

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592095

研究課題名（和文） 抗菌性ペプチドが免疫応答に与える影響

研究課題名（英文） Effect to immunoresponse of antibacterial peptides

研究代表者

神原 賢治 (KANBARA KENJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60305141

研究成果の概要（和文）：

本研究では、LL-37 と細菌由来の DNA が相互作用し、生体内で安定的に存在する可能性を示唆した。さらに、善玉コレステロールの成分である Apo-A1 との相互作用も認めた。これらは、効果的に免疫系を刺激する作用や、メタボリック症候群と何らかの作用を示すことが考えられる。また、口腔歯肉上皮細胞に対して、LL-37 やそれら複合体が、CXCL10 の発現を上昇させる傾向がみられたが蛋白レベルにおいて顕著な増加を確認できておらず、明らかでない。

研究成果の概要（英文）：

In this study, it was demonstrated that LL-37 interacted with bacterial DNA/RNA and these complexes were tolerated to several nuclease. Furthermore, LL-37 interacted to apolipoprotein-A1 (Apo-A1) which is a component of high density lipoprotein. It was considered that these complexes stimulate immune system effectively for a long time and LL-37-Apo-A1 complexes may be associated between metabolic syndrome. Those complexes tend to increase expression of CXCL10 in gingival epithelia cells, Ca9-22 cells. However, we have been not confirming increase of CXCL10 protein secretion level yet.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：【歯科・病態科学系歯科・歯科放射線科】

キーワード：LL-37

1. 研究開始当初の背景

口腔は絶えず食物や呼気中の病原微

生物の侵入があり、これらに対して絶えず防御する必要がある。それ故、迅速な防御機構の発動という観点から先天性(自然)免疫機構を中心とした微生物感染防御機構が最重要と考えられる。

近年、先天性(自然)免疫における抗菌性ペプチドの重要な報告として、抗菌性ペプチド LL-37 が、自己DNAと結合し樹状細胞を活性化するという報告がなされた。これら報告は、抗菌性ペプチドである LL-37 が、抗菌活性のみを持った分子ではなく、幅広く免疫系を制御する多機能分子である事を示し、LL-37 が幅広く慢性炎症性疾患の病態形成に強く関連している事を強く示唆する物である。

このように、LL-37 に関しては従来考えられていなかった免疫機構調節機能がある事が報告されたが、これら機能と疾患との関わりに関する報告は唯一、乾癬に関する報告だけである。

口腔内における慢性炎症疾患としては歯周病が挙げられる。これまでの研究から、歯周病態が進行するにつれ、LL-37 の唾液中の含有量が高まっている事などが示唆されている。すなわち、歯周病態と LL-37 との間に何らかの関連性がある可能性があり、疾患を形成する為の重要な分子である可能性が予想された。

上記を踏まえて、LL-37 が病態形成の促進や抑制に関わる分子である事が高く、逆にこの分子をプローブもしくはマーカーとして利用すれば、病態形成の解明に役立つと考えられた。

2. 研究の目的

近年の抗菌ペプチドの研究は免疫応答や疾患を解明する一機能分子として捉えられつつあり、LL-37 が免疫細胞の初期駆動や活性の持続、免疫応答の相加・増強作用に関与し、病態形成に強く働きかけている可能性が考えられる。この事から、自然免疫を担う抗菌性ペプチドの免疫系に与える影響と、病態

形成並びに回復に至る過程でどのような影響・作用を与えているのかと思ひ、本研究の着想に至った。

本研究の目的は、LL-37 がどのような機序で免疫応答に作用し、どのような影響を与えるのかを明らかにする事と、新規の作用分子の探索し見出すことで、全身疾患への強い関連性を示唆することである。

3. 研究の方法

1. ペプチドの調製

本研究で用いた LL-37 並びにコントロール配列 GL37 はペプチドシンセサイザーにて化学合成した。化学合成したペプチドは、逆相シリカゲルカラム (ODS-HPLC) にて精製した。精製したペプチドは、TOF-MS により分子量を確認することで同定・確認した。

2. LL-37 と細菌由来 DNA (bDNA) との結合能の評価

歯周細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) を嫌気培養し、遠心にて菌体を回収後に ISOGEN もしくは SDS 処理にて bDNA 又は bRNA を抽出した。抽出された bDNA は RNase 処理を行い、bRNA は DNaseI 処理を施したものをすべての評価に用いた。生理的塩濃度下により bDNA 1 μ g に対してそれぞれ LL-37、GL-37、hBD3 の添加量を段階的に上げて混合し、30 分複合体形成処理を行った。処理後、1%アガロース電気泳動にて、bDNA のバンドの消失を指標として結合能を判断した。

3. DNaseI 耐性並びに血清中での安定性

複合体を組ませた後、DNaseI を行い、SDS 入り色素と混合後、1%アガロース電気泳動にてバンドの消失の有無によって判断した。血清中での評価は、E-MEM 中にて複合体を形成後、10%となるよう牛血清を添加し、経時

的にサンプリングを行い、SDS 入り色素と混合後、1%アガロース電気泳動にてバンドの消失の有無によって判断した。

4. LL-37 と apolipoproteinA-1 (apoA-1)

との相互作用試験

apoA-1 に対し LL-37 を 5、10、20 倍量添加後、混合静置した。それらを、ゲル濾過カラム (Synchropak GPC100) を用いて分析した。分析条件として、PBS(-)を溶出溶媒としたアイソクラテック分析を行った。LL-37 未添加 apoA-1 のピークエリア面積と比した時のピークエリア面積減少率を評価することで相互作用を確認した。

5. RNA 並びにタンパク質調製

歯肉上皮細胞 (Ca9-22) に LL-37、bDNA 並びにそれら複合体等を処理した。任意の時間で細胞を回収後 ISOGEN により RNA 又はタンパク質を調製し、それらを RT-PCR、ウエスタンブロットに使用した。PCR のプライマーとして、CXCL9-11 を用いた。

4. 研究成果

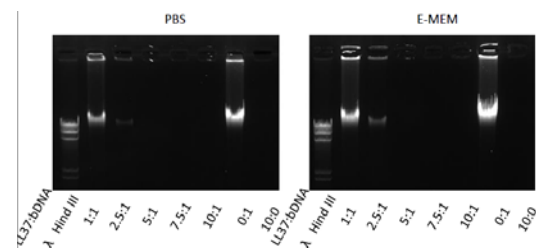
1. ペプチドの調製

LL-37 は化学合成後 ODS-HPLC にて精製し、MALDI-TOF-MS 分析を行った。その結果、分子量の一致を確認した。更に精製物の ODS-HPLC 分析により単一ピークである事、ウエスタンブロットで単一バンドである事なども確認した。

2. LL-37 と細菌由来 DNA (bDNA) との結合能の評価

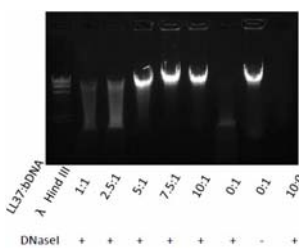
bDNA に対して、5 倍量以上の LL-37 を混合する事で、bDNA のバンドが完全に消失した。これは、PBS (-)、E-MEM 培地中でも同様で

あった。



また、PBS(-)下で混合後、DNaseI 処理を行ったところ、bDNA に対してほぼ 5 倍以上添加混合した場合、DNA の分解を抑制できた。E-MEM 中 10%となるように牛血清を添加した場合も同様に bDNA の分解を抑制した。また、同じアミノ酸組成であるが配列が異なる GL-37 は、bDNA との結合は認められたものの、DNaseI 等の DNA 分解酵素に対する耐性が認められなかった。

他の抗菌性ペプチドである hBD3 を用いて同様に評価したところ、LL-37 と同様 bDNA と結合したが、GL-37 と同様に DNaseI に対する DNA の分解を回避できなかった。このことから、チャージ等による 2 分子間の相互作用が必ずしも DNA の分解抑制活性を引き出すのではなく、配列特異的 (立体配座特異的) である可能性が考えられ、LL-37 に特徴的に認められる DNA 分解抑制作用であると考えられた。



LL-37 の bDNA への結合活性は、bDNA 同様認められ、更に RNaseA に対する分解を抑制した。これらから、LL-37 は核酸と結合することで、種々の酵素からの分解を保護する活性を持っていることが明らかとなった。

2. LL-37 と apolipoproteinA-1 (apoA-1)

との相互作用試験

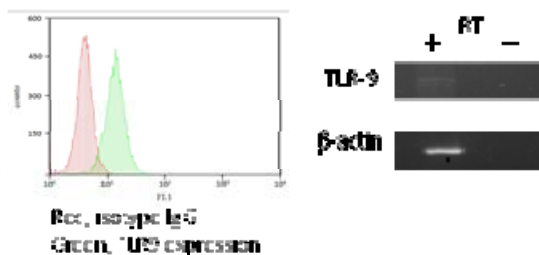
ApoA-1 のエリア面積は、LL-37 の添加量に比例し減少した。bDNA と LL-37 が相互作用すると考えられる。

Apo-A1:LL37量比	1:00	1:05	1:10	1:20
Apo-A1エリア面積	914.9	641.2	538.5	360.5

また、唾液を用いたウエスタンブロットにより、唾液中に ApoA-1 の存在が確認された。

3. RNA 並びにタンパク質発現

本実験は歯肉上皮細胞を用いて bDNA に対する細胞応答を評価する為、使用する細胞 (Ca9-22) に DNA センサーの 1 つである TLR9 の発現があるか否かをまず確認した。その結果、mRNA、蛋白レベルでその発現を確認した。いずれの評価においても発現が確認された事で、口腔内上皮細胞も bDNA を認識出来る可能性が考えられた。



次に、LL-37 を始めとする種々の物質を処理した後に、RNA を抽出し、RT-PCR 分析を行った。LL-37 処理細胞において CXCL10 の mRNA 発現の増加傾向が見られたが、蛋白レベルにおいては、評価中である。双方の結果については、更に、詳細な検討を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Antimicrobial peptide LL-37 promotes vascular endothelial growth factor-A expression in human periodontal ligament cells. Kittaka M, Shiba H, Kajiya M, Ouhara K, Takeda K, Kanbara K, Fujita T, Kawaguchi

H, Komatsuzawa H, Kurihara H. J Periodontol Res. 2013 Apr;48(2):228-34. (査読有)
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0765.2012.01524.x/pdf>

2. Association of CiaRH with resistance of Streptococcus mutans to antimicrobial peptides in biofilms. Mazda Y, Kawada-Matsuo M, Kanbara K, Oogai Y, Shibata Y, Yamashita Y, Miyawaki S, Komatsuzawa H. Mol Oral Microbiol. 2012 Apr;27(2):124-35. (査読有)
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2041-1014.2012.00637.x/pdf>

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神原賢治 (KANBARA KENJI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 60305141

(2) 研究分担者

小松澤均 (KOMATSUZAWA HITOSHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 90253088