2 mRNA の発現は *P. gingivalis* 依存性に認められ、その発現は炎症の初期反応と連動しているとの示唆を得ている。

ヒト beta-defensin-2 (hBD-2) は、抗菌ペプチドの一つであり、微生物および炎症性サイトカインによる刺激で上皮細胞から放出され、歯周病原菌をはじめとするグラム陰性菌に対して、より強い抗菌作用を示し、粘膜表面での初期防御に関与する。成人性歯周炎の原因菌である *P. gingivalis* を用いて、好中球走化作用を有するケモカイン IL-8 と β -defensin-2 の相関性を検討することにより、好中球誘導における自然免疫系の強化作用を立証したいと考えている。 β -defensin-2 の好中球誘導能については、Niyonsaba (Human β -defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor- α -treated human neutrophils. Immunology 2004;111:273-281.) が証明しているが、自然免疫系の強化作用が立証されれば、リコンビナントタンパクの投与もしくは塗布することによる新しい治療法の開発、最終的には現在一般開業医でもよく行なわれている対処療法の一つである局所薬物配送システム (LDDS : ペリオクリン®) をはじめとする抗菌療法) の一つの選択肢としてプラークコントロールの一方法として確立し、抗菌ペプチドによる自然免疫系の賦活化を目標とした薬剤の開発に向けて道が開けるものと考えられる。

2. 研究の目的

ヒト β -defensin-2 (hBD-2) は、システムに富む陽イオンの抗菌ペプチドの一つであり、グラム陽性菌よりも歯周病原菌に代表される *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) などのグラム陰性菌に対して、より強い抗菌作用を示す。hBD-2 は微生物および TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカ

インによる刺激で上皮細胞から放出され、粘膜表面での初期防御に関与する。

正常歯肉および歯周病罹患歯肉における hBD-2 の発現の相違や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* に対するヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) の応答性についての報告はなされている。また、我々は第 48 回秋季日本歯周病学会学術大会において成人性歯周炎でよく検出される *P. gingivalis* で刺激された HGEC からの hBD-2 の経時的な発現およびその発現と HGEC からの炎症性サイトカインの発現との関連性について発表した。そこで今回、*P. gingivalis* の濃度によって hBD-2 の発現と炎症性サイトカインである IL-8 との発現との関連性に差があるのかどうかについて経時的に比較検討した。

3. 研究の方法

(1) 歯周病原菌 被検菌株 : サンスター (株) から供与された *P. gingivalis* ATCC33277 を用いた。

(2) HGEC の培養 : HGEC は、本学附属病院歯周治療科で、歯周外科治療時に採取された歯肉より分離し、Matsuyama らの方法 (1999) に従い継代培養し、3 代目を実験に供した。なお、実験にあたっては大阪歯科大学医の倫理委員会の承認を得て行った。

(3) 細菌懸濁液の調製 : *P. gingivalis* は CDC 血液寒天培地にて培養後、0.5% Yeast Extract, 0.001% Vitamin K₁, 0.0005% Hemin を添加した BHI 液体培地に移し、培養した。その液体培地を 0.1% gelatin を含む HBSS と混合し、分光光度計にて 540 nm で濃度勾配を施して調製し、上皮細胞用培養液 Keratinocyte-SFM (Gibco) で 10 倍希釈し実験に供した。

(4) HGEC への *P. gingivalis* の感染 : TYPE I collagen coating 24 穴プレートに準備したヒト歯肉上皮細胞を 5×10^4 個播種し、*P. gingivalis* 刺激群および無刺激群として、1, 3, 6, 24, 48, 72 時間それぞれ培養し、培養上清と細胞について検索した。

(5) hBD-2 の発現の検出 : AGPC 法にて細胞より total RNA を回収、精製し、RT-PCR 法にて hBD-2 mRNA の発現について調べた。

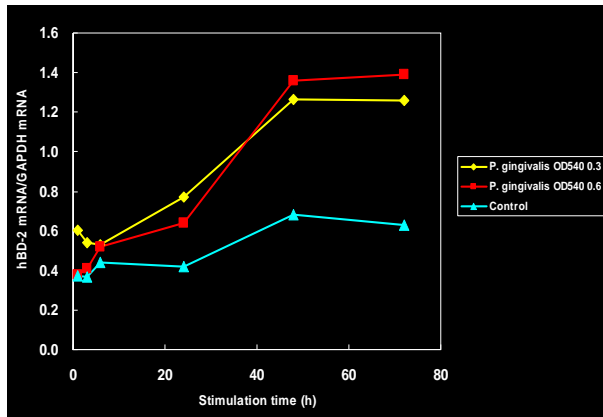
(6) 炎症性サイトカインの発現の検出 : 培養上清を回収し、ELISA 法にて上清中の IL-8 の濃度を測定した。

4. 研究成果

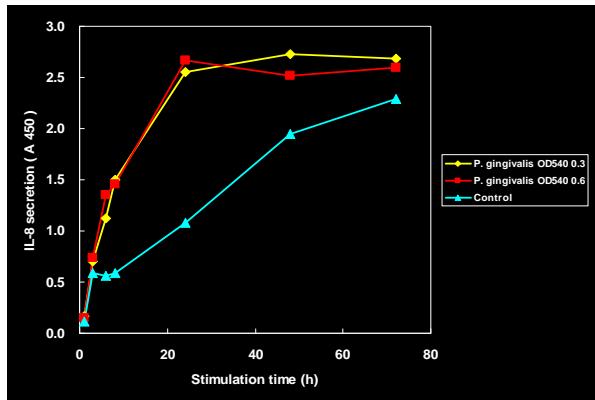
(1) *P. gingivalis* 刺激群では経時的に hBD-2 mRNA の発現に関して増加傾向が認められ

たが、無刺激群では認められず、*P. gingivalis* 刺激群は無刺激群に比べて 48, 72 時間において有意な差が認められた。

(2) *P. gingivalis* 刺激群では hBD-2 mRNA の発現に関して、濃度の相違による有意差は認められなかった。



(3) IL-8 の発現について経時的に増加傾向が認められ、6 時間以降において *P. gingivalis* 刺激群と無刺激群との間に有意な差は認められたが、*P. gingivalis* 刺激群において濃度依存的な有意差は認められなかった。



以上の結果から、炎症性サイトカインである IL-8 の発現と hBD-2 の発現は相関し、*P. gingivalis* の存在によって、それらの発現は有意に高く、経時的にも増加したが、*P. gingivalis* の濃度とは関係がなかった。したがって、IL-8 と hBD-2 との発現は *P. gingivalis* 感染の有無がキーポイントになっていることが示唆される。

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 3 件)

①田口 洋一郎, 安井 菜津希, 富永 和也, 橋本 典也, 至田 宗泰, 玉置 敏夫, 北條 博一, 武田 昭二, 林 宏行, 田中 昭男, 上田 雅俊.

ヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響から考えるエナメルマトリックスデリバティブ由来合成ペプチドの有用性.

日本歯科保存学雑誌 (査読有) 2010 ; 53 : 449-456.

②Muneyasu Shida, Tadahiko Baba, Hirotaka Kon' i, Yoichiro Taguchi, Masatoshi Ueda and Hiroyuki Hayashi.

Effectiveness of calcium hydroxide on LPS-induced hard tissue resorption.

Journal of Osaka Dental University (査読有) 2010 ; 44 : 145-150.

③Masahiro Wato, Hirotaka Kon-i, Yoichiro Taguchi, Masatoshi Ueda, Ken-ichi Uobe, Kazuya Masuno, Kazuya Tominaga, Tetsunari Nishikawa and Akio Tanaka.

Double-immunostaining of p63 protein and cytokeratin 8 in pleomorphic adenoma.

Oral Medicine & Pathology (査読有) 2009;14(2):49-54.

〔学会発表〕(計 2 件)

① Yasui N, Taguchi Y, Tominaga K, Hashimoto Y, Terada S, Takeda S, Tanaka A, Ueda M. In vitro effects of EMD-derived oligopeptides on human epithelial cells. International Association for Dental Research 2010 Annual Meeting

2010 年 7 月 10 日, スペイン・バルセロナ

②田口 洋一郎, 安井 菜津希, 富永 和也, 田中 昭男, 上田 雅俊. EMD由来合成ペプチドのヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響から考える至適濃度.

日本歯科保存学会平成 22 年度春季学術大会 2010 年 6 月 4 日, 熊本市

〔図書〕(計 1 件)

①鴨井 久一, 上田 雅俊, 田口 洋一郎 第 23 章 抜歯窩保存術 第 24 章 乳頭再建術 審美再建歯周外科カラーアトラス/E.S.

コーエン編 第3版 西村書店 2009:387-413.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 洋一郎 (TAGUCHI YOICHIRO)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60434792