

〔学位論文〕

ヒト角化上皮細胞の分化誘導における物理的・化学的防御機構の変化

村井 雄司

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 differentiation enhances barrier function in human keratinocyte

Yuji MURAI

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

Key words : タイトジャンクション, 上皮細胞, 分化, 抗菌ペプチド

緒 言

口腔粘膜重層扁平上皮は、最下層にある基底膜と接する基底細胞層から順次体外に向かって、有棘細胞層、顆粒細胞層、そして錯角化層へと分化し生体内を保護している。小児において重層扁平上皮は薄く、成人と比較して角化が乏しく細胞間結合も疎であり、分化の途上にあると考えられている。細胞の分化を促すことにより、病原微生物や毒素等の侵入を防ぐ物理的防御機構とともに、抗菌ペプチドの発現上昇による化学的防御機構も充進することが予想される。活性型ビタミンD3 (VD3) は、角化上皮細胞の分化を促進するという報告はあるものの、タイトジャンクション等の細胞間結合装置や抗菌ペプチドの発現に関する詳細については不明である。

本研究では、VD3を角化上皮細胞に添加・培養し、物理的防御に関与するタイトジャンクションタンパクおよび化学的防御に関与する抗菌ペプチドの発現を観察することにより、VD3が口腔粘膜上皮の防御機構にどのように関与するか検討することを目的とした。

方 法

1. ヒト正常口腔粘膜上皮におけるタイトジャンクションタンパクの発現の観察

第三大臼歯の抜歯が必要とされ、歯肉切除の適応となった患者より、同意を得たうえで歯肉片の採取を行った。採取した歯肉は4%パラホルムアルデヒドにて固定

後、脱水し、パラフィン包埋した。薄切後、通法により脱パラフィン処理を行った。その後ブロッッキング処理し、一次抗体の抗Claudin (CLDN) - 1抗体、および抗CLDN - 4抗体を反応させた。二次抗体を反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察、撮影を行った。また、採取したヒト正常口腔粘膜上皮の状態を確認するため、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

2. 培養ヒト角化上皮細胞株におけるタイトジャンクションタンパクのmRNA発現量の定量的評価

VD3を添加した際の培養ヒト角化上皮細胞株におけるタイトジャンクションタンパクの発現変化を検証するために、タイトジャンクションタンパクの特異的プライマーを用いた定量的RT-PCR法にてmRNA発現を評価した。ヒト角化上皮細胞株 (HaCaT) を60~80%コンフレントになるまで37℃, 5% CO₂下にて培養後、VD3を1, 10, 100μM濃度でそれぞれ添加し、4, 8, 24, 48, 72時間培養を行った。controlにはVD3の溶媒であるDimethyl sulfoxideを用いた。培養後Total RNAを抽出し、逆転写後、cDNAを作成した。その後、定量的RT-PCRにてCLDN-1, -4におけるmRNAの発現を観察した。

3. 培養ヒト角化上皮細胞株におけるタイトジャンクションタンパクの発現の観察

培養ヒト角化上皮細胞株のタイトジャンクションタンパク発現を免疫蛍光染色にて観察した。

Lab-Tek® II Chamber Slideを用いてHaCaTを100%コンフレントになるまで培養し、上記と同様の方法で培養を

受付：平成24年11月7日

行った。4%パラホルムアルデヒドで固定後、ブロッッキング処理を行い、一次抗体の抗CLDN-1抗体、抗CLDN-4抗体、および抗Occludin (OCDN) 抗体を反応させた。二次抗体を反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察、撮影した。

4. 培養ヒト角化上皮細胞株における経上皮電気抵抗の測定

タイトジャンクションによる機械的防御機構の機能評価として、経上皮電気抵抗 (TER) の測定を行った。

HaCaTをDMEMで100%コンフルエントになるまでセルカルチャーインサートにて培養した後、10 μ Mの濃度でVD3を添加し、24, 48, 72時間におけるTER値をMillicell[®] ERS-2で測定を行った。

5. タイトジャンクション発現減弱細胞における機能および発現の観察

タイトジャンクションタンパクの機械的防御機構への関与を確認するために、タイトジャンクションタンパク発現減弱細胞を作成した。

CLDN-1, -4 siRNAの作製は、siRNA target finderにてそれぞれのsiRNAをデザインし、インサートをpSi-lencer[™]4.1-CMV Expression Vectorに組み込んだ。大腸菌にトランスフォーメーション後、大腸菌をLB/amp寒天培地に播種し、14時間後、単一コロニーを採取し、通法に従いラージプレップを行い、siRNAを回収した。回収したCLDN-1とCLDN-4のsiRNAはリポフェクション法にてHaCaTに導入後、hygromycinB含有DMEMにて細胞のセレクションを行った。同様にcontrolとしてhygromycin negative controlをHaCaTに導入した。

作製したsiCLDN-1, siCLDN-4 HaCaTおよびcontrolからtotal RNAを抽出し、cDNAを作製した。作製したそれぞれのcDNAにCLDN-1, -4 特異的プライマーを使用しRT-PCR法により、CLDN-1, -4の発現確認を行った。その後0, 24, 48, 72時間におけるsiCLDN-1およびsiCLDN-4 HaCaTのTERを測定した。

6. 培養ヒト角化上皮細胞株における抗菌ペプチドのmRNA発現量の定量的評価

VD3を添加した際の培養ヒト角化上皮細胞株における抗菌ペプチドの発現状況を検証するために、プライマーを用いた定量的RT-PCR法にてmRNA発現を評価した。

前述と同様の方法で培養を行い、その後Total RNAを抽出し、逆転写後、cDNAを作成した。その後、定量的RT-PCRにて β -ディフェンシン (hBD) -1, -2, -3およびCathelicidin /LL37 (LL-37) におけるmRNAの発現を観察した。

結 果

1. ヒト正常口腔粘膜上皮における免疫染色において、CLDN-1は有棘層に、またCLDN-4は顆粒層にそれぞれ発現が認められた。

2. タイトジャンクションのmRNAの発現は、CLDN-4は8時間の10および100nMに有意な発現上昇が認められ、CLDN-1は添加後24時間で全ての濃度に有意な発現の減少が認められた。抗菌ペプチドのmRNAの発現は、hBD-2はVD3添加後24時間の10および100nM, LL-37は8, 24および48時間の全ての濃度で有意な発現上昇が認められた。

3. HaCaTにおける免疫蛍光染色では、controlに比べ、VD3添加によりタイトジャンクションタンパクであるCLDN-4の強発現、およびCLDN-1の発現の低下が認められた。

4. VD3添加時のTERを測定した結果、controlと比較して、24時間では全ての濃度において有意なTER値の増加を認めたが、48, 72時間ではTER値は減少した。

5. タイトジャンクション発現減弱細胞では、controlに比べ、48, 72時間においてsiCLDN-1 HaCaTは有意に高いTER値を示したものの、siCLDN-4 HaCaTでは48, 72時間で有意な減少が認められた。

6. 抗菌ペプチドのmRNAの発現は、hBD-2はVD3添加後24時間の10および100nM, LL-37は8, 24および48時間の全ての濃度で有意な発現上昇が認められた。

考 察

今回の研究から、ヒト正常口腔粘膜上皮においてCLDN-1は有棘層細胞膜に、またCLDN-4は顆粒層細胞膜にそれぞれ局在を認め、CLDN-1からCLDN-4へタンパク発現がスイッチしていることが確認された。HaCaTにおいてもVD3添加によりCLDN-1からCLDN-4へタンパクの発現が変化し、TER値の上昇もみられたため、物理的防御機構の向上が認められ、さらにVD3添加により抗菌ペプチドの発現も上昇し、化学的防御機構の亢進がみられたため、VD3添加によりHaCaTが分化誘導されることが明らかとなった。

結 論

VD3添加による角化上皮細胞の分化誘導は、生体における物理的および化学的防御機構において非常に有用であることが示唆された。



村井 雄司

平成18年 3 月 北海道医療大学歯学部 卒業
平成24年 3 月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了
平成24年 4 月 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
任期制助手