

# $\beta$ ディフェンシン遺伝子導入によるう蝕予防効果

齊藤 正人 [北海道医療大学歯学部/講師]

## 背景・目的

ヒト $\beta$ ディフェンシン(hBDs)は主に上皮で発現している抗菌性のタンパクであり、細菌の感染を抑制することが報告されている。 $\beta$ ディフェンシン遺伝子を唾液腺に導入し、唾液中に高濃度で分泌させることにより、う蝕の予防効果を期待できるとの仮説のもとに、動物実験を行なうことを目的としていたが、 $\beta$ ディフェンシンの口腔内での局在および発現、口腔内での炎症反応に対する $\beta$ ディフェンシンの発現程度についての報告がないため、小児歯肉におけるhBD-1、hBD-2 およびhBD-3 mRNAの発現および局在を確かめるとともに、hBD-1、hBD-2、hBD-3 mRNAの発現量を明らかにすることを目的とし、 $\beta$ ディフェンシン遺伝子導入の可否について検討した。

## 内容・方法

### 1) 実験材料

実験材料は、外科的処置で切除されたもので、肉眼的に炎症のない歯肉を使用した。

### 2) hBD-1、hBD-2、hBD-3 RNA プローブの作製

Total RNAは正常ヒト角化上皮細胞より抽出し、RT反応を行った。ベクターpT7T3-a18を用い、hBD-1、hBD-2、hBD-3それぞれを含むプラスミドを作製した。それぞれのプラスミドで、DIG標識アンチセンスhBD-1、hBD-2、hBD-3 RNAプローブ、およびDIG標識センスhBD-1、hBD-2、hBD-3 RNAプローブをそれぞれ作製した。

### 3) in situ hybridization

4%パラホルムアルデヒドPBS溶液で固定したサンプルは、パラフィン包埋し、切片を作製した。切片はDIG標識アンチセンスhBD-1、hBD-2およびhBD-3 RNAプローブにてハイブリダイゼーションした。

### 4) 定量的PCR法 (Real-time PCR)

hBD-1、hBD-2およびhBD-3 mRNAの定量的な発現状態を観察するために、LightCycler<sup>TM</sup> (Roche Molecular Biochemicals)によるRT-PCRを行った。また角化上皮細胞で産生しているKeratin 10を全てのサンプルで増幅、定量化しインターナルコントロールとして用いた。

## 結果・成果

### 1) hBD-1、hBD-2およびhBD-3 mRNAの局在

口腔粘膜を覆う重層扁平上皮は一般に、下層から基底細胞層、棘細胞層、顆粒細胞層そして角化層で構成されて

おり、下層から上層に向けて分化している。DIG標識アンチセンスhBD-1、hBD-2およびhBD-3 RNAプローブによるin situ hybridizationの結果、小児歯肉、重層扁平上皮ではhBD-1、hBD-2およびhBD-3 mRNAの全てにシグナルが認められた。また局在もほぼ同一で、棘細胞層の上層と顆粒層にシグナルがみられ、角化層や基底細胞層には認められなかった。またコントロールであるDIG標識センスhBD-1、hBD-2およびhBD-3 RNAプローブを用いたin situ hybridizationではシグナルは認められなかった。

### 2) hBD-1、hBD-2 およびhBD-3 mRNAの発現量

定量的PCR法では、全てのサンプルにおいてhBD-1、hBD-2およびhBD-3 mRNAの発現が認められた。hBD-1、hBD-2 およびhBD-3 mRNAそれぞれの発現量( $\mu$ l)をKeratin 10(K10)の発現量で割った値( $\mu$ l / K10 $\mu$ l)を平均しhBD-1、hBD-2 そしてhBD-3 mRNAの発現量を比較した。それぞれの平均値はhBD-1 mRNAで5.67 $\mu$ l / K10 $\mu$ l、hBD-2 mRNAは9.99 $\mu$ l / K10 $\mu$ lそしてhBD-3 mRNAは7.70 $\mu$ l / K10 $\mu$ lであったが、Kruskal-Wallis検定値は $p < 0.15$ で有意差は認められなかった。

さらに、それぞれの相関関係および炎症マーカーTNF- $\alpha$  mRNAとの相関関係を比較検討した結果、hBD-1とhBD-2、hBD-1とhBD-3およびhBD-2とhBD-3のmRNA発現量はそれぞれ強い相関関係を示し、また炎症マーカーTNF- $\alpha$  mRNAとhBD-1、hBD-2 およびhBD-3 mRNAにも強い相関関係がみられた。(Saitoh M, et. al, Archives of Oral Biology, 2004, in press)

$\beta$ ディフェンシン遺伝子導入を行った際の、細胞の変化を確認するため、hBD-1、hBD-2 およびhBD-3遺伝子を発現ベクターに組み込み、口腔癌細胞株KB 細胞に遺伝子導入し細胞の変化を観察した。hBD-1、hBD-2およびhBD-3強発現KB細胞は、コントロールと比較し細胞増殖能が有意に低下した。特にhBD-2 およびhBD-3強発現KB細胞では細胞増殖をコントロールする、Cyclin-dependent kinase inhibitor のp21/waf1とp27/kip1の発現増加が認められた。(Saitoh M, et. al, 82<sup>nd</sup> IADR, 2004. )

## 今後の展望

上記の結果から、hBDs遺伝子をヒト細胞内に導入した際、細胞増殖等に影響を与える可能性があるため、ラット唾液腺への遺伝子導入は行わず、hBDsの合成ペプチドを用いた細胞毒性試験を行った。その結果、細胞毒性を示さなかったため(Nishimura M, Abiko Y, Kurashige Y, Takeshima M, Yamazaki M, Kusano K, Saitoh M, et. al, Journal of Dermatological Science, 2004, in press)、今後この合成ペプチドを用いたう蝕予防の実験を行う予定である。