

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20530

研究課題名(和文) 血管作動性小腸ペプチドの口腔粘膜創傷治癒、炎症制御機能の解明と治療薬としての応用

研究課題名(英文) Therapeutic applications and the roles of vasoactive intestinal peptide in oral mucosal wound healing and anti-inflammatory regulation

研究代表者

福井 暁子 (Fukui, Akiko)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：50647550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経ペプチドやペプチドホルモンは様々な機能を持つことが知られている。vasoactive intestinal peptide (VIP) は小腸の血管拡張物質として発見された28個のアミノ酸からなる神経ペプチドである。今回の研究から、VIPが口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞の増殖を活性化させることが明らかになった。またVIPで誘導される血管誘導因子の発現や、細胞走化性の亢進にVIP受容体であるVPAC1の発現が関与することが明らかになった。VIPは口腔粘膜の創傷治癒を亢進させる可能性があることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neuropeptide and peptide hormones may have various function. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a neuropeptide, 28-amino acid neuropeptide, discovered as a vasodilator in the small intestine. In this study, we found that VIP increased the cell proliferation in oral keratinocytes and fibroblasts. The expression of VPAC1, VIP receptor was involved in cell migration activity and the expression of vascular endothelial growth factor in oral mucosal cells. Therefore, VIP may induce wound healing in oral mucosa.

研究分野：口腔外科

キーワード：血管作動性小腸ペプチド VIP 抗菌ペプチド 創傷治癒 抗炎症作用 VPAC VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

神経ペプチドやペプチドホルモンは神経伝達物質としての機能だけでなく、様々な機能を持っていると考えている。血管作動性小腸ペプチド vasoactive intestinal peptide (VIP) は小腸の血管拡張物質として発見された 28 個のアミノ酸からなる神経ペプチドである。その主な作用は、血管拡張、平滑筋弛緩、酸分泌抑制作用である。近年、当科のグループでは VIP が細菌に対して抗菌活性をもっていること、さらに唾液中に存在する抗菌ペプチドである LL-37 の抗菌活性を相加・相乗的に増加させることを報告している。また一方で VIP は細胞増殖因子としての機能が報告されており、その受容体である VPAC を介して気管上皮細胞の増殖を上昇させることが報告されている。申請者らのグループは VIP の受容体である VPAC1, 2 が口腔粘膜上皮細胞において発現していること、他の神経ペプチドと比較して VIP を添加した際に口腔粘膜上皮細胞の vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現誘導と、細胞遊走能が増加することを発見している。これらの結果から VIP は口腔粘膜細胞に対して創傷治癒に関与する因子を誘導する可能性が示唆されるが VIP が口腔粘膜における創傷治癒作用を持つ報告は国内外でもない。

一方、近年では VIP, VPAC の発現が炎症性腸粘膜疾患の炎症レベルで異なること、さらに VIP が炎症性腸粘膜の炎症を抑制することが報告されている。また細胞レベルではマクロファージの LPS によって誘導される IL-6 の発現を抑制すること、関節軟骨線維芽細胞における TLR3, RIG-I などの RNA 受容体を介した炎症応答を抑制することが報告されている。過去の腸粘膜における抗炎症作用に関する報告から、VIP が微生物受容体を介した炎症作用の調節を行っている可能性があるが、VIP, VPAC の発現と口腔粘

膜炎性疾患との関与や、VIP が口腔粘膜における抗炎症作用をもつ報告は国内外においても無い。

## 2. 研究の目的

今回の研究計画は、国内外で報告のない VIP の創傷治癒作用、抗炎症作用を明らかにし、口腔粘膜への創傷や、口腔粘膜炎症性疾患に対する新しい治療法を検討することである。このため、VIP の口腔粘膜細胞における細胞増殖、遊走作用、抗炎症作用を検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) 用いた細胞

細胞は hTERT 遺伝子を導入することによって不死化させた口腔粘膜上皮細胞 RT7, 不死化歯肉線維芽細胞 GT1 を用いた。RT7 は表皮角化細胞培地 (Lonza 社), GT1 は DMEM 培地 (Sigma 社) で培養を行った。

### 2) 用いたペプチド

vasoactive intestinal peptide (VIP) (PHOENIX PHARMACEUTICALS 社) を用いた。

### 3) 細胞増殖 assay

$5 \times 10^4$  個の RT7, GT1 を 6 well dish に播き、一定期間培養した後、細胞をトリプシンによって集め、生細胞数をトリパンブルーを用いた色素排除法によって測定した。

### 4) 細胞走化 assay

RT7, GT1 を 6 well dish に播き、コンフルエンスになった時点で dish の中心部に wound を形成した後、VIP を添加し、経時的な幅の計測を行った。

### 5) siRNA による VPAC 1 の抑制

RT7, GT1 を 6 well dish に播き、70% コンフルエンスになった時点で VPAC 1 特異的 siRNA を添加し、VPAC 1 の発現を RT-PCR 法にて確認した。

### 6) VIP の細胞遊走活性に対する VIP 受容体阻害の影響

RT7, GT1 を VPAC 1 siRNA, Control

siRNA を添加し，細胞遊走能の比較を細胞走化 assay で検討した。

7) VIP の VEGF 発現誘導に対する VIP 受容体阻害の影響

RT7, GT1 を VPAC 1 siRNA, Control siRNA を添加し，VEGF A mRNA の発現誘導の比較を Real-time PCR で検討した。

6) 炎症性サイトカインで誘導される白血球遊走因子における VIP の影響

RT7, GT1 を VIP で前処理を行った後，Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  を添加し 12 時間後の mRNA を抽出し，Real-time PCR 法によって CXCL10 の発現誘導の影響を検討した。

#### 4. 研究成果

1) VIP の細胞増殖による影響

RT7, GT1 に VIP を添加することによって非添加と比較して細胞増殖が経時的に増加することが示された。

2) VIP 受容体の抑制

RT7, GT1 に VIP 受容体の siRNA 添加することによって VPAC1 mRNA の発現が減少することを確認した。

3) VIP の細胞遊走活性に対する VIP 受容体の影響

RT7, GT1 に VIP を添加することによって非添加と比較して細胞走化性が増加することが示された。VAC1 のノックダウンは，コントロールと比較して細胞遊走能を抑制した。

4) VIP の血管誘導因子に対する VIP 受容体の影響

RT7 において VAC1 のノックダウンは，コントロールと比較して VIP 誘導性の血管誘導因子 VEGF A mRNA の発現誘導を抑制した。

5) IFN- $\gamma$  で誘導される白血球遊走因子に対する VIP の影響

RT7, GT1 における IFN- $\gamma$  で誘導される CXCL10 mRNA の発現に対する VIP の影響は認められなかった。

今回の結果において VIP が口腔粘膜上皮細胞，線維芽細胞における細胞増殖を活性化させることが明らかになった。また，口腔粘膜細胞における VIP の細胞遊走活性や，血管新生因子の発現誘導には VIP 受容体である VPAC1 が関与していることが明らかになった。現時点で VIP の IFN- $\gamma$  で誘導される白血球遊走因子の活性に関与する抗炎症作用は認められなかった。今後は，VIP 封入ゼラチンゲルを作成し，口腔粘膜創傷モデルに対する創傷効果を検討する予定である。

#### 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)

TNF- $\alpha$ -induced IL-6 and MMP-9 expressions in immortalized ameloblastoma cell line established by hTERT. Ohta K, Naruse T, Ishida Y, Shigeishi H, Nakagawa T, Fukui A, Nishi H, Sasaki K, Ogawa I, Takechi M. Oral dis, 23(2):199-209, 2017. 査読有 DOI: 10.1111/odi.12594.

Preoperative oral health care reduces postoperative inflammation and complications in oral cancer patients. Shigeishi H, Ohta K, Fujimoto S, Nakagawa T, Mizuta K, Ono S, Shimasue H, Ninomiya Y, Higashikawa K, Tada M, Ishida F, Okui G, Okumura T, Fukui A, Kubozono K, Yamamoto K, Ishida Y, Seino S, Hashikata M, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Uetsuki R, Nimiya A, Takamoto M, Dainobu K, Tokikazu T, Nishi H, Sugiyama M, Takechi M. Exp Ther Med, 12(3):1922-1928, 2016. 査読有 DOI : 10.3892/etm.2016.3532.

Itraconazole inhibits TNF- $\alpha$ -induced CXCL10 expression in oral fibroblasts.

Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Nishi H, Naruse T, Takechi M, Kamata N.

Oral Dis, 21(1):106-12, 2015. 査読有  
DOI : 10.1111/odi.12226.

〔学会発表〕 (計 11 件)

口腔粘膜細胞における細胞内受容体の活性化とヘルペス由来 DNA の認識

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院  
応用生命科学部門 口腔外科学

鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子,  
西 裕美, 重石英生, 武知正晃

第 61 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・  
学術大会

2016 年 11 月 26 日, 27 日 幕張

口腔粘膜上皮細胞における *Candida* により誘導される IL-8 の伝達経路と HO-1 の制御機能

加藤大喜, 太田耕司, 石田陽子, 鳴瀬貴子,  
福井暁子, 西 裕美, 武知正晃

第 26 回日本口腔内科学会, 第 29 回日本口腔  
診断学会 合同学術大会

2016 年 9 月 24 日 岡山

口腔粘膜細胞におけるヘルペス由来 DNA の認識に関与する細胞内受容体の局在と TNF- $\alpha$ による調節機構

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院  
応用生命科学部門 口腔外科学

鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 加藤大喜,  
福井暁子, 西 裕美, 重石英生, 武知正晃 :

第 26 回日本口腔内科学会, 第 29 回日本口腔  
診断学会 合同学術大会

2016 年 9 月 24 日 岡山

エナメル上皮腫由来不死化細胞株の樹立と TNF- $\alpha$ による骨吸収因子の発現

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院

応用生命科学部門 口腔外科学

鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子,  
西裕美, 重石英生, 武知正晃

第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術大集会  
2016 年 4 月 15 日, 16 日, 17 日 福岡

口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* による IL-8 の発現誘導と HO-1 の制御機能

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院  
応用生命科学部門 口腔外科学

石田陽子, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 福井暁子,  
加藤大喜, 西裕美, 武知正晃

第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術大集会  
2016 年 4 月 15 日, 16 日, 17 日 福岡

口腔粘膜細胞におけるヘルペス由来 DNA の認識と炎症調節機構

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院  
応用生命科学部門 口腔外科学

鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子,  
西裕美, 重石英生, 武知正晃

第 60 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学  
術大会

2015 年 10 月 16 日, 17 日, 18 日 名古屋

*C.albicans*によって口腔粘膜上皮細胞から誘導される Heme oxygenase-1 の炎症制御機能

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院  
応用生命科学部門 口腔外科学

石田陽子, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 福井暁子,  
西裕美, 武知正晃

第 60 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学  
術大会

2015 年 10 月 16 日, 17 日, 18 日 名古屋

口腔粘膜上皮細胞におけるヘルペス由来 DNA の細胞内受容体を介した認識と NF-K b

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院  
応用生命科学部門 口腔外科学  
鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子,  
西裕美, 重石英生, 武知正晃  
第 25 回 日本口腔内科学会学術大会  
2015 年 9 月 18 日, 19 日 大阪

口腔粘膜上皮細胞から *Candida albicans*  $\beta$ -glucan によって誘導される Heme oxygenase-1 と炎症性遺伝子発現の制御

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院  
応用生命科学部門 口腔外科学  
石田陽子, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 福井暁子,  
西裕美, 武知正晃  
第 25 回 日本口腔内科学会学術大会  
2015 年 9 月 18 日, 19 日 大阪

口腔粘膜細胞における細胞内受容体を介したヘルペス由来 DNA の認識と CXCL10 の発現誘導

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院  
応用生命科学部門 口腔外科学  
鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子,  
西裕美, 重石英生, 武知正晃  
第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会  
2015 年 5 月 13 日, 14 日, 15 日 大阪

口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* による ROS/p38MAPK/Nrf2 を介した Heme oxygenase-1 の発現誘導と機能

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 口腔外科学  
石田陽子, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 福井暁子,  
西裕美, 奥井岳, 武知正晃  
第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会  
2015 年 5 月 13 日, 14 日, 15 日 大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福井 暁子 (FUKUI AKIKO)  
広島大学・病院・歯科診療医  
研究者番号: 50647550