

〔学位論文〕

糖尿病関連分子によるヒトβディフェンシン発現の変化について

畠山 翔太

北海道医療大学歯学部口腔病理学分野

Shota HATAKEYAMA

緒 言

糖尿病患者は、歯科領域では歯周病が高率に発症すると言われている。しかしながら、糖尿病関連分子が局所にどのように作用して易感染状態になるかについては未だ不明な点が多い。口腔粘膜の感染防御機構に抗菌ペプチドであるヒトβディフェンシン (hBD) がある。本研究では、グルコース、インスリン、アディポネクチンが口腔粘膜上皮におけるhBDの発現に及ぼす影響についてヒト重層扁平上皮由来角化細胞株を用いてhBD-1, hBD-2およびhBD-3の発現変化を検証し、hBDの発現変化における細胞内情報伝達経路についても検証した。

材料および方法

ヒト重層扁平上皮角化細胞株HaCaTを10%FBS, 2%ペニシリンストレプトマイシンを含んだDMEMにてグルコース, インスリン, アディポネクチンの添加後, 37°C, 5%CO₂で24時間培養を行なった。グルコース濃度は10, 15, 50mMに, インスリン濃度は, 100, 150, 200nMに, アディポネクチン濃度は, 3, 10, 30μg/mlになるように調整した。DMEM (5.5mMグルコース含有)で無添加の条件をコントロールとした。また, hBD-1, hBD-2およびhBD-3 mRNA発現が有意に上昇した条件下で, 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) インヒビター, 細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK 1/2) インヒビター, NF-κB インヒビターを添加した群と, インヒビターを添加しない群をコントロール群として, 比較検討した。これらの実験系によるhBD-1, hBD-2, hBD-3 mRNAの発現変化を, RT-PCR法と定量的リアルタイムRT-PCR法にて発現量を測定した。本研究では, すべてにおいて5回ずつ実験を行い, マンホイットニーのU検定を用いて, 有意水準を

0.05未満として検定した。

結 果

インスリン添加時, hBD-1はいずれの濃度でも有意な発現変化は認められなかった。インスリン濃度150, 200nM時にhBD-2の発現が有意に上昇し, 150nMの条件時にhBD-3の有意な発現上昇が認められた ($p < 0.05$)。グルコース添加時のhBDmRNA発現は, いずれの濃度でも有意な発現変化はみられなかった。アディポネクチン添加時, アディポネクチン 3 μg/ml添加で, hBD-1およびhBD-2 mRNAの有意な発現上昇が認められた ($p < 0.05$)。hBDmRNA発現上昇条件下でのインヒビター添加による細胞内伝達経路については, インスリンによるhBD-2の発現上昇は, NF-κBインヒビターの添加によって抑制された。インスリン150nM添加によるhBD-3の発現上昇は, ERKインヒビターによって抑制された。アディポネクチン添加によるhBD-1発現上昇はいずれのインヒビターによっても抑制されなかった。hBD-2の発現上昇は, NF-κBインヒビターにより抑制された。インスリン, グルコースおよびアディポネクチンの同時添加によるhBDmRNA発現については, hBD-1はどの条件下でも有意な発現変化はみられなかった。hBD-2は, グルコース濃度10mMで, インスリン濃度に関わらず, アディポネクチン 3, 10μg/ml添加条件で有意な発現上昇がみられ, グルコース濃度15mMであってもアディポネクチン 3 μg/mlでは有意な発現上昇が認められた ($p < 0.05$)。hBD-3の発現は, グルコース濃度10mMでインスリン100, 150nMとアディポネクチン 3 μg/ml添加した条件で有意な発現上昇がみられた。

考 察

インスリン添加によるhBDmRNA発現は, これまでの

報告でヒト腎細胞でのhBD-1の濃度依存的な上昇がみとめられた¹⁾が、本研究では、hBD-1 mRNA発現変化はなく、hBD-2、hBD-3 mRNA発現の上昇が見られた。これは、ケラチンの分子量の違いで扁平上皮の方の分化傾向が高いことや細胞の分化傾向の違いも関与しているものと思われた。グルコース添加群でのhBDmRNA発現は、有意な発現変化はないが、ヒト腎細胞を、グルコース濃度25mMで4日間培養すると、hBD-1発現が有意に上昇した報告²⁾があった。その違いは、添加培養期間の違いと細胞が異なっていたことが考えられた。アディポネクチン添加群でのhBDmRNA発現について、これまでの報告では、アディポネクチンによるhBD発現誘導に関する報告はみられないが、内臓脂肪細胞から分泌されるレプチンに関しては、角化上皮細胞でhBD-2発現が増強されるとの報告³⁾がある。本研究でのアディポネクチンによるhBD-2の発現上昇は、この報告と矛盾しないと考えられた。アディポネクチンによるhBDの発現上昇が、濃度が3µg/mlではみられが、10、30µg/mlでは認められなかった理由として、アディポネクチン濃度10µg/mlを越えると細胞の分化抑制に働くとの報告⁴⁾や、角化上皮細胞の分化にともなってhBDの発現が上昇する⁵⁾ことから、高濃度では分化抑制によるhBDの発現抑制があったものと考えられた。インヒビター添加によるhBDmRNA発現変化の細胞内伝達経路については、通常の細菌感染でみられるLPSによるhBD-2の経路と同様であるものと思われた。また、アディポネクチンによるhBD-3発現上昇は、ERKインヒビターでのみ抑制効果がみられたためERK伝達経路を介した発現であると思われた。hBD-3の発現上昇に関する報告には、多様な経路を介した発現上昇が報告されており、どの経路においてもERKが介在しているため、これまでの報告と同様にERKを介したものと思われた。インスリンとグルコース、アディポネクチンの同時添加によるhBDmRNA発現は、グルコース濃度が10mMと15mMでは、インスリンとアディポネクチンの同時添加の一部で、hBD-2が、また、hBD-3では、グルコース濃度が10mMの条件で同時添加による発現上昇が認められた一方で、50mMとグルコース濃度が高い条件では、hBD-2、hBD-3共に発現上昇はみられなかったことから、血糖値の高い状態にある糖尿病では、インスリン、アディポネクチンによるhBDの発現誘導されないことが示唆された。

結 論

本研究では、糖尿病関連分子でも、hBD-2とhBD-3の発現上昇について、初めて明らかにすることができ

た。いずれもある特定濃度のみでの発現上昇がみられたことにより、生体内でのhBD-2とhBD-3の発現にはインスリン、グルコース、アディポネクチンの至適濃度が関与しているものと思われた

文 献

- 1) Barnea M, Madar Z & Oren F. Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 367 : 452-456, 2008.
- 2) Malik AN & Al-Kafaji G. Glucose regulation of beta-defensin-1 mRNA in human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 353 : 318-323, 2007.
- 3) Kanda N & Watanabe S. Leptin enhances human beta-defensin-2 production in human keratinocytes. *Endocrinology* 149 : 5189-5198, 2008.
- 4) Kawai K, Kageyama A, Tsumano T, Nishimoto S, Fukuda K, Yokoyama S, Oguma T, Fujita K, Yoshimoto S & Yanai A. Effects of adiponectin on growth and differentiation of human keratinocytes-implication of impaired wound healing in diabetes. *Biochem biophys Res Commun* 374 : 269-273, 2008.
- 5) Abiko Y, Nishimura M & Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc* 36 : 247-252, 2003.