

平成21年4月8日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592388
 研究課題名 (和文) 歯周組織のロバストネスに視点をおいた歯周病予防法の研究
 研究課題名 (英文) Study of periodontitis prevention viewed from robustness of periodontal tissues.
 研究代表者 木戸 淳一 (KIDO JUNICHI)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
 研究者番号：10195315

研究成果の概要：

本研究では、歯周病の予防について歯周組織の感染に対する頑健性（ロバストネス）を抗菌ペプチドの発現に注目して検討を行った。その結果、口腔上皮細胞では通常時で高発現を示すものと外的刺激により発現上昇する抗菌ペプチドが認められた。抗菌ペプチドを介したロバストネス強化因子として Interleukin-1 α (IL-1 α)と小柴胡湯の効果を調べた結果、7つの抗菌ペプチドの発現上昇が認められた。また、Calprotectinの発現については、上皮細胞と線維芽細胞の間で IL-1 α と Keratinocyte growth factor(KGF)によってその発現が調節されていることが判明した。これらの結果は、ロバストネスに視点をおいた歯周病予防の研究の基盤となると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：抗菌ペプチド、ロバストネス、歯周病予防

1. 研究開始当初の背景

歯周病を含む感染症の予防の必要性の高まりとともに口腔内の感染に対する頑健性（ロバストネス）を調べ、これに基づいて歯周病の予防法を再考する必要がある。そこで、その主体となる抗菌ペプチドについて、口腔上皮細胞が発現する抗菌ペプチドの特徴を明らかにし、口腔内の感染に対するロバストネスに関する情報を得る。

2. 研究の目的

1) 口腔内のロバストネスを担う抗菌ペプチ

ドについて、口腔上皮細胞によるその発現種を網羅的に検索する。

2) 抗菌ペプチドの発現調節因子を検討し、それらの調節機構や上皮-間葉組織間による抗菌ペプチドの発現調節システムを解明する。

これらの研究により口腔上皮細胞における抗菌ペプチド発現から、口腔内のロバストネスの実態を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 上皮細胞の分離・培養：徳島大学病院臨

床研究倫理審査委員会の承認を得て、同意が得られた患者から口腔外科治療時に採取された歯肉組織の提供を受けた。歯肉組織片から歯肉上皮細胞を通常法に基づいて分離、培養した。また、一部の研究では口腔上皮細胞株と表皮上皮細胞株を培養し、実験に用いた。

- 一部の実験では、上皮-間葉系組織の抗菌ペプチド発現に及ぼす影響を調べるために、上皮細胞と線維芽細胞の共培養を行った。
- 2) DNA マイクロアレイ分析: IL-1 α や小柴胡湯(Shosaikoto:SST)による処理, または非処理の各培養細胞から RNA を分離し, cDNA 合成後, DNA マイクロアレイ (Human Genome U133 plus 2.0 Array や 1.0 ST Array:Affymetrix) を用いて, 特に抗菌ペプチドについてその発現を網羅的に検討した。
- 3) Northern blot 法と RT-PCR 法: 抗菌ペプチドやサイトカインの遺伝子発現を調べるために, 培養, 処理した細胞から分離した RNA を用いて, 通常法に従って抗菌ペプチドやサイトカインの遺伝子を Northern blot 法や RT-PCR 法により分析した。
- 4) ELISA 法: Calprotectin と IL-1 α の蛋白発現の分析のために, それぞれの ELISA キットを用いて説明書に従いそれぞれの蛋白量を測定した。
- 5) Western blot 法: IL-1 α と KGF による抗菌ペプチド発現への作用機構を検討するために, p38, ERK および JNK などの MAPK のリン酸化を Western blot 法にて分析した。

4. 研究成果

- 1) 歯肉上皮細胞が発現する抗菌ペプチド: 3 被験者から採取したヒト歯肉上皮細胞が発現する抗菌ペプチドをマイクロアレイ分析で検討した結果, 100 以上のスコアを示すものとして S100A7, S100A8, S100A9, S100A12, SLPI, Cystatin C, Lipocalin 2, β -Defensin-1, β -Defensin-2, RNase 7, Adrenomedullin などの 11 種の抗菌ペプチドの発現が認められた。抗菌ペプチド発現増加因子である IL-1 α による遺伝子発現への影響を検討した結果, β -Defensin-2, S100A7, S100A12, Lipocalin 2 と RNase 7 の 5 つの抗菌ペプチドを含む 12 個の遺伝子の発現が 2 倍以上増加していた。RT-PCR 法により IL-1 α による抗菌ペプチド発現増加を確認した(Figure 1)。
- 2) 歯肉上皮細胞が発現する自然免疫関連因子: Toll-like receptor(TLR), Chemokine ligand (CXCL) やその他の関連因子について検索を行った結果, TLR は信頼値以上のスコアを示すものではなく, CXCL は CXCL1, 2, 5, 10, 11, 14 および 16 の発現が認められ, CXCL5 のみが IL-1 α により 2 倍以上の発現増加を示した。
- 3) 口腔上皮細胞が発現する抗菌ペプチドと

小柴胡湯の発現増加作用: マイクロアレイ分析の結果, Peptidase inhibitor 3 (SKALP), S100A12, S100A7, S100A8 と S100A9 などを含む 10 個の抗菌ペプチドの発現が認められた。また, 小柴胡湯の刺激により, 上記 4 つの抗菌ペプチドを含む 11 個の遺伝子の発現増加が見られた。この結果を, RT-PCR 法で確認した(Figure 2)。

4) 小柴胡湯による蛋白発現への影響: 口腔上皮細胞における Calprotectin 蛋白発現を免疫組織染色と ELISA 法で検討した結果, 上皮細胞の細胞質ゾルに Calprotectin の発現が認められた。さらに, ELISA による蛋白量の測定の結果, 小柴胡湯により細胞質中の Calprotectin 濃度の有意な増加が認められた(Figure 3)。

5) 小柴胡湯によるサイトカイン発現への影響: 小柴胡湯による抗菌ペプチド発現の作用機構を検討するために, 肝細胞などで報告されているサイトカインの発現について検討した。その結果, 小柴胡湯は IL-1 α の発現を上昇させるが (Figure 4), IL-6, TNF- α , G-CSF などの発現には影響は認められなかった。そこで, 小柴胡湯による IL-1 α の発現について定量的 Real-time PCR と ELISA にて遺伝子と蛋白レベルで検討した。その結果, 口腔上皮細胞において小柴胡湯により IL-1 α の有意な増加が認められた(Figure 5)。

Figure 1

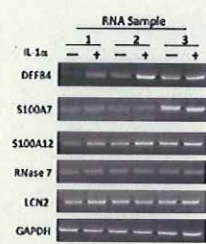


Figure 2

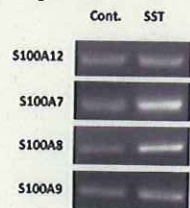


Figure 3

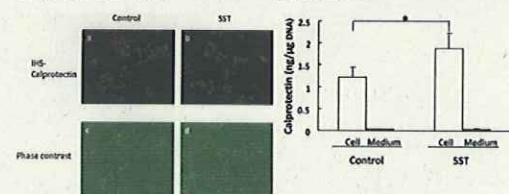


Figure 4

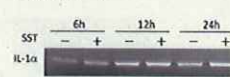
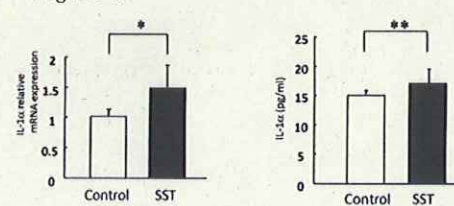


Figure 5



6) 小柴胡湯の Calprotectin 発現作用における IL-1 α の関与の検討: 抗 IL-1 α 中和抗体

(Figure 6:中 Ab*),あるいはIL-1 α receptorの antagonist(Figure 6中 rhIL-1ra)による小柴胡湯刺激の Calprotectin の遺伝子と蛋白発現への影響を調べた。その結果,小柴胡湯による Calprotectin 発現増加は,IL-1 α 中和抗体と receptor 拮抗剤により減少された(Figure 6)。これらの結果から,小柴胡湯がIL-1 α を介して Calprotectin(S100A8/S100A9)の発現を増加させることが確認された。小柴胡湯の一連の研究から,小柴胡湯はIL-1aの発現を上昇させることにより口腔上皮細胞での抗菌ペプチド発現を増加させて感染予防に働くことにより,口腔内のロバストネスを強化させる作用があることが示唆された(Figure 7)。

Figure 6

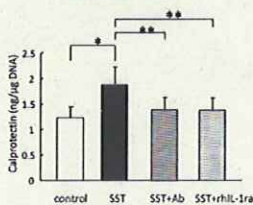
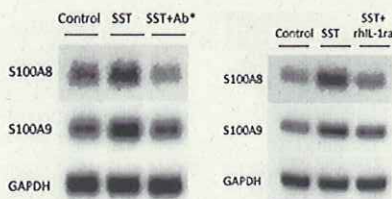
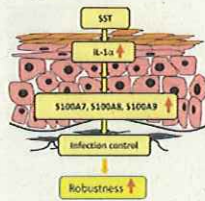


Figure 7



7) 抗菌ペプチド発現における IL-1 α と KGF の作用: 抗菌ペプチド発現に及ぼす上皮間葉系の作用を調べるために,上皮細胞と線維芽細胞が産生する IL-1 α と KGF の影響を調べた。その結果,上皮細胞において IL-1 α は,S100A7, S100A8, S100A9, Lipocalin 2, SLPI と β -Defensin 2 などの遺伝子発現を上昇させた。一方, KGF は S100A7, S100A8 と S100A9 の発現を減少させたが, Lipocalin 2 と SLPI は増加させ, β -Defensin 2 発現には影響を及ぼさなかった(Figure 8)。また, Calprotectin (S100A8/S100A9) については,蛋白レベルにおいてもその発現が IL-1 α により増加され, KGF により減少された(Figure 9)。

Figure 8

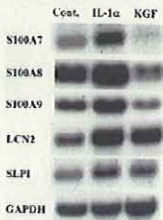
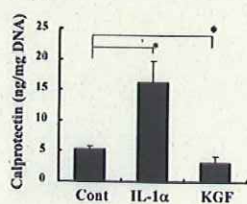


Figure 9

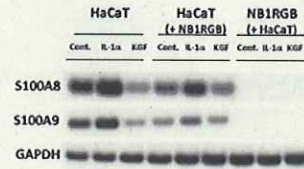


8) 上皮細胞と線維芽細胞での IL-1 α と KGF の発現への相互作用とその Calprotectin 発現への影響: 上皮細胞と線維芽細胞における IL-1 α と KGF のそれぞれの発現に及ぼす影響を検討した結果,上皮細胞において KGF 刺激により IL-1 α 発現が上昇した。一方,線維芽細胞において IL-1 α 刺激により KGF 発現が増加した(Figure 10)。さらに,上皮細胞と線維芽細胞を共培養した場合, Calprotectin(S100A8/S100A9)の遺伝子発現は上皮細胞の単独培養時と比較して,共培養の場合はその発現が低下していた。この傾向は,IL-1 α と KGF の添加時にも認められた(Figure 11)。

Figure 10



Figure 11

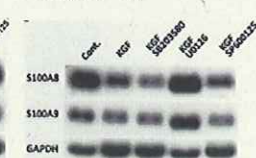


9) IL-1 α と KGF の Calprotectin 発現へのシグナル経路と MAPK の関与: Calprotectin 発現機構における IL-1 α と KGF のシグナル経路を p38, ERK と JNK の MAPK のそれぞれの阻害剤(SB203580, U0126, SP600125)を用いて検討した。その結果,IL-1 α による Calprotectin 発現増加は p38 阻害剤の SB203580 により阻害された(Figure 12)。一方, KGF による発現減少は ERK 阻害剤の U0126 により回復した(Figure 13)。

Figure 12



Figure 13



10) 上皮細胞における IL-1 α と KGF による MAPK のリン酸化への影響: IL-1 α と KGF による MAPK のリン酸化への影響を検討した。その結果,IL-1 α により p38 と ERK のリン酸化が促進され,それぞれの阻害剤(SB203580 と U0126)によりそのリン酸化促進が阻害された(Figure 14)。KGF により p38 と ERK のリン酸化が刺激され,それらの阻害剤(SB203580 と U0126)によりリン酸化が抑制された(Figure 15)。本結果から,IL-1 α と KGF による Calprotectin 発現の調節には,それ

ぞれ p38 と ERK の関与が示唆された。

Figure 14

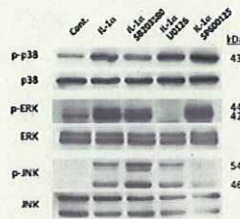
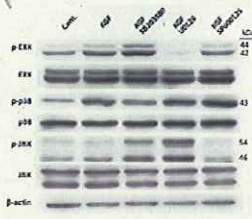
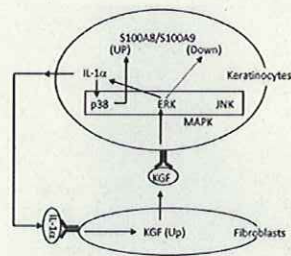


Figure 15



1) 1) 上皮細胞と線維芽細胞における IL-1 α と KGF を介した Calprotectin の発現機構：線維芽細胞が産生する KGF により上皮細胞において，MAPK の ERK が活性化され，Calprotectin (S100A8/S100A9) の発現が減少される。一方，同じく ERK の活性化により IL-1 α の発現が上昇し，これにより p38 が活性化され Calprotectin の発現上昇が生じる。これらの経路で産生された IL-1 α は線維芽細胞の受容体に結合後，線維芽細胞内で KGF の発現を増加させる。(Figure 16)

Figure 16



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 2 件)

1) Hiroshima Y, Bando M, Kataoka M, Shinohara Y, Herzberg MC, Ross KF, Inagaki Y, Nagata T, Kido J. Shosaikoto increases calprotectin expression in human oral epithelial cells. J Periodont Res, 査読有, in press.

2) Hiroshima Y, Bando M, Kataoka M, Nagata T, Kido J. Regulation of calprotectin expression in human keratinocytes *in vitro*. 日歯周誌, 査読有, 2007, 49: 224-232.

[学会発表] (計 9 件)

1) 廣島佑香, 板東美香, 木戸淳一, 片岡正俊, 永田俊彦. 上皮細胞増殖因子(EGF)はヒ

ト口腔上皮細胞の抗菌ペプチド発現を調節する. 第129回日本歯科保存学会秋季学術大会、富山、2008年11月6-7日.

2) 板東美香, 廣島佑香, 木戸淳一, 片岡正俊, 永田俊彦. Interleukin-1 α による S100A9 遺伝子の転写調節. 第51回日本歯周病学会秋季学術大会、四日市、2008年10月19日

3) 廣島佑香, 板東美香, 木戸淳一, 片岡正俊, 永田俊彦. 小柴胡湯がヒト口腔上皮細胞の分化および抗菌ペプチド発現に及ぼす影響. 第51回日本歯周病学会秋季学術大会、四日市、2008年10月19日.

4) Hiroshima Y, Bando M, Kataoka M, Herzberg MC, Ross KF, Nagata T, Kido J. Sho-saiko-to increases calprotectin expression in human oral epithelial cells. 86th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. Toronto, Canada, July 2-5(July 3), 2008.

5) Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, Herzberg MC, Ross KF, Nagata T, Kido J. IL-1 α and KGF regulate keratinocyte expression of antimicrobial peptides. 86th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. Toronto, Canada, July 2-5, 2008.

6) 廣島佑香, 板東美香, 木戸淳一, 片岡正俊, 永田俊彦. 小柴胡湯はヒト口腔上皮細胞のカルプロテクチン発現を増加する. 第51回日本歯周病学会春季学術大会、大宮、2008年4月25-26日.

7) 廣島佑香, 板東美香, 木戸淳一, 片岡正俊, 永田俊彦. ヒト上皮細胞の抗菌ペプチド発現に及ぼす IL-1 α の影響. 第50回日本歯周病学会秋季学術大会、東京、2007年9月21-22日.

8) Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, Nagata T, Kido J. IL-1 α and KGF differentially regulate antimicrobial peptide expression in keratinocytes. 21th International Association for Dental Research and 19th South East Asia Association for Dental Education, Bali,

Indonesia, Sept. 6-8, 2007.

9) Hiroshima Y, Bando M, Kataoka M, Nagata T, Kido J. IL-1 α regulates the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes. 21th International Association for Dental Research and 19th South East Asia Association for Dental Education, Bali, Indonesia, Sept. 6-8, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

- ・ 木戸 淳一 (KIDO JUNICHI)
- ・ 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス (HBS) 研究部・准教授
- ・ 研究者番号: 10195315

(2) 研究分担者

- ・ 片岡 正俊 (KATAOKA MASATOSHI)
- ・ 産業技術総合研究所・健康工学研究センター・主任研究員
- ・ 研究者番号: 20224438

- ・ 板東 美香 (BANDO MIKA)
- ・ 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス (HBS) 研究部・技術補佐員
- ・ 研究者番号: 10510000

(3) 連携研究者

該当なし