

β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β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。β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、β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β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、β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-al8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、LightCyclerTM(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つた。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つた。

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(μ l)をKeratin 10(K10)の発現量で割った値(μ l / K10 μ 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 μ l / K10 μ l、hBD-2 mRNAは9.99 μ l / K10 μ lそしてhBD-3 mRNAは7.70 μ l / K10 μ 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つた。

さらに、それぞれの相関関係および炎症マーカーTNF- α 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- α 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)

β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, 82nd 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つたため(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。