

**<学会記録II>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(東日本歯学会第21回学術
大会一般講演抄録)**

著者名(日)	伊藤 昭文, 奥村 一彦, 広瀬 公治, 千葉 逸朗, 柴田 孝典
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	22
号	1
ページ	97
発行年	2003-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008796/

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