

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592924

研究課題名(和文) 神経ペプチドの新規機能の解明と炎症性口腔粘膜疾患への治療応用

研究課題名(英文) Investigation of new biological functions of neuropeptide and therapeutic application for oral mucosal diseases

研究代表者

太田 耕司 (Kouji, Ohta)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：20335681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：神経ペプチドは神経伝達物質としての機能だけでなく、口腔粘膜に対して免疫調節などの様々な機能を行っていると考えている。今回の研究から神経ペプチドであるghrelin, VIP が口腔粘膜に発現していることが示された。さらにghrelinは抗菌作用をもっており、口腔粘膜上皮細胞において炎症性サイトカインで誘導されるIL-8の発現誘導を抑制することが示された。一方、VIPは口腔粘膜細胞において血管新生因子であるVEGFの発現誘導と細胞走化性を上昇させることが示された。これらの結果、Ghrelin, VIPはそれぞれ口腔粘膜に対して免疫調節や創傷治癒に機能していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Neuropeptide including ghrelin and VIP is thought to have the role in regulating the function in immune system in oral mucosa as well as functioning as neurotransmitters. In this study, we showed expression of ghrelin and VIP constitutively expressed in oral keratinocytes. Ghrelin has antibactericidal effects against *E. coli* and *P. aeruginosa*. Furthermore, ghrelin inhibited the production of IL-8 from inflammatory cytokines in oral keratinocytes. On the other hands, vascular endothelial factor, VEGF was induced by VIP in oral keratinocytes, and VIP increased cell migration. In conclusion, we demonstrated that neuropeptide, ghrelin and VIP may function as an immune-modulation and wound healing factor in the oral mucosa.

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：神経ペプチド 口腔粘膜細胞 炎症性疾患

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。ghrelin は胃粘膜細胞から発見された 28 個のアミノ酸からなる神経ペプチドであり、成長ホルモンを分泌する働きだけでなく、消化管機能調節、エネルギー代謝、心機能の改善等、多彩な機能をもちつこと注目されている。一方、Vasoactive intestinal peptide (VIP) は消化管粘膜より抽出された血管拡張作用を持つ 28 個のアミノ酸からなる神経ペプチドである。近年、VIP が気道上皮細胞の増殖を増加させ、気道粘膜の創傷治癒を促進させる働きがあることが報告されている (Guan et al., Regul Pept 2009)。

ヒトは微生物の感染に対して皮膚、口腔から LL-37 等、抗菌ペプチドを発現している。我々はこれまでの研究から、ghrelin と同じ 28 のアミノ酸配列をもつ VIP が大腸菌、緑膿菌に対して抗菌作用を持つことを報告している (Ohta et al., J Neuroimmunol 2010)。さらに Ghrelin は抗菌ペプチド LL-37 と、似たアミノ酸配列、電荷を示すことを発見した。また 2 型糖尿病の患者の血清中では ghrelin の濃度が有意に低下していることが報告されている。これらのデータは ghrelin が抗菌活性をもつ可能性を示している。

ghrelin はさらに粘膜に対して抗炎症作用をもつことが報告されている。in vivo の結果において ghrelin の投与が、胃、腸の粘膜炎症性疾患の治癒に働くことが報告されている (Gonzalez RE et al. Gastroenterology. 2006)。しかしながら、Ghrelin の口腔粘膜における発現や、口腔粘膜に対する抗炎症作用は報告されていない。

今回、我々は ghrelin、VIP などの神経ペプチドが口腔粘膜に対して感染防御、炎症、創傷治癒など多彩な役割をもっていると仮説を立てた。

2. 研究の目的

今回、神経ペプチドの口腔粘膜に対する新規作用を検討するため、ghrelin の抗菌作用、および口腔粘膜上皮細胞に対する抗炎症作用、さらに VIP の口腔粘膜上皮細胞における創傷治癒作用を検討した。

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 を用いた。表皮角化細胞用増殖培地で培養を行った。

2) 用いた菌株

大腸菌 ATCC27325 株、緑膿菌 15692 株、黄色ブドウ球菌 ATCC26538P 株を用いた。培養は brain Heart infusion (BHI) 液体、寒天培地で行った。

3) 口腔粘膜上皮細胞における神経ペプチド mRNA の発現解析

コンフレンスにした RT7 より mRNA を抽出し、cDNA を作製、RT-PCR 法によって神経ペプチド mRNA の発現を検討した。また健常人の口腔粘膜を擦過したサンプルから mRNA を抽出し、同様の検討を行った。

4) 口腔粘膜上皮における神経ペプチドの発現

健常人から口腔粘膜組織を採取し、パラフィン包埋切片を神経ペプチド抗体で免疫組織学的染色を行い、神経ペプチドの発現を検討した。

5) 炎症性サイトカイン、細菌構成成分による発現誘導の解析

RT7 を Th 1 サイトカインである IFN- γ 、TNF- α 、グラム陰性菌細胞壁構成成分である Lipopolysaccharide (LPS) を添加し 12 時間後の mRNA を抽出、Real-time PCR 法によって mRNA の発現の増加を検討した。

6) 炎症性サイトカインで誘導される

IL-8, CXCL10 における神経ペプチドの影響
RT7 に神経ペプチドを前処理し、TNF- α , LPS

を添加し，48 時間後，上清を採取し，IL-8, CXCL10 蛋白の定量を ELISA 法 を行った．

7) 神経ペプチドの抗菌活性と抗菌ペプチド LL-37 の相加・相乗作用

様々な濃度の神経ペプチドあるいは LL-37 と大腸菌，緑膿菌，黄色ブドウ球菌を 37 で 2 時間反応させ，BHI 寒天培地に巻き，48 時間後の生菌率として計算した．

8) VEGF 発現における神経ペプチドの影響 RT7 に神経ペプチドを添加し，経時的な VEGF A, VEGF B mRNA の発現を RT-PCR 法で検討した．また同様に，神経ペプチドを添加し，48 時間後の上清を採取し，VEGF 蛋白の発現を ELISA 法にて定量した．

9) 細胞走化性に対する神経ペプチドの影響 RT7 を 6well plate にコンフルエンスになるように播種し，デッシュの中心部に wound を形成した後，神経ペプチドを添加し，経時的の幅の計測を行った．

4. 研究成果

1) 神経ペプチド mRNA の発現解析

RT7 において定常的な ghrelin, VIP mRNA の発現が認められた．また ghrelin の細胞内受容体である growth hormone secretagogue receptor (GSH), VIP の受容体である VPAC1, VPAC2 の mRNA の発現も同様に認められた．また健常人の口腔粘膜擦過サンプルからも ghrelin, VIP mRNA の発現が認められた．

2) 神経ペプチドの口腔粘膜における発現 健常人の口腔粘膜組織における ghrelin 抗体の免疫組織学的染色の結果，上皮組織，結合組織から ghrelin 蛋白の発現が認められた．

3) 炎症性サイトカインによる発現誘導 IFN- γ , TNF- α の添加によって明らかな ghrelin, VIP mRNA の発現の誘導は認められなかった．

4) 炎症性サイトカインで誘導される IL-8, CXCL10 における神経ペプチドの影響 TNF- α , LPS で誘導される IL-8 の発現が ghrelin を添加することによって濃度依存

的に抑制された．一方で TNF- α で誘導される CXCL10 の発現には影響は認められなかった．

5) 神経ペプチドの抗菌活性

大腸菌，緑膿菌に ghrelin を添加することによって，濃度依存的に抗菌活性が認められた．黄色ブドウ球菌には ghrelin の抗菌活性は認められなかった．

6) 抗菌ペプチド LL-37 の相加・相乗作用 大腸菌，緑膿菌に ghrelin と LL-37 を同時添加することによって両者の単独添加に比較して，相加・相乗的な抗菌作用の増加が認められた．一方で，他の抗菌ペプチドである HBD-1, HBD-4 と ghrelin との相乗的な抗菌効果は認められなかった．

7) VEGF 発現における神経ペプチドの影響 RT7 に VIP を添加することによって，時間依存的な VEGF A, VEGF B mRNA の発現の増加が認められた．また V RT7 に VIP を添加することによって，細胞上清中の VEGF 蛋白の濃度依存的な発現の増加が認められた．一方，Ghrelin や他の神経ペプチドである Orexin B, substance P の添加では VEGF の発現誘導は認められなかった．

8) 細胞走化性に対する神経ペプチドの影響 VIP を添加することによって，wound の幅が有為に小さくなることから，RT7 の細胞走化性が上昇することが認められた．

今回の研究の成果から，ghrelin は口腔粘膜で発現しており，抗菌作用をもつこと，また口腔粘膜上皮細胞に対して抗炎症作用をもつことが明らかとなった．さらに口腔粘膜で発現している VIP は口腔粘膜細胞の VEGF の発現を増加させ，細胞遊走性を増加させる作用をもつことが明らかになり，口腔粘膜の創傷治療作用をもつ可能性が示された．今後さらに ghrelin を含む神経ペプチドによる多彩な新規メカニズムを明らかにし，口腔感染症や，口腔粘膜炎症性疾患に対する新しい治療，検査法を検討していくことを計画している．

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 11 件)

1) Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated IL-8 production by human submandibular gland epithelial cells.

Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Mizuta K, Nishi H, Takechi M, Kamata N

Mol Med Rep. accepted. (査読あり)

2) Itraconazole inhibits TNF- α -induced CXCL10 expression in oral fibroblasts.

Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Nishi H, Naruse T, Takechi M, Kamata N. Oral Dis. 2014.

doi: 10.1111/odi.12226. (査読あり)

3) Expression of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in ossifying fibromas. Hatano H, Ogawa I, Shigeishi H, Kudo Y, Ohta K, Higashikawa K, Takechi M, Takata T, Kamata N.

Histol Histopathol. *Histol Histopathol* 28:473-480, 2013.(査読あり)

4) Bone formation and osseointegration with titanium implant using granular- and block-type porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA). Minami M, Takechi M, Ohta K, Ohta A, Ninomiya Y, Takamoto M, Fukui A, Tada M, , Kamata N. *Dent Mater J* 32:753-760, 2013. (査読あり)

5) Risk of bacterial contamination of bone harvesting devices used for autogenous bone graft in implant surgery. Takamoto M, Takechi M, Ohta K, Ninomiya Y, Ono S, Shigeishi H, Tada M, Kamata N. *Head Face Med*. 2013 Jan 11;9:3. doi:

10.1186/1746-160X-9-3. (査読あり)

6) Interleukin-8 and CXCL10 expressions in oral keratinocytes and fibroblasts via Toll-like receptors. Fukui A, Ohta K, Nishi H, Shigeishi H, Tobiume K, Takechi M,

Kamata N. *Microbiol Immunol* 57:198-206, 2013. (査読あり)

7) Clinical evaluation of novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA) in a maxillary sinus floor augmentation procedure. Shigeishi H, Takechi M, Nishimura M, Takamoto M, Minami M, Ohta K, Kamata N. *Dent Mater J* 31:54-60, 2012. (査読あり)

8) Establishment of mesenchymal cell line derived from human developing odontoma. Hatano H, Kudo Y, Ogawa I, Shimasue H, Shigeishi H, Ohta K, Higashikawa K, Takechi M, Takata T, Kamata N. *Oral Dis*18:756-762, 2012. (査読あり)

9) 3-dimensional composite scaffolds consisting of apatite-PLGA-atelocollagen for bone tissue engineering. Takechi M, Ohta K, Ninomiya Y, Tada M, Minami M, Takamoto M, Ohta A, Nakagawa T, Fukui A, Miyamoto Y, Kamata N. *Dent Mater J* 31:465-471, 2012. (査読あり)

10) The antimicrobial activity of the appetite peptide hormone ghrelin. Min C, Ohta K, Kajiya M, Zhu T, Sharma K, Shin J, Mawardi H, Howait M, Hirschfeld J, Bahammam L, Ichimonji I, Ganta S, Amiji M, Kawai T. *Peptides* 36:151-156, 2012. (査読あり)

11) Expression and possible immune-regulatory function of ghrelin in oral epithelium. Ohta K, Laborde NJ, Kajiya M, Shin J, Zhu T, Thondukulam AK, Min C, Kamata N, Karimbux NY, Stashenko P, Kawai T. *J Dent Res* 90:1286-1292, 2011. (査読あり)

〔学会発表〕(計 13 件)

1) 口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* β -glucan による酸化ストレスと Hemeoxygenase-1 の発現誘導: 石田陽子, 太

田耕司, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 鳴瀬貴子, 武知正晃, 鎌田伸之: 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念大会・総会(2013. 11.23 東京)

2) 口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* β -glucan による

Hemeoxygenase-1 の発現誘導: 石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 鳴瀬貴子, 武知正晃, 鎌田伸之: 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会(2013. 10.12 福岡)

3) 口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* β -glucan による

Hemeoxygenase-1 の発現誘導と酸化ストレスに対する防御応答: 石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 鳴瀬貴子, 武知正晃, 鎌田伸之: 第 23 回口腔内科学会・第 26 回口腔診断学会 合同学術大会(2013. 9.13 東京)

4) Bacterial adhesion on osteoconductive-treated titanium implants: Takamoto M, Takechi M, Ohta K, Tsuru K, Nikawa H, Ishikawa K, Kamata N. : 第 46 回広島大学歯学会総会 (2013.6. 29 広島)

5) 口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* による Hemeoxygenase-1 の発現誘導: 石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 鳴瀬貴子, 武知正晃, 鎌田伸之: 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術大会 (2013.5.22 宇都宮)

6) 歯肉線維芽細胞における炎症性ケモカイン発現誘導に対するアゾール系抗真菌剤イトコナゾールの抑制作用の検討: 石田 陽子, 太田 耕司, 福井 暁子, 西 裕美, 武知 正晃, 鎌田 伸之: 第 49 回日本口腔組織培養学会学術大会(2012.11.17 広島)

7) 歯肉線維芽細胞の炎症性ケモカイン発現誘導に対するイトコナゾールの抑制作用の検討: 太田 耕司, 福井 暁子, 西 裕美, 石田 陽子, 武知 正晃, 鎌田 伸之: 第 25 回日

本口腔粘膜学会・第 22 回日本口腔粘膜学会合同学術大会(2012. 9.20 東京)

8) 口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞における抗真菌剤イトコナゾールの抗炎症作用の検討: 太田 耕司, 福井 暁子, 西 裕美, 石田 陽子, 武知 正晃, 鎌田 伸之: 第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2012. 5.17 広島)

9) 口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞における RIG-I シグナルの機能解析: 福井 暁子, 太田 耕司, 重石 英生, 西 裕美, 武知 正晃, 鎌田 伸之: 第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会 (2011. 10.22 大阪)

10) Expression and function of Retionic acid-inducible gene-1 (RIG-I) in oral keratinocyte and fibroblast: Fukui A, Ohta K, Shigeishi H, Nishi H, Takechi M, Kamata N: 4th Hiroshima Conference on Education and science in Dentistry (2011. 10.10 Hiroshima)

11) 口腔粘膜上皮細胞, 歯肉線維芽細胞における Toll-like receptor を介した炎症性ケモカインの発現誘導: 太田 耕司, 福井 暁子, 西 裕美, 重石 英生, 武知 正晃, 鎌田 伸之: 第 21 回日本口腔粘膜学会総会・学術大会(2011. 9.24 鹿児島)

12) 口腔粘膜上皮細胞, 歯肉線維芽細胞における RIG-I の発現とシグナル伝達経路の機能解析: 福井 暁子, 太田 耕司, 重石 英生, 西 裕美, 武知 正晃, 鎌田 伸之: 第 21 回日本口腔粘膜学会総会・学術大会(2011. 9.24 鹿児島)

13) 口腔粘膜上皮細胞, 歯肉線維芽細胞における RIG-I を介した炎症性ケモカインの発現とシグナル伝達経路の解析: 福井 暁子, 太田 耕司, 重石 英生, 西 裕美, 武知 正晃, 鎌田 伸之: 第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2011. 4.21 東京)

6. 研究組織
(1) 研究代表者 太田 耕司(Ohta, Kouji)

広島大学・病院・助教
研究者番号：20335681

(2) 研究分担者 重石 英生 (Shigeishi, Hideo)
広島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号：90397943

研究分担者 武知 正晃 (Takechi, Masaaki)
広島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授
研究者番号：00304535

研究分担者 鎌田 伸之 (Kamata, Nobuyuki)
広島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：70242211