

機関番号：30110

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792093

研究課題名 (和文) 上皮細胞における活性型ビタミンD3の効果の検討

研究課題名 (英文) Effect of Vitamin D3 on Antimicrobial Peptides Expression in Keratinocyte.

研究代表者

倉重 圭史 (KURASHIGE YOSHIHITO)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：30453278

研究成果の概要 (和文)：小児の口腔粘膜上皮は、成人と比較し角化が乏しく、上皮結合および抗細菌性ペプチドの発現を上昇することが予想される。そのため、活性型ビタミンD3を添加した結果、上皮結合の亢進が認められ、抗細菌性ペプチドの発現の一部上昇が認められた。本研究により活性型ビタミンD3は、化学的防御機構亢進する傾向にあり、また機械的防御機構である上皮結合を亢進させるため、小児の口腔ケアおよび感染予防に有用であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The innate immune system of mammals provides a rapid response to repel assaults from numerous infectious agents including bacteria, viruses, fungi, and parasites. A major component of this system is a diverse combination of cationic antimicrobial peptides that include the  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins (hBDs), and cathelicidin (LL-37). hBDs and LL-37 belong to a group of antimicrobial peptides mainly produced by the epithelial cells of many organs including skin, lung, kidney, pancreas, uterus, eye, and oral epithelium. The oral epithelium consists of stratified keratinocytes with a variable degree of keratinization. The molecular components of cellular tight junctions, including claudins, occludin and ZO-1, contribute to homeostasis in oral epithelial keratinocytes. Many functions of keratinocytes are regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-D3), the active form of vitamin D, that includes inhibition of proliferation, stimulation of differentiation and promotion of innate and adaptive immunity. It is still unclear whether 1,25-D3 affects the expression of hBDs, LL-37, claudin, occludin and ZO-1 in keratinocytes. The keratinocytes incubated with 1,25-D3 induced upregulated expression of hBD-1, hBD-2, LL-37 and cla-4, downregulated expression of cla-1 in a dose- and time-dependent manner. Incubation with 1,25-D3 at any dose did not alter expression level of hBD-1, -3.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |

研究分野：小児歯科学分野

科研費の分科・細目：

キーワード：活性型ビタミンD3、抗細菌性ペプチド、ディフェンシン、LL-37

## 1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜上皮は皮膚と同じく、重層扁平上皮からなり、下層から基底層、棘細胞層、顆粒層、そして角化層で構成されている。特に口蓋、歯肉および舌背など、食物などの物理的刺激が強い部位は角化傾向が亢進しており、バリアー（機械的防御機構）として外界からの刺激、ことに病原微生物の内部環境への侵入を防いでいる。さらに口腔粘膜上皮からは種々の抗菌ペプチドが産生されており、細菌の増殖や活動を抑制し（化学的防御機構）、口腔内の保護に重要な役割を担っている（図1）。口腔粘膜上皮から産生される抗菌性ペプチドには、 $\beta$ デフェンシンやカセリン等があり、様々な研究が行われている。我々の研究室では歯肉弁などから切除採取した小児歯肉における $\beta$ ディフェンシンtype2の発現と局在を検索し、口腔上皮角化層直下の顆粒層および有棘層上層に局在していることを明らかにした（小児歯科学雑誌, 2004）。また、健常者歯肉の $\beta$ ディフェンシンtype 1、type 2、type 3の発現と歯肉の炎症程度を比較した結果、炎症の程度と $\beta$ ディフェンシンtype 2、type 3の発現が有意に相関しており、 $\beta$ ディフェンシンの発現は歯肉炎と密接に関わりあっていることを報告している（Arch. Oral Biol. 2004）。生体が産生する抗菌性ペプチドは、細菌やウイルスなど病原微生物の認識機構であるToll-like receptor (TLR)などと併に生体の原始的な免疫機構、すなわち自然免疫機構と呼ばれており、記憶機能を備えた獲得免疫とは分けて考えられ、初期の感染防御機構に重要な役割を演じている。

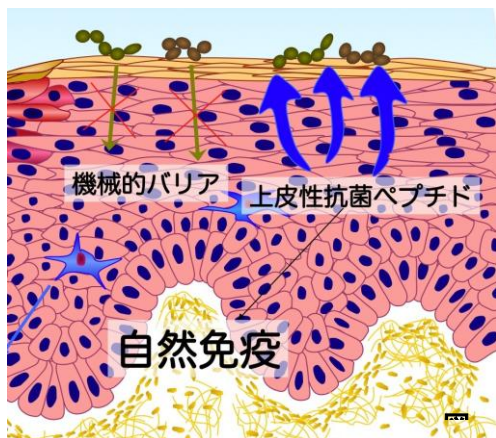


図1 機械的および化学的防御機構

口腔領域における活性型ビタミン D3 を用いた研究は、骨代謝に関わるもののみであり、口腔粘膜に関する報告はない。口腔粘膜上皮と同じ重層扁平上皮で覆われている皮膚では、活性型ビタミン D3 が上皮細胞の増殖・分化に影響し、さらに上皮細胞による細胞の認識および抗菌性ペプチドであるカセリディシンの産生という自然免疫機構において重要な役割を担っているという報告が最近なされ（J Clin Invest. 117:803-11, 2007.）、外傷や感染に対しての活性型ビタミン D3 の効果について臨床試験を始めている段階にある。

## 2. 研究の目的

小児の歯肉において自然免疫を担う抗菌性ペプチドの発現は、炎症程度により変化することが報告されている。小児の歯肉を構成する口腔粘膜重層扁平上皮は、成人と比較して角化が乏しく、細胞間結合も疎であり、分化の途中であると推察される。口腔粘膜上皮細胞の分化を促すことにより、病原微生物やそれらが産生する毒素の侵入を防ぐ機械的防御機構とともに、抗菌性ペプチドの発現とその上昇により、病原微生物の付着を防ぐ化学的防御機構も同時に亢進することが予想される。

本研究では、上皮細胞の増殖・分化に関与するといわれる 1,25-dihydroxyvitamin D3 (活性型ビタミン D3) を培養上皮細胞に添加し、上皮細胞の分化の促進と抗菌性ペプチドである $\beta$ ディフェンシン(hBD)-1、2、3およびCAP18/LL-37(LL-37)の化学的防御機構の発現変化および、Claudin(Cla)-1、-4、Occludin、ZO-1の機械的防御機構についての発現変化を観察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 化学的防御機構の検索

#### ① 細胞培養

ヒト正常角化細胞 (HaCaT 細胞) を 10%FBS 含有 DMEM にてディッシュおよびスライド上にて培養を行い活性型ビタミン D3 を 0、1、10、100nM 添加し、各濃度にて 4、8、24、48、72 時間培養を行った。

#### ② 定量的リアルタイム RT-PCR 法

HaCaT 細胞における化学的防御機構における hBD-1、hBD-2、hBD-3 および LL-37 の mRNA 発現は、定量的リアルタイム RT-PCR 法により分析を行った。活性型ビタミン D3 を各濃度・時間で添加した HaCaT 細胞の total RNA は、TRizol (Invitrogen 社製) を用いた acid

guanidine thiocyanate/phenol/chloroform法により抽出した。RT-PCR法を行うため、1  $\mu$ g の total RNA は oligo(dT)<sup>12-18</sup>primers および SuperScript reverse transcriptase(ともに Invitrogen 社製)を用い通法に従い逆転写 (RT) 反応を行った。

定量的リアルタイム RT-PCR 法では、プライマーおよびプローブのセットは TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystem 社製) で購入した。使用したプライマーの品番は以下の通りである。GAPDH: Hs99999905\_\_m1、hBD-1: Hs00608345\_m1、hBD-2: Hs0823638\_m1、hBD-3: Hs00218678\_m1、LL-37: Hs01011706\_m1。逆転写産物に Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem 社製) によって増幅を行った。定量化するにあたって hBD-1、hBD-2、hBD-3 および LL-37 の mRNA の発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH に対する比によって表すため、Livak et al による計算式、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  メソッドを使用し算出した。

## (2) 機械的防御機構の検索

### ① 細胞培養

HaCaT 細胞を 10% 含有 DMEM および、9.8mM Ca 含有 DMEM (c-DMEM)、および 40  $\mu$ M JNK 阻害剤 SP600125 (A.G Scientific 社製) 含有 c-DMEM (SPC-DMEM) にて培養し、(1)と同様に活性型ビタミン D3 を添加し、各時間培養した。

### ② 定量的リアルタイム RT-PCR 法

(1)と同様の方法にて行った。プライマーおよびプローブのセットは TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystem 社製) で購入した。使用したプライマーの品番は以下の通りである。GAPDH: Hs99999905\_\_m1、Cla-1: Hs01076359\_m1、Cla-4: Hs00533616\_s1、Ocl: Hs00170162\_m1、Zo-1: Hs01551876\_m1。

### (3) 統計分析

リアルタイム RT-PCR 法から得られたデータの比較検定には *t* 検定を用い、有意差は危険率 5% 以下とした。

## 4. 研究成果

### (1) 化学的防御機構の検索

活性型ビタミン D3 添加時の HaCaT 細胞における hBD-1、hBD-2、hBD-3 および LL-37 の発現変化

HaCaT 細胞に活性型ビタミン D3 を添加した時の hBDs および LL-37 の発現変化を調べるために、HaCaT 細胞の培養液に活性型ビタミン D3 を 0、1、10、100nM 添加し、各濃度にて 4、8、24、48、72 時間培養し添加した時の hBD-1、hBD-2、hBD-3 および LL-37 mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法により観察した。(図 2a、2b、2c、2d)

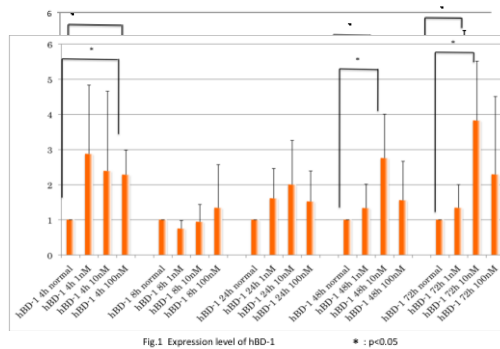


図 2a 活性型ビタミン D3 添加時の hBD-1 の経時変化

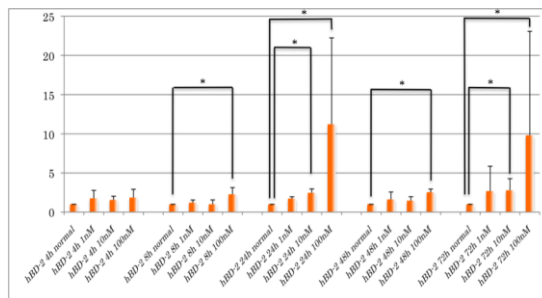


図 2b 活性型ビタミン D3 添加時の hBD-2 の経時変化

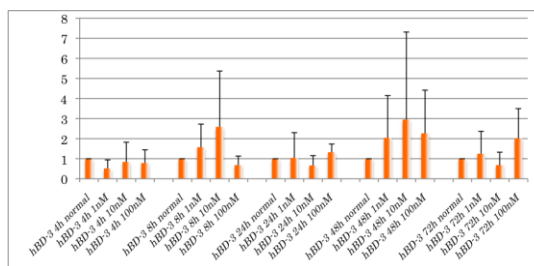


図 2c 活性型ビタミン D3 添加時の hBD-3 の経時変化

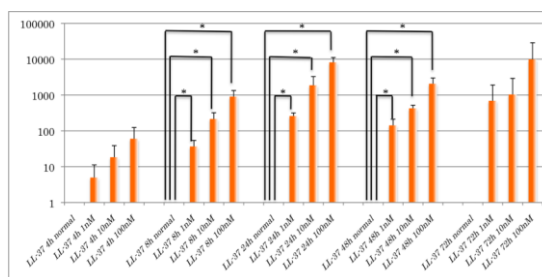


図 2d 活性型ビタミン D3 添加時の LL-37 の経時変化

hBD-1 では、活性型ビタミン D3 を 10nM 添加することにより有意差を認めた。hBD-2 では、4 時間では有意差は認めないものの 8、24、48、72 時間で有意差を認めた。LL-37 においては 8、24、48、72 時間において著明な有意差をみとめた。しかし、hBD-3 においては全

での濃度および時間において有意差はみとめられなかった。

## (2) 機械的防御機構の検索

活性型ビタミン D3 添加時の HaCaT 細胞における Cla-1、Cla-4、Oc1、Zo-1 の発現変化

HaCaT 細胞を様々な状態での活性型ビタミン D3 を添加した時の機械的防御機構に関連する Cla-1、Cla-4、Oc1、Zo-1 の発現変化を調べるために、DMEM(図 3a、3b、3c、3d)、c-DMEM(図 4a、4b、4c、4d)、SPC-DMEM(図 5a、5b、5c、5d)の各培養液にて培養した。その後、活性型ビタミン D3 を 0、1、10、100nM 添加し、各濃度にて 4、8、24、48、72 時間培養し添加した時の Cla-1、Cla-4、Oc1 および ZO-1 mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法により観察した。

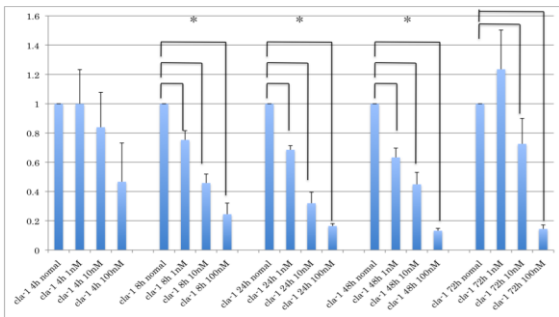


図 3a DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の Cla-1 の経時変化

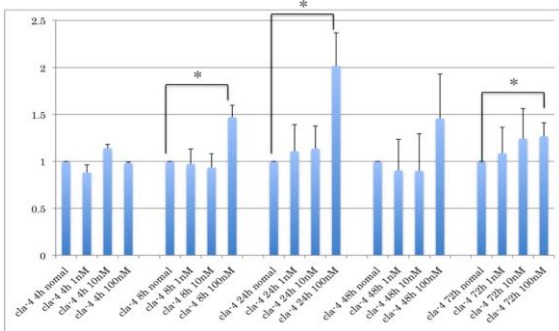


図 3b DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の Cla-4 の経時変化

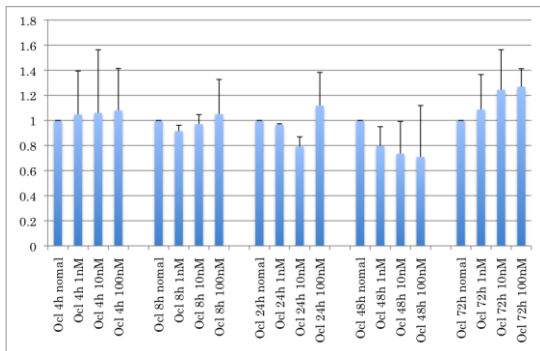


図 3c DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の Oc1 の経時変化

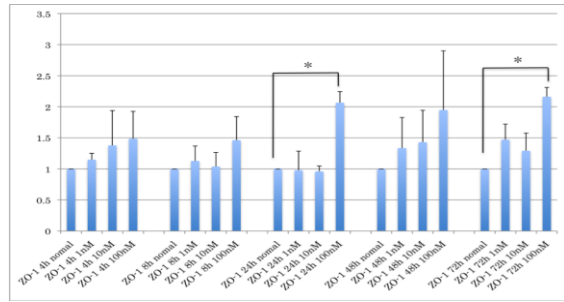


図 3d DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の ZO-1 の経時変化

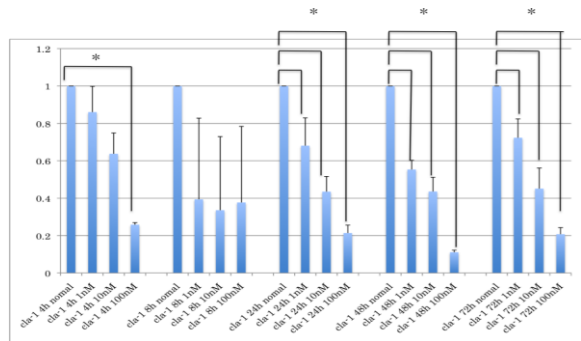


図 4a c-DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の Cla-1 の経時変化

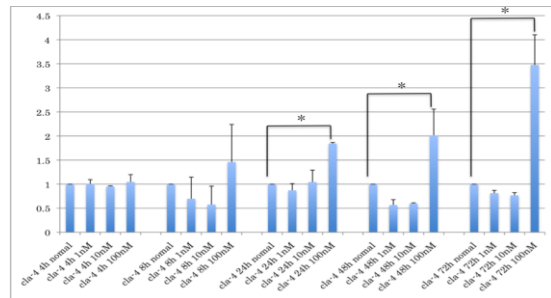


図 4b c-DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の Cla-4 の経時変化

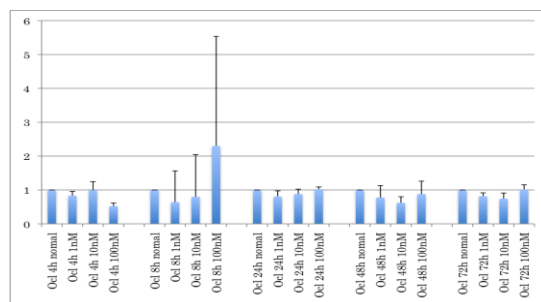


図 4c c-DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の Oc1 の経時変化

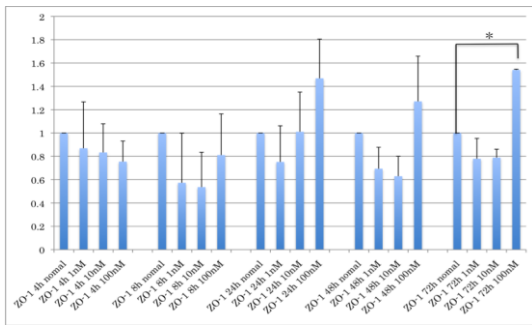


図 4d c-DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の ZO-1 の経時変化

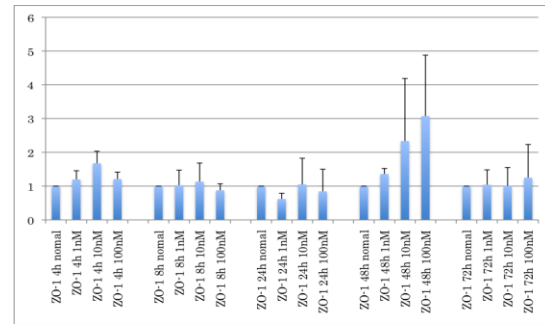


図 5d SPC-DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の ZO-1 の経時変化

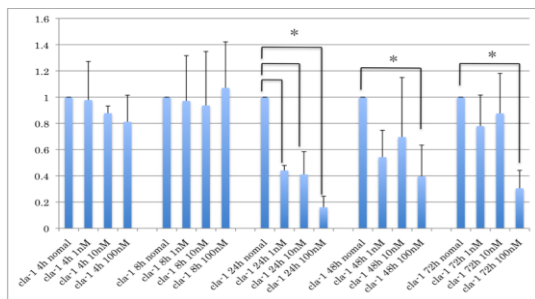


図 5a SPC-DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の Cla-1 の経時変化

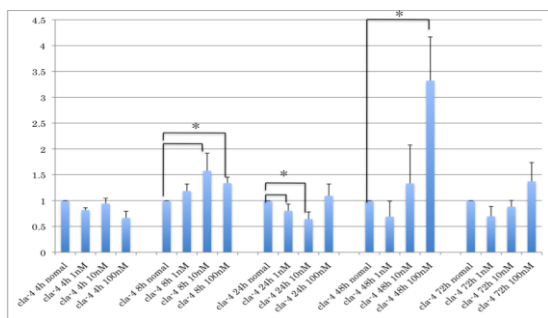


図 5b SPC-DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の Cla-4 の経時変化

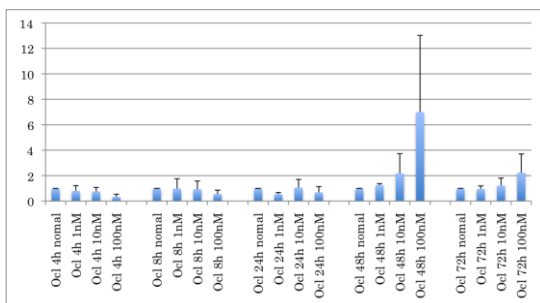


図 5c SPC-DMEM における活性型ビタミン D3 添加時の Oc1 の経時変化

Cla-1 では、DMEM においては 4 時間以外の全ての時間および濃度に有意な減少を認めた。c-DMEM および SPC-DMEM では 24、48 および 72 時間において有意な減少を認めた。Cla-4 では DMEM において 8、24 および 72 時間の活性型ビタミン D3 を 100nM 添加したもので有意な上昇を認めた。c-DMEM では、24、48 および 72 時間の活性型ビタミン D3 を 100nM 添加したもので有意な上昇を認めた。しかし、SPC-DMEM においては、8 および 48 時間の活性型ビタミン D3 を 100nM 添加したもので有意な上昇を認めるものの、24 時間では一部の濃度で有意な減少を認めた。Oc1 は DMEM、c-DMEM、SPC-DMEM の全ての時間および濃度において有意な差は認めなかった。ZO-1 では、DMEM において 24 および 72 時間の活性型ビタミン D3 を 100nM 添加にて有意な上昇を認めた。c-DMEM では 72 時間において活性型ビタミン D3 を 100nM 添加したもののみに有意な上昇を認めた。しかし、SPC-DMEM では ZO-1 の有意な差は認めなかった。

## 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 2 件)

- ① Saitoh M, Kurashige Y, Nishimura M, Yamazaki M, Igarashi S, Kaku T, Abiko Y. Expression of claudin-4 and -7 in porcine gingival junctional epithelium. Med Mol Morphol. 査読有、2009 Dec;42(4):212-5.
- ② 高藤美帆子、齊藤正人、倉重圭史、安彦善裕、五十嵐清治、ストレス関連分泌介在物質がβディフェンシン発現変化に及ぼす影響、小児歯科学雑誌、査読有、1 巻、2011、1-10

[学会発表] (計 3 件)

- ① YOSHIHITO KURASHIGE、Effect of Vitamin D3 on

Antimicrobial Peptides Expression in Keratinocytes、International Association for Dental Research 88<sup>th</sup>、July 14-17, 2010、Barcelona, Spain

- ② 村井雄司、活性型ビタミン D3 による抗細菌ペプチドの発現変化、第 48 回日本小児歯科学会、2010 年 5 月 19-20 日、名古屋（愛知県）
- ③ 倉重 圭史、乳歯における突発性内部吸収症例と文献的考察、第 27 回日本小児歯科学会北日本地方会、2009 年 10 月 24 日、石巻専修大学（宮城県）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 永末書店、小児の歯科治療 [診察・検査・診断]、2010、p351、

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉重 圭史 (KURASHIGE YOSHIHITO)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：30453278