

平成20年6月15日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592410
 研究課題名（和文） 口腔自然免疫システムにおける歯周病原性細菌感染防御機構の検討
 研究課題名（英文） Prevent of oral anaerobe infection by innate immune system
 研究代表者
 廣瀬 公治 (HIROSE KIMIHARU)
 奥羽大学・歯学部・教授
 研究者番号：10218836

研究成果の概要：口腔における自然免疫システムがどのように制御されているかを検討したところ、炎症性サイトカインである TNF- α と、ビタミンであるレチノール酸が自然免疫系において重要な抗菌タンパク質の産生を口腔歯肉細胞から誘導することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：口腔衛生学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯学、感染症、免疫学、歯周病

1. 研究開始当初の背景

自然免疫を担う抗菌タンパク質のひとつである CAP18/LL37 が、in vitro において口腔偏性嫌気性菌に対する抗菌活性を持つことを明らかにした。そこで、in vivo においてはどのようなメカニズムでその産生が制御されているかに興味を持った。

2. 研究の目的

口腔の自然免疫の機能を掌る物質のひとつとして、カテリシジンファミリーの抗菌ペプチドである CAP18/LL37 がある。この CAP18/LL37 は、好中球はもとより口腔上皮細胞から産生されることが示されており、ヒトの自然免疫系における口腔感染防御機構に

強く関与していることが示唆されている。

一方、液性の自然免疫を掌る物質としては $\beta 2$ ディフェンシンが有力視されている。しかしながらこのディフェンシンは外的環境、とりわけ pH の変動によりその抗菌活性が阻害されるなど、外的要因を受けやすい口腔において、そのきのうそこで本研究では、CAP18/LL37 が歯周病原性細菌の慢性持続感染成立阻害因子として自然免疫系が作用していることを確認するとともに、この CAP18 の口腔上皮における発現の個体差が歯周疾患の感受性ならびに慢性化に関与しているかを検討する。これを目的とした。

3. 研究の方法

歯肉上皮細胞として Ca9-22 を用いた。単層を形成した同細胞に対し所定の濃度の炎症性サイトカイン及びビタミン A を添加し培養を継続した。所定の時間培養後、細胞からトータル RNA を回収し、抗菌ペプチドである CAP18/LL37 の発現を RT-PCR により m-RNA の発現を、またタンパクレベルの発現はウエスタンブロットにより計測した。

4. 研究成果

(1) 歯肉上皮細胞からの CAP18/LL37 の発現

歯肉上皮細胞から CAP18/LL37 が発現されているか否かについてまず検討した。その結果、今回用いた歯肉上皮細胞である CA9-22 は弱いながらも自発的に CAP18/LL37 を発現していた (図 1)。



図 1 Ca9-22 からの CAP18/LL37 タンパクの発現

一方、同様にヒト歯肉上皮系細胞である KB について同様の検索を行ったところ、KB からの CAP18/LL37 の発現は認められなかった。

(2) 炎症性サイトカインによる Ca9-22 からの CAP18/LL37 発現誘導

歯周炎局所においては TNF- α などの炎症性サイトカイン産生が促進される。このようなサイトカインが CAP18/LL37 産生に与える影響について検索を行った。

まずはじめに、Ca9-22 に対し歯周病の発症と進行に重要な役割を果たしている炎症性サイトカインである IL-1 α 、IL-1 β 及び TNF- α が抗菌ペプチドを誘導するか否かについて検討を行った。その結果、IL-1s では著明な産生促進効果は認められなかったものの、TNF- α はその産生を強く促進することを免疫組織染色で確認した。(図 2)。

免疫染色像



TNF- α (20ng/ml)

図 2 TNF- α による CAP18/LL37 産生の誘導

免疫組織染色において TNF- α が Ca9-22 からの CAP18/LL37 産生を促進することが示されたので、さらにそれを確認するためにウエスタンブロット法により検索を行った。その結果、TNF- α により確かに CAP18/LL37 は誘導されること、またそれは TNF- α の濃度依存的に増大することが示された (図 3)。

ウエスタンブロット

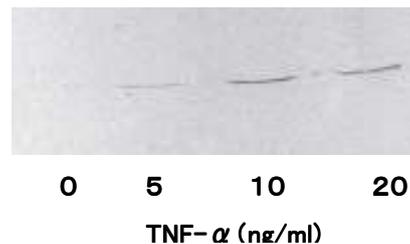


図 3 TNF- α による CAP18/LL37 産生の誘導

一方、KB 細胞において同様の実験を行ったが、TNF- α は同細胞からの抗菌ペプチド産生を誘導する効果は確認できなかった。

歯周病原性細菌が歯肉上皮細胞に侵入するという研究報告があるが、そこで用いられている細胞の多くが KB である。すなわち、細胞と細菌のインタラクションにおいて KB では抗菌タンパクが発現していないことから、そこでの殺菌作用が一切機能せず、容易に侵入を許すことが示唆される。事実、報告者はこれまでに、CAP18/LL37 の合成ペプチドが歯周病原性細菌に対し強い抗菌活性を示すことを報告している (Oral Microbiol. Immunol. Vol. 13, 2003.)。このことは口腔自然免疫、とりわけ歯周病原性細菌に対し、この CAP18/LL37 が有力なバリアとして存在する可能性を強く示唆する。

(3) 歯肉上皮細胞におけるビタミン A による CAP18/LL37 発現誘導

免疫賦活作用が確認されているビタミン A が抗菌タンパクの産生に関与しているか否かを検討した。その結果、レチノール酸は Ca9-22 において CAP18/LL37 の m-RNA 発現を著明に促進した (図 4)。

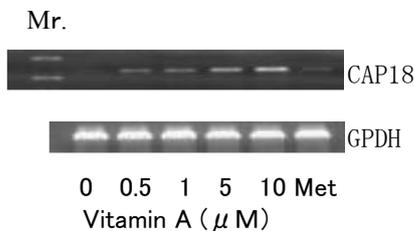


図 4 ビタミン A は Ca9-22 からの CAP18 の m-RNA 発現を誘導する。

(4) CAP18/LL37 発現とレチノール受容体との関連

ビタミン A による抗菌タンパク発現誘導がどのようなメカニズムによるかを検索した。その結果、Ca9-22 における RAR- β m-RNA 発現がビタミン A で促進された。

(5) ヒト口腔粘膜擦過細胞及び唾液中における CAP18/LL37 産生量

CAP18/LL37 の口腔自然免疫機能における作用を疫学的に解明するために、プレリミナリーではあるが、口腔粘膜細胞と唾液における同抗菌タンパクの発現を測定した。測定方法はウエスタンブロットにより実施した。

その結果、粘膜細胞からの CAP18/LL37 発現は観察されなかったものの、唾液中においてはその発現を確認した。また、その発現量は個体差及び日格差があることが示されたが、未だ例数が少なく、今後の検討課題としたい。

以上の結果から、歯周局所における自然免疫機構は、まず炎症反応により惹起されたサイトカインにより進行すること、また、食品中のビタミンによってもそれが増強されることが判明した。このことは、炎症性サイトカインが、歯周病の進行に関与するという負の作用ではなく、局所における微生物排除のための自然免疫機構を進行させるという自己防衛的作用を持つことを示唆する。また、良好な食生活が自然免疫系を賦活することも示唆され、食を通じた歯周疾患予防を考察する上で興味ある。そして、さらには、この

CAP18/LL37 の口腔内、とりわけ唾液中におけるその濃度は個体差や日格差があることが予備実験で示された。よって、この点をさらに疫学的に追求することで、歯周病の発症を予測するマーカーの候補としてこの抗菌ペプチドがなりうるか否か、さらには口腔自然免疫系において本当に CAP18/LL37 が関与しているかを示めすことができると期待している。

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)

研究代表者：廣瀬 公治

[雑誌論文] (計 3 件)

① M. Kobayashi, E. Isogai, K. Hirose, I. Chiba, : Role of α integrin on osteoprotegerin-induced endothelial cell migration and proliferation. *Microvascular Res.* 139-144:76, 2008.

② 田谷かほる、廣瀬公治、浜田節男 :
トレハロースの卵巣摘出ラット骨密度低下に対する予防効果、口腔衛生学会雑誌、534-541、58 : 2008.

③ Taya, K., Hirose, K., Hamada, S. :
Trehalose inhibits inflammatory cytokine production by protecting I- κ B- α reduction in mouse peritoneal macrophages. *Archs. Oral Biol.* : in press, 2009.

[学会発表] (計 3 件)

① 廣瀬公治、田谷かほる、竹下 玲、大橋明石、小林美智代、浜田節男、安井利一 ;
レチノイン酸はヒト歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチド産生を誘導する : 第 57 回日本口腔衛生学会総会 (さいたま市) 2008 年 10 月 4 日。

② 末続真弓、竹下 玲、高野安紀子、広瀬公治、清水良昭、遠藤浩正、永井明子、宮澤慶、鐘ヶ江晴秀、安井利一 ;
骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞においてレチノイン酸は転写因子 AP-1 の発現を強く抑制する : 第 57 回日本口腔衛生学会総会 (さいたま市) 2008 年 10 月 4 日。

③Kobayashi, M. Hirose, K., Chiba, I.

Osteoprotegerin promotes proliferation and migration of human microvascular endothelial cells.

第57回日本口腔衛生学会総会（さいたま市）2008年10月4日。

[その他]

特にありません。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 公治 (HIROSE KIMIHARU)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：10218836

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし