

〔学位論文〕

口腔領域由来上皮細胞におけるDrosomycin-like Defensinの発現解析

佐藤 惇

北海道医療大学大学院歯学研究科
生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野

Differential expression of Drosomycin-like Defensin in Human Oral Cells

Jun SATO

Division of Clinical Oral Pathology, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

緒 言

Drosomycin-like Defensin (以下DLD) は、ショウジョウバエの抗菌ペプチドであるDrosomycinと高い相同性をもつ抗菌ペプチドとして、近年ヒトでの発現が確認された。

DLDは、真菌に対して強い抗菌効果をもつと言われているが、口腔領域での発現については不明である。本研究では、表皮角化細胞および口腔領域由来細胞におけるDLD発現の有無とその調節機構、エピジェネティックな修飾による発現変化の有無について検討した。

材料および方法

DLDの発現の有無については、RT-PCR法により検討した。細胞は、正常口腔粘膜上皮由来細胞 (NOK)、正常ヒト表皮角化細胞、ヒト表皮角化細胞株、口腔扁平上皮癌由来細胞株 (Ca 9-22, SAS, BSC-OF, SCC 9, OSC-19, HSC-2, -3, -4, KB)、ヒト耳下腺導管由来細胞株 (HSY) 及び正常ヒト歯肉線維芽細胞を用いた。NOKについては智歯の抜歯時においてFlap部より口腔粘膜上皮を採取し、outgrowth法により得た。各細胞の培養後RNAを採取し、定量的RT-PCRにてDLD mRNAの発現量を観察した。

またIn situハイブリダイゼーションによるDLD mRNAの局在についての検討も行った。DLDの目的遺伝子にジギキゲンラベリングしたプローブを作成し、智歯抜歯時に得られた口腔粘膜組織切片上にてDLD mRNA

とハイブリダイズさせ、DLDの局在を観察した。

DLDの発現調節機構の検討については、細菌および真菌感染のモデルとしてTLR-2, -4, のアゴニスト (HKML, LPS) 及びDectin-1のアゴニスト (β -glucan), また炎症モデルとして炎症性サイトカインであるIL-8, IL-1 β , TNF- α をそれぞれ細胞培養液に添加し、DLDの発現変化をRT-PCR法にて検討した。

一部の口腔がん細胞においてDLDの発現低下がみられたことから、DNA高メチレーションおよびヒストン脱アセチル化などのエピジェネティックな修飾によるDLD発現変化の可能性を検討した。DNAメチル化阻害剤である5-aza-2'-deoxycytidine, およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるTrichostatin Aを細胞培養液へ添加し、DLDの発現変化をRT-PCR法にて検討した。

結果および考察

1. 本研究で用いたすべての細胞でDLD mRNAの発現が確認された。NOKと比較したDLDのmRNA発現レベルは、Ca 9-22およびHSYでは有意に発現レベルが高く、BSC-OFおよびOSC-19では有意に発現レベルが低くなっていた。その他の細胞においては有意差はみられなかった。またIn situハイブリダイゼーションによる検討では、DLD mRNAの発現が、口腔粘膜上皮全層にわたって確認された。これらの結果より正常な口腔粘膜では、皮膚と同等のDLDによる感染防御機構がはたっていることが示唆された。

2. 受容体アゴニストおよび炎症性サイトカインの添

受付：平成23年3月30日

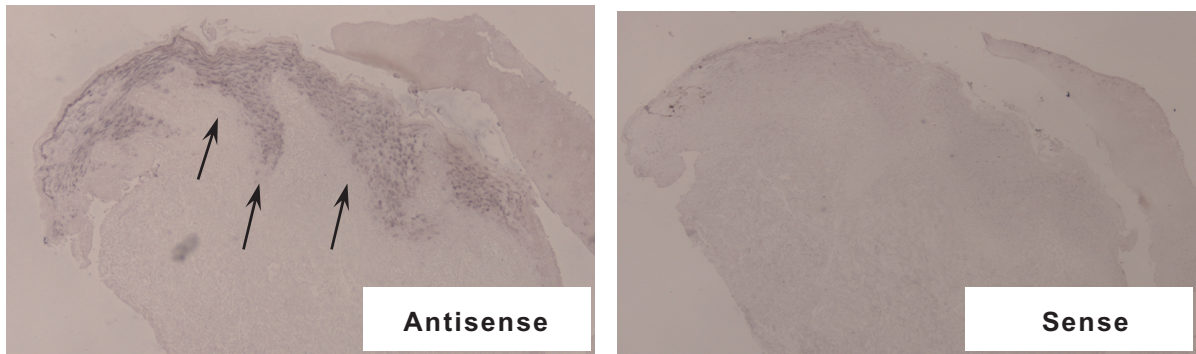


図1

In Situハイブリダイゼーションによる口腔粘膜におけるDLD局在の観察
Antisenseにおいて、口腔粘膜組織の上皮全層にわたってDLDの発現が認められた（矢印）
コントロールであるSenseでは検出されなかった

加では、どの細胞においても有意なDLD mRNAの発現変化はみられなかった。この結果より、DLDは感染や炎症によって発現が変化せず、恒常的に発現していることが示唆された。

3. 脱メチレーションおよびヒストン脱アセチル化阻害では、どちらにおいても口腔がん細胞のDLD mRNAの発現変化はみられなかった。この結果より、口腔がん細胞におけるDLDの発現変化は、エピジェネティックな修飾によるものでないことが示唆された。

結 論

以上のことから、DLDは抗菌ペプチドとして皮膚と同様に口腔上皮細胞に広く恒常的に発現しており、口腔内の自然免疫機構において重要な役割を担っていることが明らかとなった。



佐藤 惇

北海道医療大学大学院歯学研究科 生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野

略歴

平成18年3月 北海道医療大学歯学部卒業

平成19年4月 北海道医療大学大学院歯学研究科入学

平成23年3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程修了・学位取得