

## 〔学位論文〕

## ストレス関連内分泌介在物質がβディフェンシン 発現変化に及ぼす影響に関する研究

高藤美帆子

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野

### Effect of corticosteroid and noradrenaline on beta-defensins expression stimulated with Toll-like receptors agonists

Mihoko TAKAFUJI

Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

#### 緒 言

歯科治療をストレスと感じる患者は多い。特に、心身が未熟で様々な経験が少ない小児や拒否反応の強い障害者（児）は、成人と比べストレスの対処法が少なく、むしろ成人よりもストレスの耐性は低い。情動ストレスにより、免疫機能の低下することは広く知られ、その機序についての研究も行われてきているが、病原微生物に曝される口腔粘膜の免疫システム、特に自然免疫への影響については不明である。

本研究では、ストレス関連内分泌介在物質であるデキサメタゾン（以下、Dex）およびノルアドレナリンが口腔粘膜上皮の自然免疫機構、特に微生物認識機構及び抗菌ペプチドであるヒトβディフェンシン（以下、hBD）の発現に与える影響とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

#### 対象および方法

##### 1, hBDの発現変化の解析

ケラチノサイトであるNeo-Human-Epidermal-keratinocyte（以下、NHEK）を使用し、培養液は全てhydrocortisone無添加の1.8mM Ca<sup>2+</sup>含有KGMに血清代用のUltrosor Gを添加したものをを用い、CO<sub>2</sub> 5%, 37.0℃で培養した。ストレス関連内分泌介在物質として、0.1, 1, 10μMのDexおよび10μMのノルアドレナリンを用いて、1.8mM Ca<sup>2+</sup>含有KGMに添加し、培養時間は全て24時間で行った。TLR agonistには、TLR 2 agonist(HKLM) 10<sup>8</sup>cells/mlおよびTLR 4 agonist (LPS) 100ng/mlを使用し

た。1.8mM Ca<sup>2+</sup>含有KGMに各TLR agonistを添加し4, 8, 12, 24および48時間培養した。各濃度のDexおよびノルアドレナリンを添加した1.8mM Ca<sup>2+</sup>含有KGMに、TLR agonistをさらに添加して24時間培養した。対象には、1.8mM Ca<sup>2+</sup>含有KGMのみで24時間培養したものをを用いた。

ケラチノサイトからtotal RNAを抽出し、RT-PCR法とTaqManプローブを用いたReal-time RT-PCR法によりhBD-1, -2および-3 mRNA発現を観察した。さらに、抽出タンパク質にてELISA法を行った。

##### 2, 細胞内情報伝達経路の解析

細胞内情報伝達経路を明らかにするために、ERKインヒビター（PD098059）およびPKAインヒビター（P9115）をそれぞれNHEKに添加し1時間後、Dexおよびノルアドレナリンの存在下および非存在下で、24時間培養した。コントロールには試薬無添加のNHEKを用いた。mRNAの発現変化の解析と同様の方法によって、hBD-1, -2および-3 mRNA発現を観察した。

#### 結果および考察

TLR 2およびTLR 4による刺激で、ケラチノサイトのhBD-1とhBD-2のmRNA発現上昇が確認され、ペプチドレベルではhBD-2の発現上昇が確認されたが、hBD-1では変化がみられず、hBD-3はmRNA、ペプチドレベルいずれにおいても発現に変化はみられなかった。上皮性抗菌ペプチドのひとつであるhBDの発現の特徴は、一般的に、hBD-1は恒常的に発現するが、hBD-2とhBD-3は炎症性サイトカインや細菌、ウイルスなどに

よって発現が誘導されると言われている。TLRsは微生物の認識機構の一つであり、特にTLR 2やTLR 4は細菌感染により活性化され、これを介してhBD-2とhBD-3の発現上昇のあることも報告されている。hBD-1はmRNAレベルでは上昇がみられたものの、ペプチドレベルでは上昇が確認されなかった。このことからhBD-1も様々な刺激によって発現が上昇するもののその量はペプチドとして同定しえる程度ではないものと考えられた。また、hBD-3がこれまでの報告のような発現の上昇がみられなかったことは、これまでの報告とは異なり表皮由来のケラチノサイトを用いており、培養細胞の違いが異なった結果となった一つの理由と考えられた。

DexによりhBD-2の発現上昇がみられた。また、MAPK/ERKインヒビターによりDex添加時にhBD-1、-2および-3の全てにおいて発現抑制が認められ、MAPK/ERKの経路に関与していることが示唆された。

TLR 2 agonistおよびTLR 4 agonistによってNHEKのhBD-1とhBD-2の発現が上昇したので、この実験系にさらにDexを添加した際の、hBD-1、hBD-2およびhBD-3のmRNA発現変化について観察した。hBD-1とhBD-2ではTLR 4による発現上昇がDexによりいずれも抑制されていた。hBD-3ではTLR 2刺激でDexにより抑制傾向が示された。TLR 2およびTLR 4のagonistは主に細菌感染を想定したagonistであるため、細菌感染により発現の上昇したhBDがDexにより発現が抑制されると考えられた。hBDは抗菌ペプチドとして自然免疫に関与するのみならず、獲得免疫機構の作動にも関与することが明らかとなっている。副腎皮質ホルモンによる上皮、粘膜の炎症の抑制の少なくとも一部にhBDを介した抑制経路の存在することが示唆された。

ノルアドレナリンの添加によりhBD-1のmRNA発現増加が確認され、hBD-2およびhBD-3のmRNA発現では減少がみとめられた。ヒトケラチノサイトはそれ自身がカテコールアミンを合成する能力があり、特に基底細胞層に多く含まれていると言われている。ノルアドレナリンはケラチノサイトのβ2アドレナリン受容体を刺激すると細胞内のカルシウム濃度が上昇し、ケラチノサイ

トは分化することがわかっている。hBDの発現調節機構の一つにケラチノサイトの分化があるが、hBD-1については少なくともノルアドレナリンによるケラチノサイトの分化の影響があるものと思われた。最近、精神的ストレスが皮膚から産生される上皮性抗菌ペプチドの産生を抑制するとの報告がなされた。ノルアドレナリンはストレス状態で血中濃度が上昇することから、本研究でのhBD-2およびhBD-3の発現抑制は、ストレス反応によるhBD抑制の結果と一致しているものと思われた。ノルアドレナリン添加時のhBD-1、hBD-2ではPKAインヒビターにより発現が抑制されたが、hBD-3の反応は不規則であり、これを明らかにするためにはさらなる研究が必要であるものと思われた。

hBD-2ではTLR 2およびTLR 4 agonistによる発現上昇がノルアドレナリンによりいずれも抑制されており、hBD-3ではTLR 4でノルアドレナリンにより発現抑制が示された。細菌感染により発現の上昇したhBDがノルアドレナリンにより発現が抑制され、TLR 2およびTLR 4 agonistとの共添加時でもノルアドレナリンによる発現変化の傾向が強くと現れたと考えられた。ストレス関連内分泌介在物質であるノルアドレナリンによる、上皮や粘膜の炎症の抑制の少なくとも一部にhBDを介した抑制経路の存在することが示唆された。

## 結 論

合成副腎皮質ホルモンであるDexにより、TLR 2 agonistの刺激下でhBD-3 mRNAの発現抑制がみられた。TLR 4 agonistで刺激されたhBD-1 mRNAおよびhBD-2 mRNAはDexの添加により発現抑制傾向が認められた。また、ストレス関連内分泌介在物質であるノルアドレナリンとTLR 2 agonistの共添加ではhBD-2のmRNA発現の減少がみられ、ノルアドレナリンとTLR 4 agonistの共添加でhBD-2およびhBD-3のmRNA発現の減少がみられた。以上より、Dexおよびノルアドレナリンは病原微生物による刺激がある際に、自然免疫を担うhBDの発現を抑制する傾向にあることが示唆された。



高藤美帆子

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野

平成15年3月 北海道医療大学歯学部卒業

平成15年4月 北海道医療大学病院臨床助手

平成20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