

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20592430
 研究課題名（和文） 多機能分子としてのLL37の歯周炎予防と歯周組織再生における有用性
 研究課題名（英文） Usefulness of LL37 as a multifunctional molecule for prevention of periodontal disease and periodontal tissue regeneration
 研究代表者
 柴 秀樹 (SHIBA HIDEKI)
 広島大学・病院・講師
 研究者番号：60260668

研究成果の概要（和文）：

抗菌力を有するLL37は、歯周病原細菌によって誘導される炎症を引き起こす因子の産生を抑制した。また、LL37は血管新生に関わる因子の産生を促進した。さらに、LL37はラット頭蓋骨骨欠損の骨の再生を促進した。LL37が、抗菌作用に加えて、抗炎症作用、血管新生作用、および骨形成促進作用を有し、歯周炎予防薬と歯周組織再生治療薬に有用な分子である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

LL37, which has antibacterial activity against cariogenic and periodontopathogenic bacteria abolished the increase in the factor involved in inflammation induced by periodontopathogenic bacteria. LL37 enhanced the production of the factor involved in angiogenesis. Furthermore, LL37 promoted the new bone formation in the rat experimentally created calvarial bone defect. Thus, in addition to antibacterial activity, LL37 is found to possess anti-inflammatory action, angiogenic activity and osteogenic activity, suggesting LL37 is possible to be useful for prevention of periodontal disease and periodontal tissue regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：LL37・抗菌ペプチド・歯周炎予防・歯周組織再生・血管新生

1. 研究開始当初の背景

歯周炎の予防に関する研究は、抗菌薬による細菌の除去が中心で、細胞機能制御による予防法は確立されていない。一方、歯周組織再生においては、歯周靭帯細胞や骨髄間葉系幹細胞の増殖・分化を積極的に制御するという点から研究が進められている。歯周炎は「宿

主寄生体相互作用」によって成立することから、研究代表者らは歯周炎予防に関する研究を、歯周病原細菌に対する歯肉上皮細胞の応答を積極的に制御しようとする概念によって推進してきた (Fujita et al., 2008; 柴 秀樹 2007, Fujita et al., 2006, Uchida et al., 2005)。また、研究代表者らは歯周靭帯細胞の

制御という点から、歯周組織再生に関する研究を行ってきた(Takeda et al., 2005)。抗菌ペプチド LL37 は抗菌作用に加えて、未成熟樹状細胞、メモリーT細胞、ケラチノサイトなどの走化促進作用を示す(Yang, D., et al., 2001.; Tokumura et al., 2001.)。さらに、LL37 は血管新生作用を有する (Koczulla et al., 2003)。研究代表者らは歯周病原細菌に対する LL37 の抗菌作用を明らかにしている (Ouhara et al., 2005)。さらに、研究代表者らは、LL37 がペプチドグリカンによるインターロイキン (IL) -8 や IL-6 の発現促進を抑制することを明らかにしている (柴 秀樹他、2008)。

このように、多機能分子である LL37 が抗菌作用と抗炎症作用によって歯周炎の予防に、また、LL37 による細胞の遊走・増殖や分化などの制御および血管新生作用が歯周組織再生に有用であると考え、本研究を着想するに至った。細胞機能制御による歯周炎予防と歯周組織再生の両方に有用な多機能分子に関する研究は国内・国外においても見当たらない。

2. 研究の目的

LL37 が歯周炎予防薬と歯周組織再生治療薬という二つの異なる視点から臨床応用可能な分子であるかを明らかにするために、in vitro および in vivo の実験を行なった。

(1) in vitro

- ① LL37 の抗菌力を明らかにするため、歯周病原細菌に対する抗菌活性を調べた。
- ② LL37 の抗炎症作用を調べるために、歯周病原細菌である *A. a* の外膜タンパク質 29 (OMP29) によって刺激されたヒト歯肉線維芽細胞の IL-8 発現に及ぼす LL37 の影響を調べた。
- ③ LL37 の血管新生作用を調べるため、ヒト歯周靭帯細胞の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) -A と VEGF-B 発現に及ぼす LL37 の影響を調べた。

(2) in vivo

LL37 が骨再生能を有するかを明らかにするため、ラット頭蓋骨骨欠損の再生における LL37 の影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) in vitro

- ① 歯周病原細菌に対する抗菌活性
本研究で使用した抗菌ペプチドのアミノ酸配列は以下の通りである。

ペプチド名

アミノ酸配列 (アミノ酸残基数)

LL37 (34-mer)

LLGDFFRKSKEKIGKFKRIVQRIKDFLRNLVPR (34)

*LL37 (34-mer LL)

LLGDFFRKSKEKIGKLFKRIVQRILDFLRNLVPR (34)

*LL37 (34-mer LLKKK)

LLGDFFRKSKEKIGKLFKRIVKRILKFLRKLVPR (34)

*LL37 のアミノ酸をかえて、陽イオンの帯電を増強した新規ペプチド

太字は置き換えられた陽イオンに帯電したアミノ酸を示す。

歯周病原細菌 (*P. g* W83, *P. g* S1, *P. i* E-15, *A. a* Y4, *A. a* JP2) に対する LL37 (34-mer)、LL37 (34-mer LL)、LL37 (34-mer LLKKK) の抗菌作用を調べた (Ouhara et al., J. Antimicrob. Chemother, 2005)。

② ヒト歯肉線維芽細胞の IL-8 発現

細胞培養：矯正学的理由で便宜的に抜去された健全な小白歯に付着していた健康歯肉からヒト歯肉線維芽細胞を獲得した。10% FCS を含む DMEM を用いて継代培養し、以下の実験には 6 代継代細胞を供した。

IL-8 発現：ヒト歯肉線維芽細胞を LL37 (34-mer)、LL37 (34-mer LL)、LL37 (34-mer LLKKK) (10 µg/ml) で 30 分間前処理した後、*A. a* Y4 由来の OMP29 (1 µg/ml) でヒト歯肉線維芽細胞を刺激し、さらに 6 時間培養した。IL-8 の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法によって解析した。

③ ヒト歯周靭帯細胞の VEGF 発現

細胞培養：ヒト歯周靭帯細胞は三光純薬から購入した。10% FCS を添加した DMEM にて培養し、継代数 9 代のヒト歯周靭帯細胞を実験に供した。

VEGF 発現：コンフルエントなヒト歯周靭帯細胞に LL37 (34-mer) (0.1, 1, 10 µg/ml) を 0 から 24 時間無血清下で作用させた。VEGF の mRNA 発現はリアルタイム PCR 法、タンパク発現は ELISA によって解析した。

細胞内シグナル分子の活性阻害：NF-κB、ERK、JNK の阻害剤を LL37 の添加 30 分前に作用させ、VEGF 発現を調べた。

(2) in vivo

ラット頭蓋骨骨欠損の再生

ラット頭蓋骨に作製した骨欠損にアテロコラーゲンあるいは 10 µg/ml の LL37 (34-mer) + アテロコラーゲンの複合体を移植した。非移植群をコントロールとした。移植 8 週後、灌流固定を行い、組織標本作製した。切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、光学顕微鏡下にて組織観察した。

4. 研究成果

(1) in vitro

① 歯周病原細菌に対する抗菌活性

P. g 2株 (*P. g* W83, *P. g* S1) と *P. i* E-15, に対する抗菌活性では、2 µg/ml の LL37(34-mer LLKKK)の活性が 2 µg/ml の LL37(34-mer)と LL37(34-mer LL)の活性と比べて著しく強かった。*A. a* 2株 (*A. a* Y4, *A. a* JP2) に対する抗菌活性では、2 µg/ml の LL37(34-mer LL)の活性が 2 µg/ml の LL37(34-mer)と LL37(34-mer LLKKK)の活性と比べて弱かった(図1)。10 µg/ml の LL37(34-mer)、LL37(34-mer LL)、LL37(34-mer LLKKK)の抗菌作用は 2 µg/ml の抗菌作用より強く、3つのペプチド間で差が認められなかった。

② ヒト歯肉線維芽細胞の IL-8 発現

OMP29は IL-8 mRNA 発現を促進した。10 µg/ml LL37(34-mer)、LL37(34-mer LL) および LL37(34-mer LLKKK)は、OMP29 によって誘導される IL-8 mRNA 発現促進を抑制した。3つのペプチド間において、明らかな抑制効果の差は認められなかった。

③ ヒト歯周靭帯細胞の VEGF 発現

LL37(34-mer)はヒト歯周靭帯細胞の VEGF-A 発現を時間・濃度依存的に mRNA (図2) およびタンパクレベル (図3) で促進した。また、JNK 阻害剤は影響を及ぼさなかったが、NF-κB 阻害剤と ERK 阻害剤は LL37 が誘導する VEGF-A 発現の促進を抑制した(図4)。一方、LL37(34-mer)はヒト歯周靭帯細胞の VEGF-B mRNA 発現には影響を及ぼさなかった(図2)。以上のことから LL37(34-mer)はヒト歯周靭帯細胞における VEGF-A 発現を促進させ、その促進には NF-κB と ERK の関与が示唆された。LL37 の血管新生誘導に VEGF を介する経路の存在の可能性が考えられた。

(2) in vivo

ラット頭蓋骨骨欠損の再生

LL37+アテロコラーゲン群の骨再生量はコントロール群とアテロコラーゲン群の骨再生量より多かった(図5)。また、LL37+アテロコラーゲン群は他の2群と比べ骨欠損内部に豊富な血管新生が確認できた。以上のことから、LL37(34-mer)は骨再生を促進し、その骨再生促進には血管新生が関与していることが示唆された。

LL37(34-mer)がヒト歯髓細胞の細胞遊走を促進することを明らかにした。細胞遊走は、組織再生(修復)初期に必要な現象である。したがって、LL37がヒト歯周靭帯細胞の細胞遊走に及ぼす影響、さらには、LL37による誘導される機能発現メカニズムおよび LL37 による歯周組織再生能を解明する必要がある。

歯周病原細菌に対して抗菌力を有する LL37 が、抗菌作用に加えて、抗炎症作用、血管新生作用、および骨形成促進作用を有するという結果から、細胞機能制御による歯周炎予防法と歯周組織再生療法の開発が可能であることが明らかとなった。さらに、LL37 の多機能は、口腔外科および医学領域の疾患の治療にも応用できると考えられる。したがって、本研究の成果は歯学および医学領域における新しい治療薬の開発に貢献できる研究成果である。

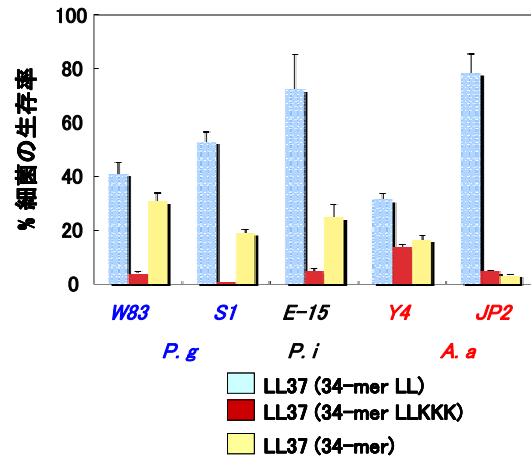


図1. 歯周病原細菌に対する LL37 の抗菌活性
LL37 : 2 µg/ml

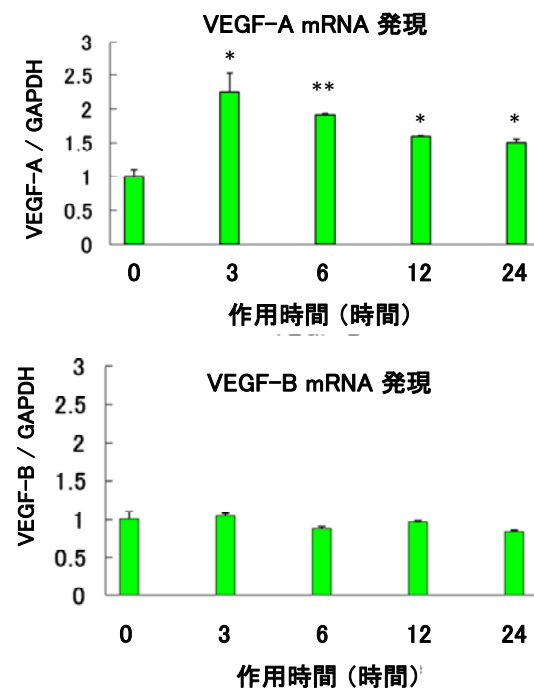


図 2. ヒト歯周靭帯細胞の VEGF mRNA 発現に及ぼす LL37 の作用時間の影響

LL37 (34-mer): 10 µg/ml

**P<0.01, 0時間と比較

*P<0.05, 0時間と比較

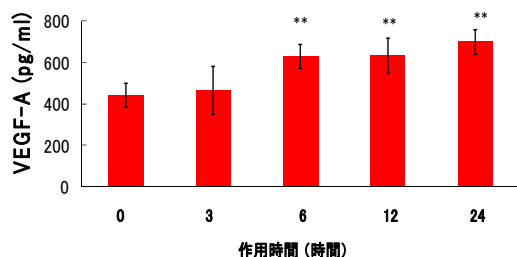


図 3. ヒト歯周靭帯細胞の VEGF-A 産生に及ぼす LL37 の作用時間の影響

LL37 (34-mer): 10 µg/ml

**P<0.01, 0時間と比較

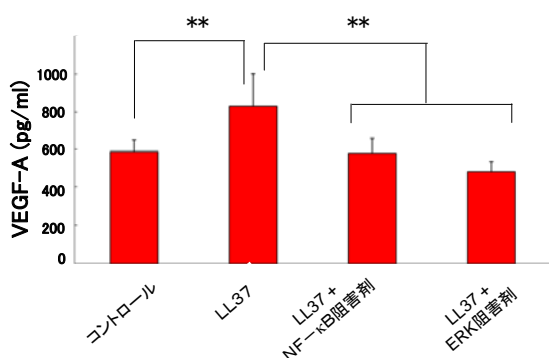


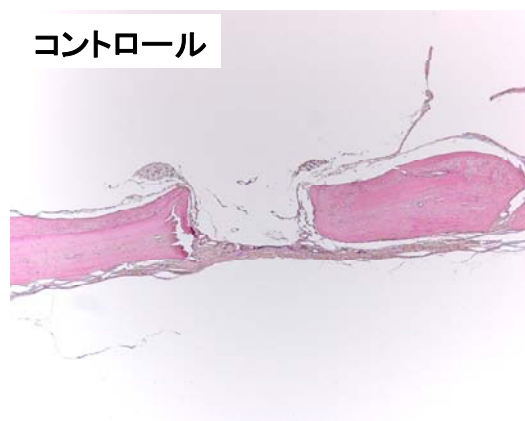
図 4. LL37 が誘導するヒト歯周靭帯細胞の VEGF-A 発現促進に及ぼす阻害剤の影響

LL37 (34-mer): 10 µg/ml

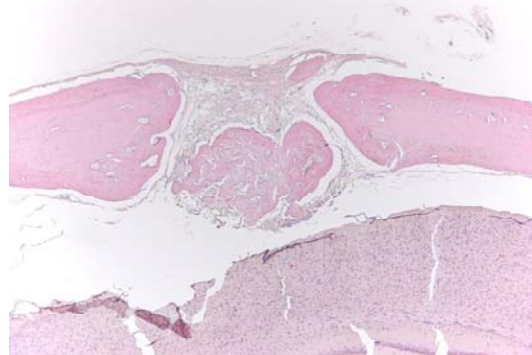
NF-κB 阻害剤: PDTC, 10 µM

ERK 阻害剤: PD98059, 50 µM

**P<0.01



アテロコラーゲン



LL37 + アテロコラーゲン

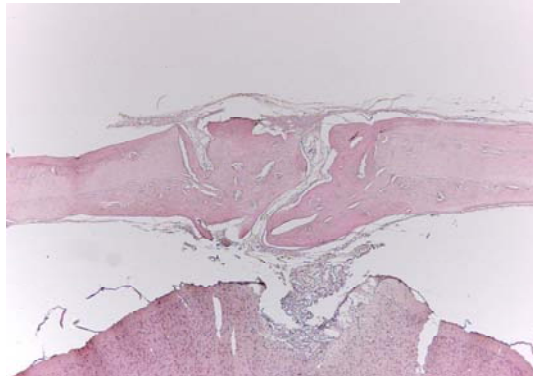


図 5. ラット頭蓋骨骨欠損の再生における LL37 の影響

LL37 (34-mer): 10 µg/ml

LL37 移植 8 週後の HE 染色像

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 1 件)

1. The Antimicrobial Peptide LL37 Induces the Migration of Human Pulp Cells: A Possible Adjunct for Regenerative Endodontics. Kajiya, M., Shiba, H., Komatsuzawa, H., Ouhara, K., Fujita, T., Takeda, K., Uchida, Y., Mizuno, N., Kawaguchi, H., Kurihara, H., J Endod. 36: 1009-1013, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 柴 秀樹、歯内療法において実現させたい生物学的歯内療法に関する基礎的研究、第31回日本歯内療法学会学術大会、2010年7月24日、東京。

2. 加治屋幹人、柴 秀樹、藤田 剛、武田克浩、内田雄士、水野智仁、河口浩之、栗原英見、抗菌ペプチドLL37はヒト歯髄細胞のmigrationを促進する、平成20年度（第129回）日本歯科保存学会秋季大会、2008年11月6日、富山。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴 秀樹 (SHIBA HIDEKI)
広島大学・病院・講師
研究者番号：60260668

(2) 研究分担者

藤田 剛 (FUJITA TSUYOSHI)
広島大学・病院・助教
研究者番号：80379883

(3) 連携研究者

武田 克浩 (TAKEDA KATSUHIRO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科
・助教
研究者番号：10452591