

<抄録>3. 小児歯肉における ディフェンシン -1, -2, -3mRNAの発現解析

著者名(日)	島袋 鎮太郎, 齋藤 正人, 坂口 也子, 野呂 大輔, 西村 学子, 賀来 亨, 五十嵐 清治, 安彦 善裕
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	21
号	1
ページ	177
発行年	2002-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008708/

検討を行った。

【方法】骨芽細胞MC3T3-E1および骨細胞MLO-Y4にシェアストレスを負荷し、核蛋白を精製した。マウスCOX-2遺伝子のプロモーター領域に存在する転写調節因子結合配列を含むオリゴヌクレオチドを合成し、³²Pで標識後、精製した核蛋白を用いてゲルシフトアッセイを行った。また、転写開始点の5'上流の転写調節領域をルシフェラーゼベクターに組み込み、ルシフェラーゼアッセイを行った。PGE2合成酵素についてはそのmRNAの発現量を検討した。

【結果】ゲルシフトアッセイの結果、骨芽細胞MC3T3-E1では、AP-1および C/EBPβのelementに、骨細胞MLO-Y4においてはCRE elementに結合する蛋白がシェアストレスによって増強された。骨芽細胞MC3T3-E1を用いたルシフェラーゼアッセイにおいては、CRE、AP-1および C/EBPβに活性が見られた。

【結論】骨芽細胞および骨細胞において、COX-2はシェアストレスの負荷によってAP-1、C/EBPβ、CRE elementを介して転写が増強されていることが示唆された。

3. 小児歯肉におけるβディフェンシン-1,-2,-3 mRNAの発現解析

○島袋鎮太郎, 齋藤 正人, 坂口 也子, 野呂 大輔, 西村 学子*, 賀来 亨*, 五十嵐清治, 安彦 善裕*
(北海道医療大学歯学部小児歯科学講座・*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座)

【目的】βディフェンシンは各種上皮細胞での発現が報告されており、歯肉口腔粘膜上皮でもβディフェンシンの発現が確認されている。ヒトβディフェンシン(hBD)はグラム陽性、陰性菌および真菌などの、う蝕や歯周炎の原因菌に幅広い抗菌作用が報告され、これらの疾患の予防に関与することが示唆されている。

本研究では、小児歯肉におけるhBD-1,-2,-3 mRNAの発現状態を明らかにし、その発現と炎症程度の相関について検索することを目的とした。

【方法】口腔粘膜のhBD mRNAの局在を確認するため、hBD-2のIn situ hybridizationを行った。HBD-2 cDNAからジゴキシゲニン標識アンチセンスRNAプローブを作製し、抗ジゴキシゲニン抗体により検出した。小児歯肉のhBD-1,-2,-3 mRNAと口腔粘膜上皮の炎症

マーカーであるIL-8 mRNAの発現を定量するため、Real Time PCR法装置であるLight Cycler™を用いた。

【結果および考察】小児歯肉において、免疫染色ではhBD-2タンパクが重層扁平上皮角化層直下の顆粒層に局在し、in situ hybridizationではhBD-2 mRNAが顆粒層から棘細胞層の上皮内に広く局在していた。

hBD-1とIL-8 mRNA発現量は強い相関係数が認められた。hBD-2とIL-8 mRNAは極めて強い相関係数を有し、hBD-3とIL-8 mRNAでも極めて強い相関係数を有した。

以上から、小児歯肉の炎症程度とhBD-1,-2,-3 mRNAの発現が相関することが認められ、歯肉炎とβディフェンシンの密接な関係が示唆された。

4. βディフェンシン 2 プロモータ領域の変異が転写発現活性におよぼす影響

○西村 学子, 安彦 善裕, 草野 薫, 荒川 俊哉*, 田隈 泰信*, 賀来 亨
(北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・*北海道医療大学歯学部口腔生化学講座)

【目的】βディフェンシン(hBD)は主に上皮細胞が産生する抗細菌性のタンパクである。口腔扁平上皮癌由来KB細胞は、hBD発現が他の細胞に比べ減弱し、またhBD-2のダイレクトシークエンシングにより、プロモータおよびエクソン領域数カ所に変異のあることが解った。本研究ではKB細胞におけるプロモータ領域の変異がhBD-2の転写発現活性に及ぼす影響について検討した。

【方法】KB細胞のhBD-2の変異部位の検索は、Total

DNA抽出後PCRによる増幅を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, CA) によるダイレクトシークエンシングによって変異部位を同定した。hBD-2のプロモータ領域の転写活性の確認はLuciferase reporter assayにより変異が確認されたhBD2プロモータ領域を含むものと、それをGeneEditor in vitro Site-Direct Mutagenesis (Invitrogen, CA) により変異を正常に置換した配列を含むluciferase gene constructを作