

<学会記録II>4 . バイオインフォマティクスにより存在が予想された新規 ディフェンシンの諸臓器での発現(東日本歯学会第21回学術大会一般講演抄録)

著者名(日)	山崎 真美, 安彦 善裕, 西村 学子, 草野 薫, 荒川 俊哉, 田隈 泰信, 賀来 亨
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	22
号	1
ページ	96-97
発行年	2003-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008795/

における*P. gingivalis*のタンパク質発現にquorum sensingが関与するかは不明である。今回は*P. gingivalis*の親株および*luxS*変異株における菌体タンパク質をプロテオーム的に解析し若干の検討を行った。

【方法】*P. gingivalis* ATCC33277の*luxS*遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入し変異株を作製した。親株と変異株を培養後、菌体の2次元電気泳動を行った。スポットボリュームに差異のみられたもののアミノ酸シーケンスを行い、データベースより物質を特定した。

【結果および考察】親株と*luxS*変異株の菌体の2次元電気泳動の結果、親株の方がスポットボリュームが大きいスポットはarginine-specific cystein proteinase (RGP)であり、変異株の方が大きいのはNAD-specific glutamate dehydrogenase, alanine dehydrogenaseであった。また、菌体のRGP活性も親株の方が強い傾向がみられた。以上のことより*luxS*遺伝子が関与するAI-2が*P. gingivalis*のRGP産生に若干影響している可能性が示唆された。(会員外共同研究者：相根義昌(東京農大))

3. 各種ディフェンシンペプチドの口腔扁平上皮癌細胞株への影響

○西村 学子*, 安彦 善裕*, 山崎 真美*, 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】抗細菌ペプチドは、生体を細菌感染から防御するための重要な働きを担っている。その一つであるディフェンシンは α (HNPs) と β (hBDs) に分けられ、前者は主として好中球、後者は様々な上皮細胞での発現が確認されている。HNPsは、細菌への毒性以外に高濃度ではある種の真核細胞にも毒性を示すとの報告がある。今回われわれは、HNPsとhBDsが口腔上皮細胞に与える影響について検討した。

【方法】細胞は正常口腔上皮および扁平上皮癌細胞株(SCC-9, SAS, Ca-9, HSC-4, KB, BSC-OF)を用いた。それぞれの細胞は無血清DMEM培地にHNP-1, hBD-1, -2を各0~50ug/ml濃度で添加し24時間および48時間後の細胞増殖率をdirect cell count法, BrdU incorporation, さらにXTTおよびDNA fragmentationによ

る細胞毒性についても検索した。また、細胞増殖効果のみられたものについては、それがEGF receptorやMAP kinaseを介したものであるか否かを検索するために、EGF receptor inhibitor tryphostin AG1478を10uM濃度, MAP kinase inhibitor UO126を25uM濃度でそれぞれ添加して細胞増殖効果を検討した。

【結果および考察】HNP-1およびhBDsは濃度依存的に細胞増殖傾向を示し、特にHNP-1が10ug/mlで有意な結果を得た。また、MAP kinase inhibitorを添加したものでは有意な増殖抑制効果を認めた。以上のことから、ディフェンシンの α , β いずれにおいても、低濃度では口腔扁平上皮癌細胞株の増殖促進効果があり、それにはMAP kinaseの系が関与していることが示唆された。

4. バイオインフォーマティクスにより存在が予想された新規 β ディフェンシンの諸臓器での発現

○山崎 真美*, 安彦 善裕*, 西村 学子*, 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) は主として上皮細胞が分泌する抗細菌性タンパクであり、ヒトではこれまでに6種類のタイプが単離されてきている。最近のcomputational searchにより31種類のhBDの存在していることが予想された (PNAS, 2002)。今回われわれは、この中でNCBIにmRNAの情報が公開されているものの、全身諸臓器での発現、およびそれらのサイトカイン等による誘導性について検索した。

【方法】材料には全身諸臓器から得られたcDNA (Multiple Tissues cDNA, Clontech社)および、皮膚、口腔上皮のケラチンサイトから得られたcDNAを用いた。NCBIから予想されるmRNAの情報を引き出し、hBD-18, -19, -20, -22, -23, -25, -26, -27, -29に対するprimerをデザインしてRT-PCR法およびLightCycler™による定量的PCR法を行った。また、ケラチンサイトでの発現の観察されたものについては、皮膚、口腔上皮由

来のケラチノサイト、口腔上皮由来細胞株にLPS, TNF- α , PMA, IL-1 β , IFN- γ を添加し発現の変動を同様にRT-PCR法にて観察した。

【結果および考察】hBD-18, -22, -23, -25, -27, -29 mRNAの発現が観察されたが, hBD-18と-29には臓器特異性が無く今回観察した全臓器, 組織で観察された。

HBD-18のケラチノサイトでの発現はいずれにサイトカイン等によっても発現の変動はみられなかったものの, hBD-29ではLPSおよびPMAによる発現の上昇が確認された。以上のことから, hBD-18およびhBD-29は上皮非特異的な新たなタイプのhBDであることが示唆された。

5. ヒト好中球由来抗菌蛋白質CAP18合成ペプチドによる口腔扁平上皮癌細胞のカスパーゼ非依存性アポトーシス

○伊藤 昭文, 奥村 一彦, 広瀬 公治*, 千葉 逸朗*, 柴田 考典
(北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座・*北海道医療大学歯学部口腔衛生学講座)

【目的】ヒト好中球から単離されたCathelicidin familyのうち分子量18kDaの塩基性抗菌蛋白質CAP18活性化ドメインペプチドhCAP18₁₀₉₋₁₃₅を作製し, 口腔扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍活性と, そのアポトーシスシグナルについて検討した。

【方法】細胞: 高浸潤性ヒト舌扁平上皮癌細胞SAS-H1と, ヒト歯肉線維芽細胞HGFを用いた。CAP18活性化ドメインペプチドの作製: C末端27アミノ酸残基(hCAP18₁₀₉₋₁₃₅: FRK SKEKIGKEFK RIVQRIKD-FL)の合成ペプチドをペプチド研究所(京都)に依頼合成した。細胞生存率: トリパンブルー排除による生細胞数の計測と, Live/Dead Cytotoxicity Kit (Molecular Probes)による生存率を検討した。ミトコンドリア膜脱分極: MitCapture apoptosis detection kit (BioVision)で生細胞を観察した。DNA断片化: アガロース電機泳動

による観察を行った。カスパーゼ活性: caspase-3/ CPP32 colorimetric assay (BioVision)で活性を計測した。

【結果および考察】SAS-H1細胞は10%牛胎児血清下にCAP18活性化ドメインペプチドhCAP18₁₀₉₋₁₃₅で処理したところ, ペプチド濃度および時間依存性に細胞生存率の減少がみられたが, HGF細胞ではペプチド処理による細胞生存率に影響を認めなかった。ミトコンドリア膜の脱分極とDNA断片化は, SAS-H1細胞のみに観察された。また, caspase-3活性を検討したところ, SAS-H1細胞では活性の上昇を認めなかった。以上の結果から, CAP18活性化ドメインペプチドは口腔扁平上皮癌細胞において抗腫瘍活性がみられ, そのアポトーシスシグナルはカスパーゼ非依存性であることが推測された。

6. ヒト歯肉線維芽細胞におけるPAR-1を介したIL-6産生とそのシグナル伝達

○田中 信久*, 森田 貴雄**, 根津 顕弘**, 谷村 明彦**, 東城 庸介**, 溝口 到*
(北海道医療大学・歯学部・*矯正歯科学・**歯科薬理学)

【目的】プロテアーゼ受容体(PAR)はトロンビンやトリプシンなどで活性化されるG蛋白質共役型受容体である。我々は昨年の本学会でヒト歯肉線維芽細胞(HGF)にPARのタイプ1(PAR-1)が主に存在していることを報告した。今回, HGFにおけるPAR-1の活性化がインターロイキン-6(IL-6)産生を引き起こすことを示すと共に, その産生機構について解析した。

【方法】IL-6産生量はELISA法により測定した。PARおよびIL-6のmRNA発現はRT-PCR法を使って調べた。細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)は細胞内にFura-2を取り込ま

せ, Ca²⁺画像解析システム(ARGUS-HiSCA)を用いてモニターした。

【結果】培養したHGFを10nMトロンビン(TB)で刺激したところ, IL-6のmRNA発現とIL-6産生が誘導された。PAR-1のアゴニストペプチドであるSFLLRNもmRNA発現とIL-6産生を刺激したが, その効果はTBに比べ小さかった。しかしアミノペプチダーゼ阻害薬であるアマスタチンを加えると, SFLLRNはTBに匹敵する効果を示した。Ca²⁺キレート薬(BAPTA-AM)を細胞内に取り込ませTBで刺激したところ, [Ca²⁺]_i上昇は完