

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593041

研究課題名(和文) 自然免疫能賦活化を期待した新規創傷治癒用レジン剤の開発

研究課題名(英文) Development of new resin seal in wound healing using activation of innate immunity.

研究代表者

齊藤 正人 (SAITOH, Masato)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50337036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、活性型ビタミンD3添加による化学的防御機構への影響および、口腔内創傷治癒促進への効果の検討を行った。活性型ビタミンD3を添加することにより、化学的防御機構に關与する抗菌ペプチドの上昇を認め、上皮の分化傾向を示すことが明らかになった。また、活性型ビタミンD3添加軟膏により、創傷治癒の促進がみられた。本結果から活性型ビタミンD3は、口腔粘膜の保護および治癒に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated whether vitamin D affect the promotion of wound healing, and the resistance to bacterial infection as chemical barriers in oral epithelium. Expression of antimicrobial peptides in epithelial keratinocyte cells were upregulated by the stimulation with vitamin D, indicating that vitamin D induced keratinocyte differentiation and barrier function. Wound healing of the rat oral mucosa was promoted to apply ointment supplementation of vitamin D. The results indicate that the application of vitamin D is efficacious of the wound healing and the barrier function in oral epithelium.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：抗菌ペプチド ビタミンD

### 1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜上皮は皮膚と同じく、重層扁平上皮からなり、下層から基底層、棘細胞層、顆粒層、そして角化層で構成されている。特に口蓋、歯肉および舌背など、食物などの物理的刺戟が強い部位は角化傾向が亢進しており、バリアー（機械的防御機構）として外界からの刺戟や病原微生物の内部環境への侵入を防いでいる。さらに口腔粘膜上皮からは種々の抗菌ペプチドが産生されており、細菌の増殖や活動を抑制し（化学的防御機構）、口腔内の保護に重要な役割を担っている。口腔粘膜上皮から産生される抗菌性ペプチドには、ディフェンシンやカセリディン等がある。歯肉弁などから切除採取した小児歯肉におけるディフェンシン-2の発現および局在は、口腔上皮角化層直下の顆粒層と有棘層上層にあることが知られている。また、ディフェンシン-1、-2、-3の発現と歯肉の炎症程度を比較した結果、炎症の程度とディフェンシン-2、-3の発現が有意に関連しており、ディフェンシンの発現は歯肉炎と密接に関わりがある。

生体が産生する抗菌性ペプチドは、細菌やウイルスなど病原微生物の認識機構である Toll-like receptor (TLR) などと併に生体の原始的な免疫機構、すなわち自然免疫機構と呼ばれており、記憶機能を備えた獲得免疫とは分けて考えられ、初期の感染防御機構に重要な役割を演じている。

口腔領域における活性型ビタミン D3 を用いた研究は、骨代謝に関わるもののみであり、口腔粘膜に関する報告はない。口腔粘膜上皮と同じ重層扁平上皮で覆われている皮膚では、活性型ビタミン D3 が上皮細胞の増殖・分化に影響し、さらに上皮細胞による細胞の認識および抗菌性ペプチドであるカセリディシンの産生という自然免疫機構において重要な役割を担っているという報告があり、外傷や感染に対しての活性型ビタミン D3 の効果について臨床試験を始めている段階にある。

小児の口腔粘膜重層扁平上皮は成人と比較し、角化が乏しく細胞間結合も疎であり分化の途中にあると考えられている。外傷やアフタ性口内炎などにより口腔粘膜が損傷を受けた場合、上皮の分化を促すことにより、病原微生物やそれらが産生する毒素の侵入を防ぐ機械的防御機構とともに、抗菌性ペプチドの発現による化学的防御機構も同時に亢進することが予想される。

### 2. 研究の目的

小児の口腔粘膜重層扁平上皮は成人と比較し、角化が乏しく細胞間結合も疎であり分化の途中にある。外傷やアフタ性口内炎などにより口腔粘膜が損傷を受けた場合、上皮の分化を促すことにより、病原微生物やそれらが産生する毒素の侵入を防ぐ機械的防御機構とともに、抗菌性ペプチドの発現による

化学的防御機構も同時に亢進することが予想される。本研究では口腔粘膜上皮の創傷治癒を促進させ、抗菌性ペプチドの分泌を促す活性型ビタミン D3 の効果を正常上皮角化細胞で検討する。そして更に微量の活性型ビタミン D もしくは抗菌性ペプチドを含有した接着性レジンを作製し、口腔内創傷保護および治癒促進のための生体材料開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 細胞培養

正常ヒト角化細胞 Neo-Human Epidermal Keratinocyte(以下、NHEK)を用い、培養液は KBM (Lonza) で、CO<sub>2</sub> 5%、37.0 で培養した。

#### 2) 活性型ビタミン D3 添加による増殖および分化能の測定

NHEK 細胞に活性型ビタミン D を 1~100nM 濃度範囲で添加し、1~3 日間培養し、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit(Invitrogen) を用いて、Fluorescence microplate reader にて測定した。

分化能は、上皮細胞の分化マーカーである Keratin 10 と Keratin14 抗体により免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡により比較検討した。

#### 3) ディフェンシン-1、-2、-3 とカセリディシンの遺伝子発現

活性型ビタミン D 添加培養した NHEK は、Trizol Reagent により通法に従い Total RNA を抽出後 cDNA 合成した。cDNA は、ディフェンシン-1、-2、-3 とカセリディシンの特異的プライマーにより定量的 RT-PCR 法により解析した。

#### 4) ディフェンシン-1、-2、-3 とカセリディシンのタンパク発現

NHEK は、チャンバースライド上にて抗活性型ビタミン D 添加培養し、4%パラホルムアルデヒド溶液により固定した。固定後、ディフェンシン-1、-2、-3 とカセリディシンに対するポリクロナール抗体を用いて、サンドウィッチ法 ELISA により測定した。

#### 5) ラット舌下面創傷に対する活性型ビタミン D 軟膏の効果

マウスは、C57 雄マウスを用いた。いずれも 4 週齢で購入し室温 23±1、湿度 60±5% で 15 週齢まで飼育した。飼育中は固形飼料を飲料水と共に自由摂取とした。動物の処置および管理は北海道医療大学動物実験規定に基づいて行われた(承認番号 004)。

マウス舌への創傷付与は、Disposable Biopsy Punch を用いた。エータルによる浅麻酔後、各マウス舌背部に舌下部まで貫通させ直径 2mm 大、円形の創傷を付与した。付与したマウスは、活性型ビタミン D3 類縁体で

ある 2 µg/g 含有 1,24-ジヒドロキシビタミン D3 軟膏を塗布し、72 時間後にジエチルエーテルの過剰吸引により深麻酔後、頸椎脱臼により安楽死させ舌を摘出した。摘出した舌は、直後に創傷付与部の写真撮影をおこない Image J にて面積を計測した。

#### 4. 研究成果

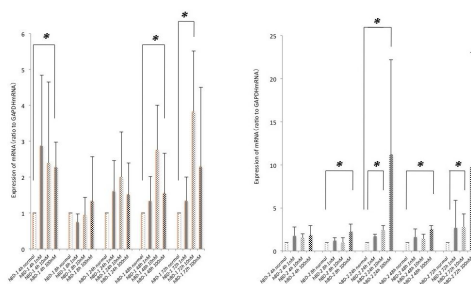
##### 1) 活性型ビタミン D3 添加による増殖および分化能の測定

NHEK に活性型ビタミン D3 を 100nM 添加することにより、48 時間以降に有意な細胞増殖が認められた。NHEK に活性型ビタミン D3 を 100nM 添加することで 48 時間以降に keratin14 の発現低下を認めた。また、活性型ビタミン D3 を 10nM および 100nM 添加することで 8 時間以降に keratin10 の発現上昇が認められた。

##### 2) ディフェンシン-1、-2、-3 とカセリディシンの遺伝子発現

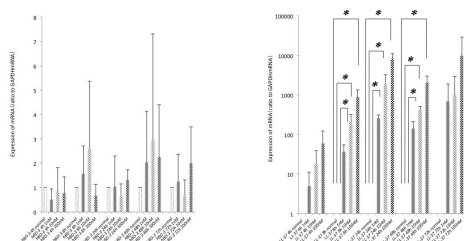
活性型ビタミン D3 を添加した際、NHEK における hBD-1、-2、-3 および LL-37 の mRNA の発現変化を観察するために定量的 RT-PCR 法を行った。

その結果、活性型ビタミン D3 非添加に比べ、hBD-1 は活性型ビタミン D3 添加後 4 時間における 100nM、48 時間における 10nM、および 72 時間における 10nM にてそれぞれ有意な上昇が認められた。hBD-2 は 8 時間の 100nM、24 時間における 10nM および 100nM、48 時間における 100nM、72 時間における 10nM においてそれぞれ有意な上昇が認められた。hBD-3 は全ての時間および濃度において有意な差は認められなかった。LL-37 は 8 時間、24 時間、48 時間および 72 時間における全ての濃度で、著明な有意な上昇が認められた。



hBD-1

hBD-2

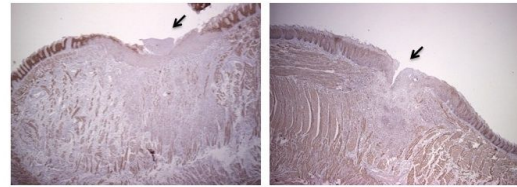


hBD-3

LL-37

##### 3) ラット舌下面創傷に対する活性型ビタミン D 軟膏の効果

マウスの創傷治癒を比較すると、1,24-ジヒドロキシビタミン D3 軟膏を塗布したマウスでは、創傷部面積の有意な減少を認めた。



コントロール

VD レジン付与



コントロール



VD レジン付与

#### 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) Uehara O, Abiko Y, Saitoh M, Miyakawa H, Nakazawa F. : Lipopolysaccharide extracted from Porphyromonas gingivalis induces DNA hypermethylation of runt-related transcription factor 2 in human periodontal fibroblasts. J Microbiol Immunol Infect. 2014 Jun;47(3):176-181. (査読有)

2) Sato J, Nishimura M, Yamazaki M, Yoshida K, Kurashige Y, Saitoh M, Abiko Y: Expression profile of drosomycin-like defensin in oral epithelium and oral carcinoma cell lines. Arch Oral Biol. Mar;58(3):279-285, 2013. (査読有)

3) 倉重 圭史, 村井 雄司, 首藤 かい, 村田 佳織, 山崎 さや夏, 林 良宣, 永易 裕樹, 安彦 善裕, 齊藤 正人: マラッセ上皮遺残細胞

における細胞増殖の特異性，北海道医療大学  
歯学雑誌 32 巻 2 号 P17-23 ,2013 ( 査読有 )

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 正人 (SAITOH, Masato)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：50337036

### (2) 研究分担者

安彦 善裕 (ABIKO, Yoshihiro)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：90260819

疋田 一洋 (HIKITA, Kazuhiro)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号：20238281

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：