

平成 2 6 年 5 月 3 0 日現在

機関番号： 3 2 6 2 2

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2012 ~ 2013

課題番号： 2 4 8 9 0 2 4 4

研究課題名（和文）付着上皮は唾液腺分泌抗菌タンパクによる感染防御機構を持つ

研究課題名（英文）The infection defense mechanism by salivary gland secretion antibacterial proteins in the junctional epithelium

研究代表者

西井 浩介（Nishii, Kousuke）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号： 8 0 6 3 4 8 5 7

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円、（間接経費） 690,000 円

研究成果の概要（和文）：レーザーマイクロダイセクション法により回収したマウスの付着上皮、口腔上皮を用いて、唾液腺分泌抗菌タンパクであるプロラクチン誘導タンパク（PIP）の半定量リアルタイムPCR解析による遺伝子発現解析を行った。その結果、通常飼育されたコンベンショナルマウスの付着上皮で口腔上皮と比較して発現が有意に高い事が明らかとなった。ヒト口腔内上皮培養細胞におけるLPS刺激後のPIPの発現は刺激後24時間で最も発現が高かった。また、免疫組織化学解析の結果、コンベンショナルマウスと無菌状態で飼育されたジャームフリーマウスのそれぞれの付着上皮でPIPの発現が認められたが、口腔上皮では発現が認められなかった。

研究成果の概要（英文）： A quantitative analysis of Proractin induced protein(PIP) mRNA in junctional epithelium (JE) and oral gingival epithelium (OGE) of both conventional mice and germ-free mice was performed using laser microdissection and real-time polymerase chain reaction. Real-time PCR analysis indicated that PIP expressions were mainly detected in JE of conventional mice not detected in OGE. Expression of PIP after LPS stimulation in cultured human oral epithelial cells was higher expression most 24 hours after stimulation. Further, the results of immunohistochemical analysis, expression of PIP was observed in JE of each of the conventional mice and germ-free mice, expression was not observed in the OGE, respectively.

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： 歯周病 付着上皮 レザーマイクロダイセクション プロラクチン誘導タンパク

1. 研究開始当初の背景

(1) 付着上皮について

歯肉上皮は付着上皮、歯肉溝上皮、口腔上皮の3種類に分類され、付着上皮は生体内で唯一硬組織と接している上皮組織である。特徴としては他の歯肉上皮と異なり、非角化であるため防御性が非常に低いと言われているが、ターンオーバーが非常に短く、細胞間隙が広いこと、その間隙を歯肉溝滲出液の通過、好中球やマクロファージなどの免疫細胞、抗菌タンパクが存在する事で歯周組織を細菌感染から防御している [Bosshardt DD et al *J Dent Res*, 84:9-20, 2005]。また、付着上皮は歯周病の初期病態が起こる部位であり、歯周組織の再生・治癒を考える上で重要な組織であると考えられている。しかしながら、付着上皮は細胞数が非常に少なく、硬組織に付着しているため、研究のターゲットとして非常に困難な組織であり、未だに未解明な部分が多い。したがって、付着上皮の感染防御メカニズムを明らかにする事は歯周疾患の予防、歯周組織再生治療など、新たな治療法を確立する上で重要な課題となっている。

(2) レーザーマイクロダイセクション法を用いた新たな付着上皮の採取方法

申請者らの研究グループでは、通常環境下で飼育されたコンベンショナルマウスから歯・付着上皮の連続した非脱灰凍結切片を作成する事に成功し、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、付着上皮組織のみを採取する事に成功した [Hayashi et al *J Periodontal Res*, 45:615-25, 2010]。

(3) 付着上皮の網羅的遺伝子解析

このレーザーマイクロダイセクション法を用いたマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った結果、コンベンショナルマウスにおいて抗菌タンパクであるセリンプロテアーゼインヒビター (SLPI) が口腔上皮と比

較して、付着上皮で発現が高い事が明らかとなった [Hayashi et al *J Periodontal Res*, 45:615-25, 2010]。また、無菌状態で飼育されたジャームフリーマウスから同様の方法でマイクロアレイ解析を行なった結果、コンベンショナルマウス・ジャームフリーマウスの両者の付着上皮において分泌抗菌タンパクである S100A8、S100A9 が口腔上皮と比較して付着上皮で特徴的に発現している事が明らかとなった。S100A8/S100A9 複合体のヘテロダイマーであるカルプロテクチンはキレート作用を有する抗菌タンパクであり、カルプロテクチンは歯周組織の感染防御メカニズムにおいて重要な役割を担っている事が示唆された [Nishii et al *J Periodontal Res*, 48:235-42, 2013]。

また、唾液腺で主に発現が認められ、乳腺、涙腺にも発現が認められるプロラクチン誘導タンパク (PIP) が口腔上皮と比較してコンベンショナルマウス付着上皮で約 69.4 倍、ジャームフリーマウス付着上皮で約 0.8 倍高い事が明らかとなった。他にも唾液腺、口蓋粘膜、鼻粘膜、肺や胸腺などの上気道粘膜で主にその発現が認められている LPLUNC タンパクファミリーのうち、Bpi13 (LPLUNC6) も口腔上皮と比較してコンベンショナルマウス付着上皮で約 8.5 倍高い事が明らかとなった。

以上の事から、付着上皮では細菌感染に対する多くの抗菌タンパクが存在するが、外分泌腺である唾液腺と共通の抗菌タンパク (PIP、Bpi13 など) の発現は報告がなく、その詳細な機能、発現については明らかとなっていない。

(4) 本研究に至った背景

申請者および申請者の研究グループはこれまでに付着上皮の感染防御メカニズムについて以下の実験結果を得ている。

歯・口腔上皮が連続した非脱灰凍結切片の作成とレーザーマイクロダイセクション法を用いた付着上皮の新たな採取方法を確立している [Hayashi et al *J Periodontal Res*, 45:615-25 45:615-25, 2010]。

付着上皮の網羅的遺伝子解析の結果、SLPI や S100A8, S100A9 など多くの抗菌タンパクが付着上皮で発現している事が明らかとなり、口腔内常在菌非存在下でも抗菌タンパクが発現している事から、付着上皮に特異的な抗菌タンパクによる感染防御メカニズムが存在する可能性が示唆されている [Nishii et al *J Periodontal Res*, 48:235-42, 2013]。

付着上皮の網羅的遺伝子解析の結果、多くの抗菌タンパクが口腔上皮と比較して付着上皮で発現が高いことが明らかとなった。その中でも、唾液腺だけでなく、口腔周囲組織の外分泌腺から分泌されるいくつかの抗菌タンパクが口腔上皮と比較して付着上皮で発現が認められる事から、外分泌腺抗菌タンパクによる感染防御機構の存在が考えられる。

2．研究の目的

付着上皮における外分泌腺抗菌タンパクである感染防御機構を解明するため、唾液腺抗菌タンパクである PIP のマウス付着上皮における発現と分布を解析する。

3．研究の方法

(1) サンプル採取

本研究では4週齢のコンベンショナルマウス、ジャームフリーマウスを3匹ずつ使用した。ジエチルエーテルで屠殺後、マウス頭部全体を取り出し、処理後、OCT コンパウンド内にイソペンタン、液体窒素を使用し、凍結包埋した。包埋後、厚さ 16 μ m の連続した非脱灰凍結切片を作成し、遺伝子解析のために使用した。

(2) レーザーマイクロダイセクション

(1) で作成した組織切片を zinc-fix 溶液で固定し、LCM Staining Kit で染色した。その後、レーザーマイクロダイセクションを使用し、付着上皮、口腔上皮をそれぞれ回収した。

(3) 細胞培養

初代培養ヒト口腔内上皮細胞 (HOK) を OKM (FBS10%) にて培養し、24 時間、48 時間後に、LPS 刺激を行った。

(4) 半定量リアルタイム PCR 解析

(2) で回収したサンプルおよび(3) で刺激したヒト口腔内上皮細胞から mRNA 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 GAPDH をコントロールとして半定量リアルタイム PCR 解析を行った。

(5) 免疫組織化学

4 週齢のコンベンショナルマウスを屠殺後、下顎骨を取り出し、4%パラホルムアルデヒド溶液 (6 時間) で固定した。固定後、10% EDTA で脱灰 (2 週間 4) し、シュクロース置換処理を行った。

その後、OCT コンパウンド内にイソペンタン、液体窒素を使用し、凍結包埋した。包埋後、頬舌方向に厚さ 5 μ m の脱灰凍結切片を作成し、-20 で保存した。

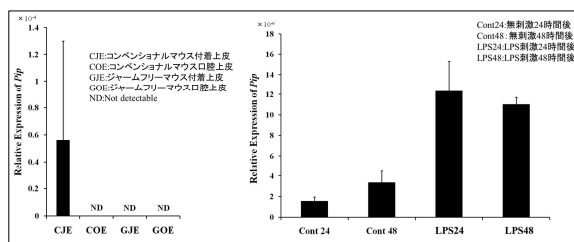
保存した脱灰凍結切片を 10 分間風乾し、TBS で洗浄 (5 分間 \times 3 回) し、内因性ペルオキシターゼ活性の除去 (室温 15 分間)、ブロッキング処理 (室温 10 分間) を行った。

処理後、一次抗体として抗 PIP ヤギポリクロナル抗体 (1:100 室温 1 時間) を使用し、インキュベーションした。洗浄後、二次抗体として HRP、抗ヤギ IgG、抗体 (Alxea594) を使用した。対比染色にはヘマトキシリン染色、DAPI 染色を行った。

4．研究成果

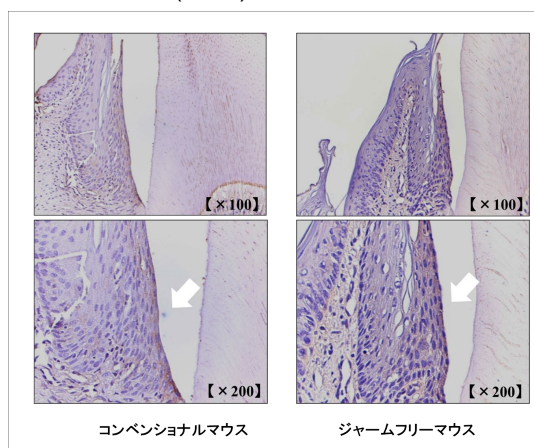
(1) 判定量性リアルタイム PCR 解析による遺伝子発現解析

判定量性リアルタイム PCR 解析の結果、マウス付着上皮において PIP の発現はコンベンショナルマウス付着上皮にのみ発現が認められた。培養口腔内上皮細胞ではコントロール群と比較して LPS 刺激群の方が有意に高かった。また、刺激後 24 時間、48 時間では刺激後 24 時間の方が発現が有意に高かった。

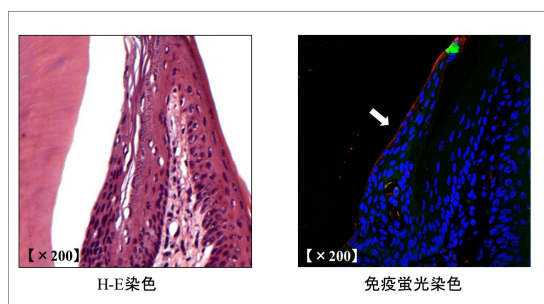


(2) 免疫組織化学

免疫染色の結果、ジャームフリーマウス、コンベンショナルマウスの付着上皮で発現が認められた。(矢印)



また、遺伝子発現が見られなかったジャームフリーマウスにおける PIP のタンパク質の局在を確認するため、免疫蛍光染色を行った。その結果、ジャームフリー付着上皮においても発現が認められた。



これらの結果から、付着上皮において唾液腺分泌抗菌分泌タンパクである PIP は口腔内在菌の非存在下においても発現が認められることから、付着上皮に特徴的な抗菌タンパクである事が示唆された。

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 0 件)

〔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 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

西井浩介 (Nishii Kousuke)

昭和大学・歯学部・助教 (員外)

研究者番号 : 80634857