



研究成果報告書

抗菌ペプチドによる歯髄・象牙質複合体の再生

課題番号 18592089

平成18年度から平成19年度科学研究費補助金（基盤研究（C））

研究成果報告書

平成20年3月

研究代表者 柴 秀樹

広島大学病院講師



はしがき

修復象牙質を形成させ歯髄を保存するためには、感染細菌の除去と歯髄細胞の増殖と象牙芽細胞への分化を考慮する必要がある。さらに、炎症のコントロールも必要である。抗菌ペプチドであるLL37が歯髄・象牙質複合体の再生を促進し、覆髄剤として応用できるという仮説をたてた。この仮説を証明するために、本研究ではin vitroの系で以下のことを明らかにした。LL37はう蝕原因細菌に対して抗菌活性を示すばかりでなく (Ouhara et al., 2005)、ペプチドグリカンによる歯髄細胞の炎症性サイトカイン発現の促進を抑制し、migrationを促進することが明らかとなった。このようにLL37は歯髄・象牙質複合体の再生を促進し、覆髄剤として臨床応用の可能性が考えられた。

研究組織

研究代表者：柴 秀樹 （広島大学病院・講師）

研究分担者：小松澤 均 （鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授）

研究分担者：長谷川 直彦 （広島大学病院・助教）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,800,000	0	1,800,000
平成 19 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究発表

(1) 雑誌論文

(2) 学会発表

1. 抗菌ペプチド LL37 がヒト歯髄細胞の炎症性サイトカイン発現および migration に及ぼす影響

柴 秀樹, 加治屋幹人, 應原一久, 藤田 剛, 森本万有美, 武田克弘, 水野智仁, 河口浩之, 栗原英見

日本歯科保存学会秋季学術大会 (第 125 回)、鹿児島、2006.

2. Effect of LL37 on expressions of inflammatory cytokines and migration in human pulp cells, Mikihiro Kajiya, Hideki Shiba, Tsuyoshi Fujita, Mayumi Morimoto, Katsuhiro Takeda, Noriyoshi Mizuno, Hiroyuki Kawaguchi, Hidemi Kurihara

第 28 回日本歯内療法学会学術大会 (The 5th KAE-JEA Joint Meeting)、広島、2007.

(3) 図書

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

緒言

Cathelicidin ファミリーに属する 18 kDa cationic antimicrobial protein は抗菌ペプチドであり (Selsted et al., 1985; Ganz and Lehrer, 1995; Lehrer and Ganz, 1999)、抗菌活性部位は細胞内あるいは細胞外で切断された C 末端側の LL37 と呼ばれる部位にある (Ramanathan et al., 2002; Zaiou and Gallo, 2002)。一方、N 末端側は cathepsin L inhibitor である cathelin がコードされている (Zaiou et al., 2003)。LL37 は陽性に帯電しているシステインを持たないリニアー構造のペプチドで (図 1)、好中球、単球および舌、頬粘膜、歯肉の上皮細胞および唾液線の上皮細胞で検出されている (Frohm et al., 1997; Bals et al., 1999; Nilsson et al., 1999; Malm et al., 2000; Murakami et al., 2002; Dale et al., 2001; Ramanathan et al., 2002; Zaiou and Gallo, 2002; Abiko et al., 2003; Devine, 2003; Hosokawa et al., 2006)。LL37 の抗菌機序は、細菌の代謝系に作用する抗菌化学療法剤とは異なり、陽性に帯電しているペプチドと陰性に帯電している菌帯表層とが電氣的に引き合い、菌体が穿孔することによって細菌、真菌、ウイルスに対して抗菌活性を示す (Peschel, 2002)。

抗菌活性に加えて、LL37 はリポポリサッカライド (LPS) に結合し、LPS の中和作用を示す (Larrick et al., 1995; Scott et al., 2000)。また、LL37 は好中球、単球、T 細胞、上皮細胞などに対して走化活性を示すばかりでなく (Yang et al., 2000; Tokumaru et al., 2005)、単球のサイトカイン産生に関わる (Elssner et al., 2004)。

アトピー性皮膚炎では黄色ブドウ球菌などの細菌感染が高頻度で認められるが、この原因が interleukin (IL)-4 や IL-13 の過剰発現による LL37 や β -defensin-2 などの抗菌ペプチド産生量の減少によるものであると報告されて

いる (Ong et al., 2002)。また、Kostmann disease の病巣局所では LL37 や α -defensin などの抗菌ペプチドの産生が低下しており、その結果として細菌感染が起こりやすい (Putsep et al., 2002)。このように抗菌ペプチド LL37 の産生と疾患の病態は関連している。

歯髄炎に対して歯髄・象牙質の複合体を再生させるためには、細菌感染のコントロール、炎症の抑制および宿主細胞の活性化が必要である。抗菌活性、細胞走化活性など多機能を有する LL37 は歯髄・象牙質複合体の再生に有用な因子であると仮説した。私たちはこれまでに LL37 が種々のう蝕原因細菌と歯周病原性細菌に対して抗菌活性を示すことを明らかにしている (図 2) (Ouhara et al., 2005)。本研究では、LL37 が歯髄の炎症の抑制および歯髄細胞機能の活性化に関わるかを明らかにするために、培養ヒト歯髄細胞(HP cells)の炎症性サイトカイン発現および migration に及ぼす LL37 の影響を調べた。

材料と方法

1. LL37 の合成

使用した LL37 (CAP18 の C 末端の活性部位) のアミノ酸配列は LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPR である。ペプチド合成装置 PSSM-8(島津、東京) を用いて、LL37 を固相法で合成した。合成ペプチド LL37 をトリフルオロ酢酸 [TFA, 825 μ l (半井化学、京都)]、滅菌イオン交換水 (50 μ l)、thrombolisin (50 μ l、和光純薬、大阪)、Ethanedithiol [EDT 25 μ l (和光純薬)]、Ethyl Methanesulfonate [EMS, 30 μ l (半井化学)]、フェノール [20 μ l (和光純薬)] のカクテルによってレジン残基を切断後、100%ジエチルエーテル (和光純薬) で抗菌ペプチドを析出させ、99.5%エタノール (和光純薬) で洗浄後、凍結乾燥機 (夕

イテック、名古屋)によって乾燥した。凍結乾燥させた LL37 のペプチドを滅菌イオン交換水に溶解後、octadecyl 4PW カラム (東ソー、東京) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC、東ソー) で精製した。ペプチドの分離は 0.05% TFA を含む滅菌イオン交換水 100%から 0.05% TFA を含むアセトニトリル (和光純薬) 100%へ 60 min の linear gradient をかけ、1 ml/min の流速で行った。

2. MALDI-TOF/MS による質量解析

精製した LL37 の分子量は以下の方法で測定した。LL37 1 mg/ml を 2 μ l と、マトリックス [50% (v/v) アセトニトリル / aqueous 0.1% TFA solution] に溶解した dihydroxybenzoic acid (和光純薬) 飽和溶液 2 μ l をステンレスプレート (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) 上で混和後、乾燥させて分析に用いた。質量分析装置は time-of-flight mass spectrometer (MALDI TOF/MS, Biflex III, Bruker Daltonics) を使い、質量解析は 20,000V、positive ion mode で行った。その結果、精製した合成抗菌ペプチドは成熟型と一致した分子量の位置に一つのピークで検出された。以下の実験には、この合成 LL37 を用いた。

3. 歯髄細胞の培養

ヒト培養歯髄細胞を用いた研究の必要性および歯の使用目的を説明し、患者の同意を得た後に歯の提供を受けた。HP cells は、矯正治療のために便宜的に抜去された健全なヒト小白歯の歯髄から分離した。採取した小白歯から無菌的に取り出した歯髄を細切し、直径 60 mm の細胞培養用シャーレ (CORNING, NY) に貼付けた。培地は 10% 牛胎児血清 (FCS, Biological Industries, BeitHaemek, Israel), 100 units/ml のペニシリン (明治製菓、東京)、100 μ g/ml のストレプトマイシン (明治製菓)、1 μ g/ml のファンギゾン (GIBCO) を含む Dulbecco' s

Modified Eagle Medium (DMEM、日水製薬、東京) (培地 A) を用いた。組織培養は 37°C、5%CO₂ 気相条件で行った。歯髄組織片から遊出・増殖してきた HP cells がコンフルエントに達した時点で、0.05%トリプシンおよび 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む Dulbecco' s PBS (-) (日水、東京、日本) で細胞を分散した。トリプシンおよび EDTA を除くため、細胞を 120 × g で 10 分間遠心後ペレットを回収し、10 cm シャーレに 8×10⁵ 個の HP cells を播種し、再び培地 A を用いて培養した。以下の実験には 6 代継代 HP cells を用いた。

4. 細胞の生存

HP cells を培地 A に懸濁し、I 型コラーゲンがコートされた 96 well プレート (SUMILON、住友ベークライト、東京) に 5.0×10³ cells/ well の密度で播種した。HP cells を 10 日間培養後、100 units/ml のペニシリン、100 μg/ml のストレプトマイシン、1 μg/ml のファンギゾンを含む DMEM (培地 B：無血清培地) に交換し、LL37 (0.1 から 10 μg/ml) を添加し、さらに 24 時間培養した。培養終了の 4 時間前に 20 μl の Cell Titer 96® (Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit; Promega, WI) を添加した。培養終了後、490 nm における吸光度を測定することによって生細胞数を計測した。

5. HP cells の培養と RNA の抽出

培養系あたり 5×10⁴ 個の HP cells をタイプ I コラーゲンをコートした 6 穴プレート (SUMILON) に播種し、培地 A を用い 13 日間培養した。引き続き、培地 B で HP cells を 2 回洗浄した後、LL37 (10μg/ml) あるいは P2X₇ レセプターのアゴニストである Benzoylbenzoyl-ATP (BzATP: 100 μM) を含む培地 B で 30 分間

前処理した。さらに、*Staphylococcus aureus* 由来のペプチドグリカン (PGN: 10 µg/ml, SIGMA) で HP cells を刺激し、6 時間培養を続けた。培養終了後、PBS で HP cells を洗浄し、ISOGEN (ニッポンジーン、東京) を用いて総 RNA を抽出した。RNA 濃度は分光光度計 (260 nm、280 nm) で測定した。

6. Real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

精製した総 RNA 1 µg を用いて逆転写を行った (First strand cDNA synthesis kit, Roche, Indianapolis, IN)。得られた cDNA を 5 倍希釈して LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) と LightCycler 2.0 (Roche) を用いてリアルタイムでモニタリングし、mRNA 発現を解析した。反応は、95 °C で 10 分 (denature)、95 °C で 0 秒間、58 °C で 10 秒間、72 °C で 10 秒間の反応を 40 サイクル (PCR)、95 °C で 1 秒間、65 °C で 10 秒間、95 °C で 0 秒間 (melting)、40 °C で 1 分間 (cooling) にて行った。用いたプライマーの塩基配列を TABLE に示す。各炎症性サイトカイン (IL-6 および IL-8) および歯髄細胞の分化指標 (アルカリホスファターゼ (ALPase) およびオステオネクチン) の mRNA 発現は、housekeeping gene である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 発現に対する IL-6、IL-8、ALPase およびオステオネクチンの mRNA 発現の百分率で表した。

7. Reverse-transcriptase (RT)-PCR

P2X₇ レセプターの特異的プライマー (TABLE) を用いて、上述の逆転写によって得られた cDNA を増幅した。得られた PCR 産物を 1.5%アガロースゲル中で泳動した後、エチジウムブロマイドで染色、可視化した。

8. P2X₇レセプター発現

培養系あたり 1×10^4 個のHP cellsをcell matrix[®] type I-A (新田ゼラチン、大阪)をコートした35 mm Glass Base dish (IWAKI, 千葉)に播種し、培地Aを用い7日間培養した。7日後、PBS によって洗浄し、4% paraformaldehyde を含むPBSにて、室温、10 分間固定した。固定後、PBSにて洗浄し、0.2%カゼインと0.1% Triton X-100を含むTBS (ブロッキング液)を用いて、室温、10 分間ブロッキングした。引き続き、PBS によって洗浄し、ブロッキング液に抗P2X₇レセプター抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, 100 倍希釈) を含有した一次染色液を室温で45 分間、HP cellsに作用させた。一次染色液反応後、PBSによる5分間の洗浄を3 回繰り返した。二次染色液としては、secondary Alexa Flour[®]488 anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA: 1:200)を含有したブロッキング液を用い、室温、30 分間作用させ、その後PBS にて5 分間洗浄する操作を4 回繰り返した。confocal レーザー顕微鏡として、Zeiss LSM 510 laser Scanning confocal microscope (Zeiss Microimaging, Inc., Thornwood, NY) を用い、HP cells を観察した。アクチンフィラメントはAlexa Fluor[®] 594 phalloidin (1:250)を用いて染色した。

9. Migration assay (Transwell insert 法と Wound healing 法)

Transwell insert 法 (図3)

HP cells の migration は Boyden Chamber を用いた方法に準じた Transwell insert 法によって解析した。HP cells をメンブレンフィルターへ接着させるため Transwel[®] (直径: 24 mm、ポアサイズ: 8 μ m, corning, NY) の内側のメンブレンフィルターを 10 μ g/ml の cell matrix[®] type I-A (新田ゼラチン) で室温、

1時間コーティングした。PBSで3回洗浄した後、Transwellを10 µg/mlのLL37を含む培地Bが加えられている6穴プレート (corning) に静置した。1mlの培地Bに懸濁された 5.0×10^4 個のHP cellsをI型コラーゲンがコートされたTranswellに播種し、12時間培養した。培養終了後、Transwell内側のメンブレン上の細胞をスクレイパーを用いて剥ぎ取り、Transwell外側のメンブレン下部に存在する細胞をmigrated細胞とした。Transwellからメンブレンを取り出し、migrated細胞数を位相差顕微鏡を用いてカウントした。

Wound healing 法 (図4)

培養系あたり 5×10^4 個のHP cellsをタイプIコラーゲンをコートした6穴プレート (SUMILON) に播種し、培地Aを用い13日間培養した後、培地BでコンフルエントHP cellsを2回洗浄し、ピペットチップの先端によって、洗浄されたHP cellsの一部を培養プレートから剥ぎ取った。引き続き、HP cellsをLL37 (10 µg/ml)、BzATP (100 µM)、heparin binding-epidermal growth factor (HB-EGF、10 ng/ml)を含む培地Bで24時間培養した。位相差顕微鏡下で、任意の一定面積当たりの視野の細胞残存部位から細胞が剥ぎ取られた部分に遊出したHP cellsをmigrated HP cellsとした。MigrationはNIHイメージによって測定したmigrated HP cellsの面積の総和によって表した。また、LL37およびHB-EGFによるHP-cellsのmigrationに及ぼす各種阻害剤 (PD98059 (50 µM) : p44/42阻害薬、CALBIOCHEM、CA、SB203580 (10 µM) : p38阻害薬、CALBIOCHEM、SP600125 (10 µM)、JNK阻害薬、CALBIOCHEM、PDTC : 10 µM、NF-κB阻害薬、CALBIOCHEM、EGF receptor (EGFR) 中和抗体 (Ab) (10 µg/ml) : LAB VISION、CA、AG1478 (30 nM) : EGFRリン酸化阻害剤、CALBIOCHEM) の影響を調べた。

10. 統計処理

二群間の差の検定は Student *t*-test ($P < 0.05$, $P < 0.01$) によって行った。

結果

HP cells の生存に及ぼす LL37 の影響

図 5 に LL37 添加 24 時間後のコントロール群の生細胞数に対する LL37 添加群の生細胞数の百分率を示す。0.1 $\mu\text{g/ml}$ から 10 $\mu\text{g/ml}$ の LL37 は HP cells の生細胞数に影響を及ぼさなかった。

HP cells における P2X₇ レセプター発現

図 6 は HP cells における P2X₇ レセプター発現を示す。HP cells は P2X₇ レセプターの mRNA を発現していた。蛍光免疫染色から、HP cells において P2X₇ レセプタータンパク質分子の局在が観察された。

PGN 存在下における HP cells の IL-6 mRNA 及び IL-8 mRNA 発現に及ぼす LL37 の影響

1 あるいは 10 $\mu\text{g/ml}$ の LL37 単独では IL-6 mRNA 発現に影響を及ぼさなかった (図 7)。10 $\mu\text{g/ml}$ PGN の刺激によって IL-6 mRNA 発現量は増加したが、この増加を LL37 は濃度依存的に抑制した (図 7)。P2X₇ レセプターのアゴニストである BzATP (100 μM) も LL37 同様、PGN による IL-6 mRNA 発現の誘導を抑制した (図 7)。IL-6 発現同様、PGN による IL-8 mRNA 発現の促進を LL37 および BzATP は抑制した (図 8)。

PGN 存在下における HP cells の ALPase mRNA 及びオステオネクチン mRNA 発現に及ぼす LL37 の影響

10 $\mu\text{g/ml}$ の PGN によって ALPase mRNA 発現は影響を受けず、LL37(10 $\mu\text{g/ml}$)および BzATP (100 μM)も ALPase 発現には影響を及ぼさなかった(図 9)。また、PGN (10 $\mu\text{g/ml}$)、LL37(10 $\mu\text{g/ml}$)および BzATP (100 μM)の存在下において、HP cells のオステオネクチン mRNA 発現も変化しなかった (図 10)。

Migration に及ぼす LL37 の影響

Wound healing 法 および Transwell insert 法による HP cells の migration に及ぼす LL37 の結果を図 11 に示す。10 $\mu\text{g/ml}$ の LL37 は HP cells の migration を促進した。一方、BzATP (100 μM)は migration に影響を及ぼさなかった (図 11)。以後の migration の分析は Wound healing 法によって行った。

LL37 によって誘導される Migration に及ぼす各種阻害剤の影響

JNK 阻害薬である SP600125 (10 μM)は、LL37 によって誘導される HP cells の migration を抑制した(図 12)。一方、p44/42 阻害薬である PD98059 (50 μM)、p38 阻害薬である SB203580 (10 μM)、NF- κB 阻害薬である PDTC (10 μM)は LL37 によって誘導される HP cells の migration に影響を及ぼさなかった (図 12)。

Migration に及ぼす HB-EGF の影響

10 ng/ml の HB-EGF は HP cells の migration を促進した (図 13)。SP600125 (10 μM)は、HB-EGF によって誘導される HP cells の migration を抑制した (図 13)。

LL37 および HB-EGF によって誘導される Migration に及ぼす EGFR の関与

EGF receptor (EGFR) 中和抗体 (10 µg/ml) および AG1478 (EGFR リン酸化阻害剤) (30 nM) は、LL37 によって誘導される HP cells の migration を抑制した (図 14)。また、EGFR 中和抗体および AG1478 は HB-EGF による migration も抑制した (図 14)。

考察

LL37 の抗菌活性は知られているが、歯髄細胞の生存に及ぼす LL37 の影響は不明である。本研究において、LL37 は HP cells の細胞生存に影響を及ぼさなかった。抗菌活性を示す LL37 がヒト細胞に傷害を与えることなくヒト歯髄細胞の機能制御を行えることが示唆された。

P2X レセプターファミリーに属する P2X₇ レセプターは膜 2 回貫通型のタンパク構造を有するイオンチャンネル型 ATP 受容体である (Torres et al., 1999)。LL37 によるサイトカイン発現制御に関する報告は LL37 が P2X₇ レセプターを介してヒトの単球の IL-1β の産生を促進するという報告のみである (Elssner et al., 2004)。従って、本研究においても LL37 による歯髄細胞のサイトカイン発現制御への P2X₇ レセプターの関与を考えた。まず、HP cells が P2X₇ レセプターを発現していることを遺伝子およびタンパク質レベルで明らかにした。サイトカイン発現における LL37 の影響では、LL37 単独では HP-cells の IL-6 および IL-8 の mRNA 発現に影響を及ぼさなかったが、LL37 は PGN によって誘導される IL-6 および IL-8 の mRNA 発現の促進を抑制した。LL37 同様、P2X₇ レセプターアゴニストである BzATP が IL-6 および IL-8 の mRNA 発現を抑制

した。以上の結果から、HP cells において LL37 によるサイトカイン発現抑制作用は P2X₇ レセプターを介することが示唆された (図 15)。さらに、LL37 のサイトカイン発現に及ぼす影響は細胞の種類に依存して異なることが明らかとなった。

臓器非特異的の ALPase は、石灰化能を有する骨芽細胞や軟骨細胞の分化および石化化の指標として用いられている(Wlodarski et al., 1986; Kato et al., 1988)。ヒト歯髄組織の ALPase も臓器非特異的であり(Goseki et al., 1990)、象牙芽細胞および象牙芽細胞下層の細胞の ALPase は歯髄の未分化な細胞の ALPase と比べて高い(Nuki and Bonting, 1961; Yosiki and Kurahashi, 1971)。さらに、覆髄剤として ALPase を用いた時、ALPase は象牙基質の産生を促進する(Seltzer, 1959)。オステオネクチン (secreted protein, acidic and rich in cysteine, SPARC) は骨や象牙質の主要な非コラーゲン性タンパク質である(Termine et al., 1981a, 1981b)。オステオネクチンは象牙芽細胞に多く発現しているが、未分化な歯髄細胞では発現が認められない(Reichert et al., 1992; Bègue-Kirn et al., 1994; Takano-Yamamoto et al., 1994; Shiba et al., 1998)。以上のことから、ALPase とオステオネクチンは歯髄細胞の分化指標として用いられている (Shirakawa et al., 1994; Shiba et al., 1995, Shiba et al., 1998; Shiba et al., 2001; Shiba et al., 2003)。本研究において、HP cells の ALPase とオステオネクチン遺伝子発現に及ぼす LL37 の影響を調べたところ、LL37 は選択した歯髄細胞の分化指標に影響を及ぼさなかった。以上、LL37 は歯髄細胞から象牙芽細胞への分化には関与しない可能性が示唆された。

LL37 は好中球、単球、T細胞、上皮細胞などに対して走化活性を示す(Yang et al., 2000; Tokumaru et al., 2005)。この LL37 の走化作用は壁着性細胞であるヒト皮膚由来上皮細胞においては EGF レセプターの transactivation、浮遊性細

胞である好中球、単球、T細胞においては formyl peptide receptor-like 1 (FPR1)を介して生じる。本研究から、LL37によるHP cellsのmigrationにEGFレセプターのtransactivationとJNKの活性化が関与している可能性が示唆された(図16)。HP cellsや上皮細胞のような壁着性細胞のLL37によるmigrationにはEGF receptorのtransactivationが必要かもしれない。

組織の再生、修復には、細胞の移動、増殖、分化が必要である。本研究では、LL37はmigrationを促進したが、象牙芽細胞の分化指標であるALPaseやオステオネクチンなどの遺伝子発現には影響を及ぼさなかった。従って、LL37は細胞分化を促進するのではなく、再生の初期段階に細胞の再生部位への移動を促進し、組織再生に関わると推察される。

可逆性歯髄炎に対して修復象牙質形成を促進するためには、炎症の抑制、細菌感染のコントロールおよび宿主細胞の活性化が必要である。本研究の結果は、LL37が炎症抑制効果と歯髄細胞の活性化能を有することを示唆した。LL37はう蝕関連細菌に対して抗菌活性を有する(Ouhara et al., 2005)。このように、LL37は炎症の抑制、歯髄細胞の活性化および細菌感染のコントロールを担える可能性があることから、歯髄炎に有効な新しい治療薬に成り得ることが示唆された。

結論

LL37はう蝕原因細菌に対して抗菌活性を示すばかりでなく、PGNによる歯髄細胞の炎症性サイトカイン発現の促進を抑制し、migrationを促進する。LL37は抗菌活性、炎症性サイトカイン発現の抑制および歯髄細胞機能の活性化作用を有することから、歯髄・象牙質複合体の再生を担える因子である可能性が示唆された。

文献

Abiko Y, Nishimura M, Kaku T: Defensins in saliva and the salivary glands, *Med Electron Microsc*, 36: 247-252, 2003.

Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD et al.: Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide, *Infect Immun*, 67: 6084-6089, 1999.

Bègue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M et al.: Comparative analysis of TGF- β s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation, *Int J Dev Biol*, 38: 405-420, 1994.

Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S et al.: Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva., *J Periodontal Res*, 36: 285-294, 2001.

Devine DA: Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts, *Mol Immunol*, 40: 431-443, 2003.

Elsner A, Duncan M, Gavrilin M et al.: A novel P2X₇ receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 β processing and release, *J Immunol*, 172: 4987-4994, 2004.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G et al.: The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocyte during inflammatory

disorders, *J Biol Chem*, 272: 15258-15263, 1997.

Ganz T, Lehrer RI: Defensins. *Pharmacol Ther*, 66:191-205, 1995.

Goseki M, Oida S, Nifuji A et al.: Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp, *J Dent Res*, 69: 909-912, 1990.

Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H et al.: Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue, *Clin Exp Immunol*, 146: 218-225, 2006.

Kato Y, Iwamoto M, Koike T et al.: Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor b and serum factors, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 9552-9556, 1988.

Larrick JW, Hirata M, Balint RF et al.: Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein, *Infect Immun*, 63: 1291-1297, 1995.

Lehrer RI., Ganz, T: Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence, *Curr Opin Immunol*, 11: 23-27, 1999.

Malm J, Sorensen O, Persson T et al.: The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect Immun*, 68:

4297-4302, 2000.

Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA et al.: Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin, *J Invest Dermatol*, 119: 1090-1095, 2002.

Nilsson MF, Sandstedt B, Sorensen O et al.: The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6, *Infect Immun*, 67: 2561-2566, 1999.

Nuki K, Bonting SL: Quantitative histochemistry of the developing hamster tooth: Alkaline phosphatase and lactic dehydrogenase, *J Histochem Cytochem*, 9: 117-125, 1961.

Ong PY, Ohtake T, Brandt C et al: Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis, *N Engl J Med*, 347: 1151-1160, 2002.

Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S et al.: Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β -defensins and CAP18, produced by human gingival epithelial cells, *J Antimicro Chemot*, 55: 888-896, 2005.

Peschel, A: How do bacteria resist human antimicrobial peptides?, *Trends Microbiol*, 10: 179-186, 2002.

Putsep K., Carlsson G, Boman HG et al.: Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study, *Lancet*, 360: 1144-1149, 2002.

Ramanathan B, Davis EG, Ross CR et al.: Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity, *Microbes Infect*, 4: 361-372, 2002

Reichert T, Störkel S, Becker K et al.: The role of osteonectin in human tooth development: An immunohistological study, *Calcif Tissue Int*, 50: 468-472, 1992.

Scott MG, Vreugdenhil ACE, Buurman WA et al. Cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein, *J Immunol*, 164, 549-553, 2000.

Selsted ME, Harwig SS, Ganz T et al.: Primary structures of three human neutrophil defensins, *J Clin Invest*, 76: 1436-1439, 1985.

Seltzer S: Reparative dentinogenesis, *Oral Surg*, 12: 595-602, 1959.

Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M et al.: Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase and calcification in cultures of human pulp cells, *Dev Biol*, 170: 457-466, 1995.

Shiba H, Fujita T, Doi N et al.: Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture, *J Cell Physiol*, 174: 194-205, 1998.

Shiba H, Uchida Y, Kamihagi K et al.: Transforming growth factor β -1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin D-activated pulp cells, *J Dent Res* 80: 1653-1659, 2001.

Shiba H, Nakanishi K, Rashid F et al.: Proliferative ability and alkaline phosphatase activity with *in vivo* cellular aging in human pulp cells, *J Endodont*, 29: 9-11, 2003.

Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K et al.: Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells, *J Dent Res*, 73: 1509-1514, 1994.

Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y et al.: Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by *in situ* hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement, *J Histochem, Cytochem*, 42: 885-896, 1994.

Termine JD, Belcourt AB, Conn KM et al.: Mineral and collagen binding proteins of fetal calf bone, *J Biol Chem*, 256: 10403-10408, 1981a.

Terminé JD, Kleinman HK, Whitson SW et al.: Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen, *Cell*, 26: 99-105, 1981b.

Tokumaru S, Sayama K, Shirakawa Y et al., Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL37, *J Immunol*, 175: 4662-4668, 2005.

Torres GE, Egan TM, Voigt MM: Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners, *J Biol Chem*, 274: 6653-6659, 1999.

Wlodarski KH, Reddi AH: Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells, *Calcif Tissue Int*, 39: 382-385, 1986.

Yang BD, Chen Q, Schmidt AP et al.: LL37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells, *J Exp Med*, 192: 1069-1074, 2000.

Yoshiki S, Kurahashi Y: A light and electron microscopic study of alkaline phosphatase activity in the early stage of dentinogenesis in the young rat, *Archs Oral Biol*, 16: 1143-1154, 1971.

Zaiou M, Gallo RL: Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J*

Mol Med, 80: 549-61, 2002.

Zaiou M, Nizet V, Gallo RL: Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence, J Invest Dermatol, 120: 810-816, 2003.

TABLE

Oligonucleotide sequences of primers for Real-time PCR

GAPDH	Forward Primer	5'-AACGTGTCAGTGGTGGACCTG-3'
	Reverse Primer	5'-AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT-3'
ALPase	Forward Primer	5'-GCGGTGAACGAGAGAATG-3'
	Reverse Primer	5'-CGTAGTTCTGCTCGTGGAC-3'
SPARC	Forward Primer	5'-CTCAAGAACGTCCTGGTCA-3'
	Reverse Primer	5'-TGCCAGTGTACAGGGAAGAT-3'
IL-6	Forward Primer	5'-GGAGACTTGCCTGGTGAAAA-3'
	Reverse Primer	5'-GTCAGGGGTGGTTATTGCAT-3'
IL-8	Forward Primer	5'-AGTTTTGCCAAGGAGTGCTA-3'
	Reverse Primer	5'-AATTCTCAGCCCTCTTCAA-3'

Oligonucleotide sequences of primers for RT- PCR

P2X7	Forward Primer	5'-AGATCGTGGAGAATGGAGTG-3'
	Reverse Primer	5'-TTCTCGTGGTGTAGTTGTGG-3'

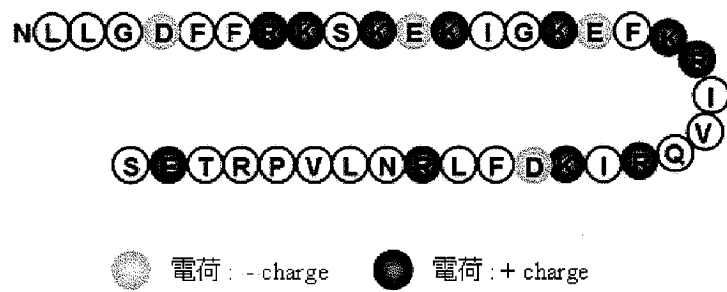


図 1. 抗菌ペプチドLL37のアミノ酸配列と構造

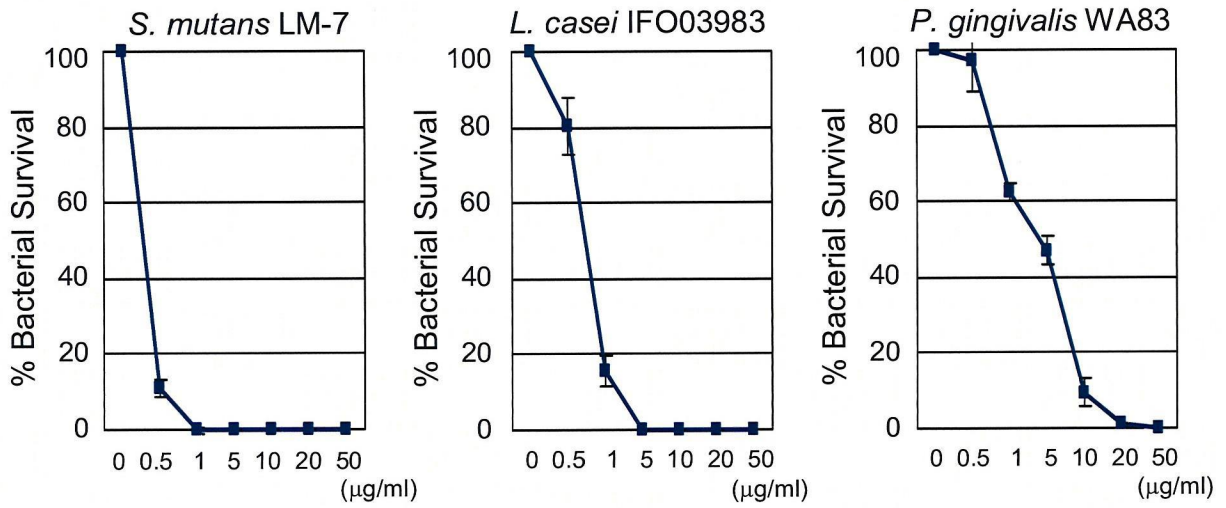


図2. う蝕関連細菌および歯周病原性細菌に対するLL37の抗菌活性 (Ouhara et al., 2005)

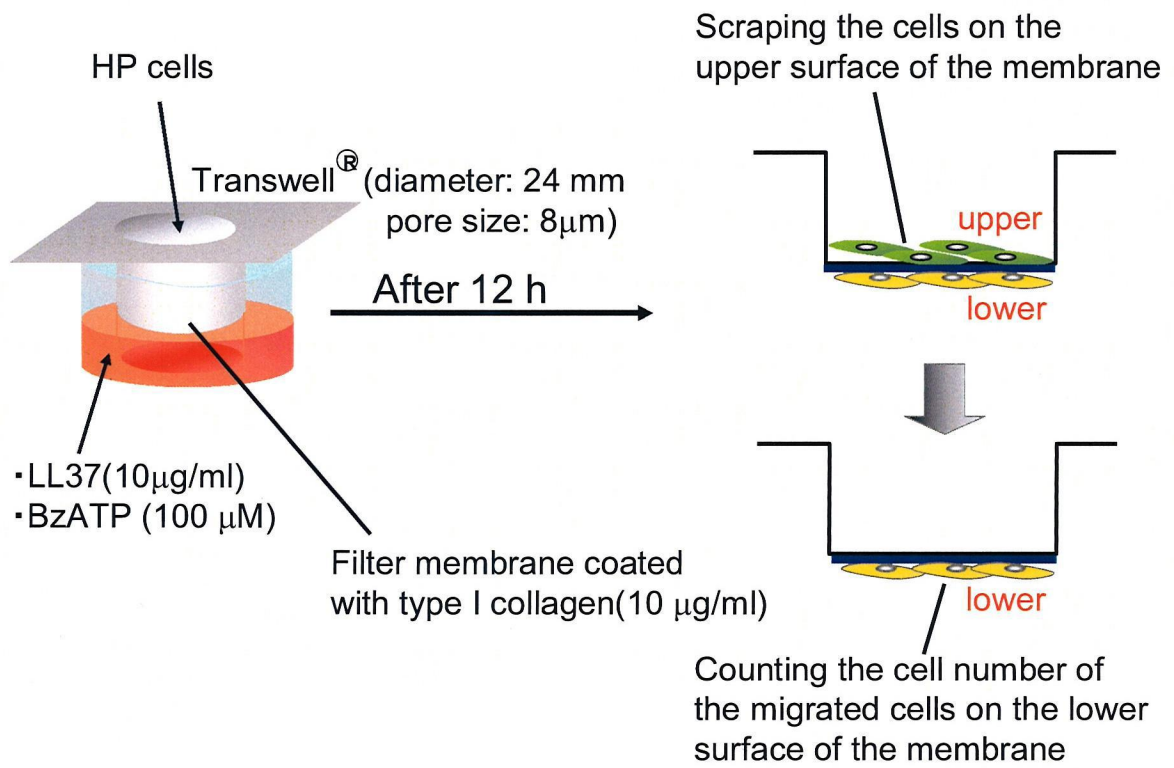


図 3. Transwell insert法の概略図

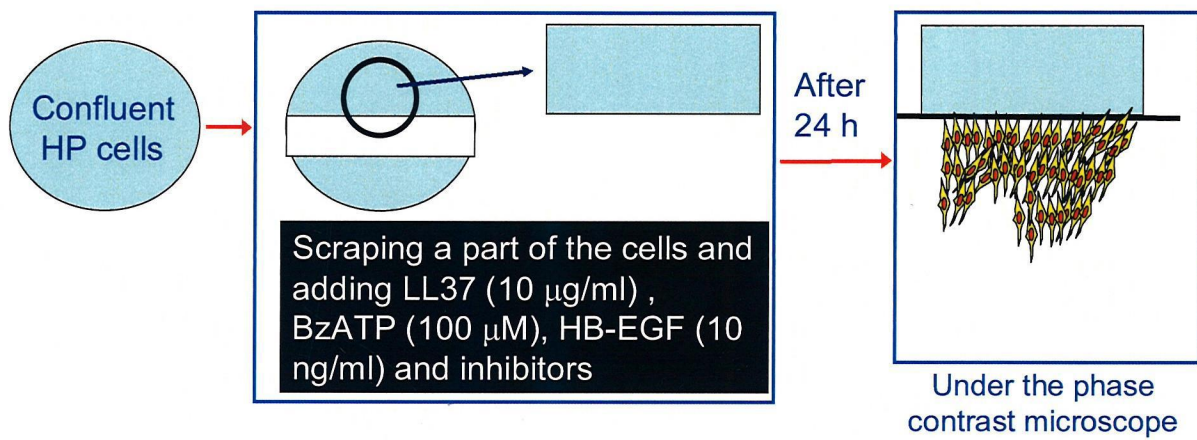


図4. Wound healing法の概略図

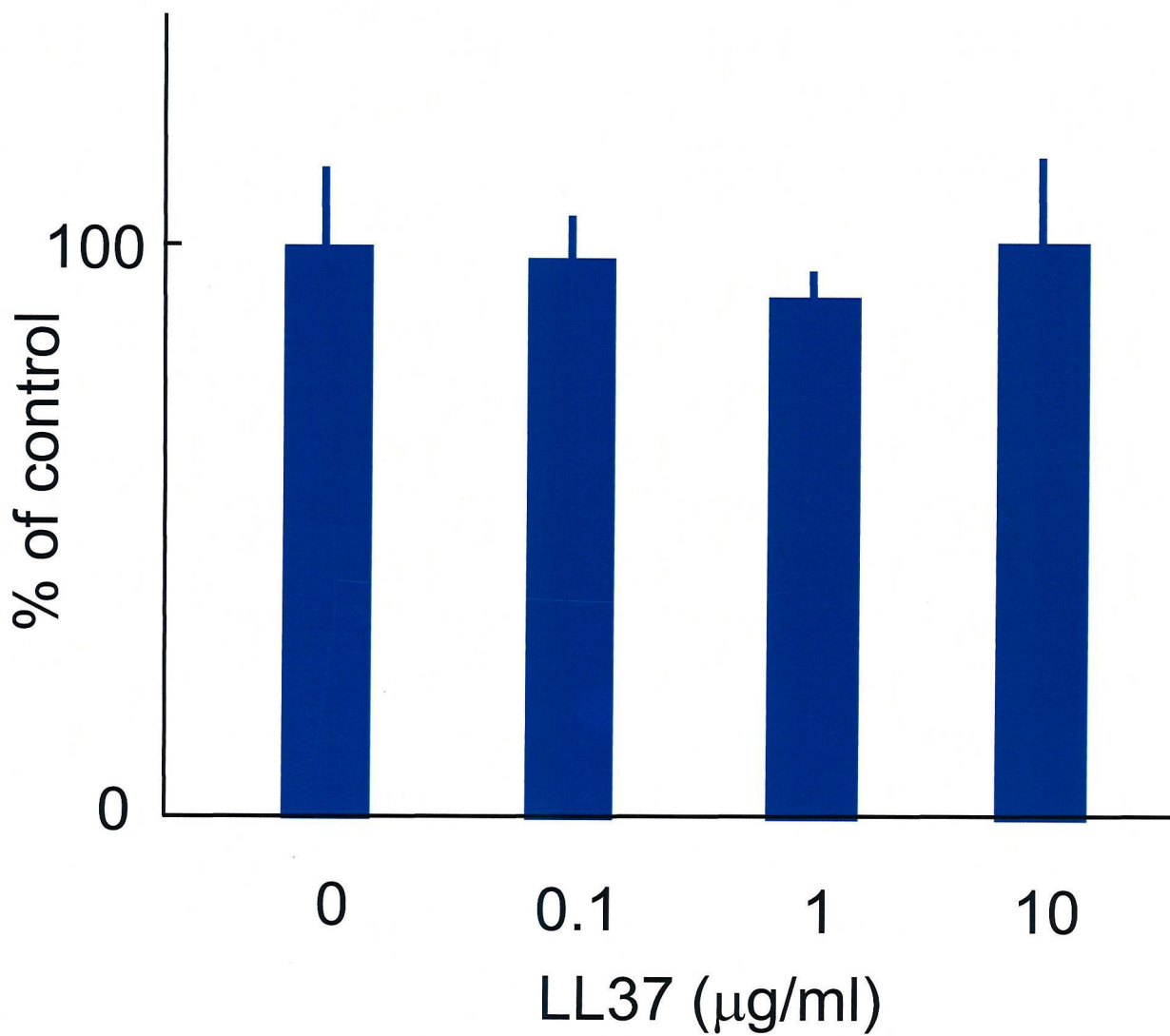


図5. HP cellsの生存に及ぼすLL37の影響
グラフはコントロール群の生細胞数に対するLL37添加群の生細胞数の割合を示す。各値は4つの培養系の平均値±SDを示す。

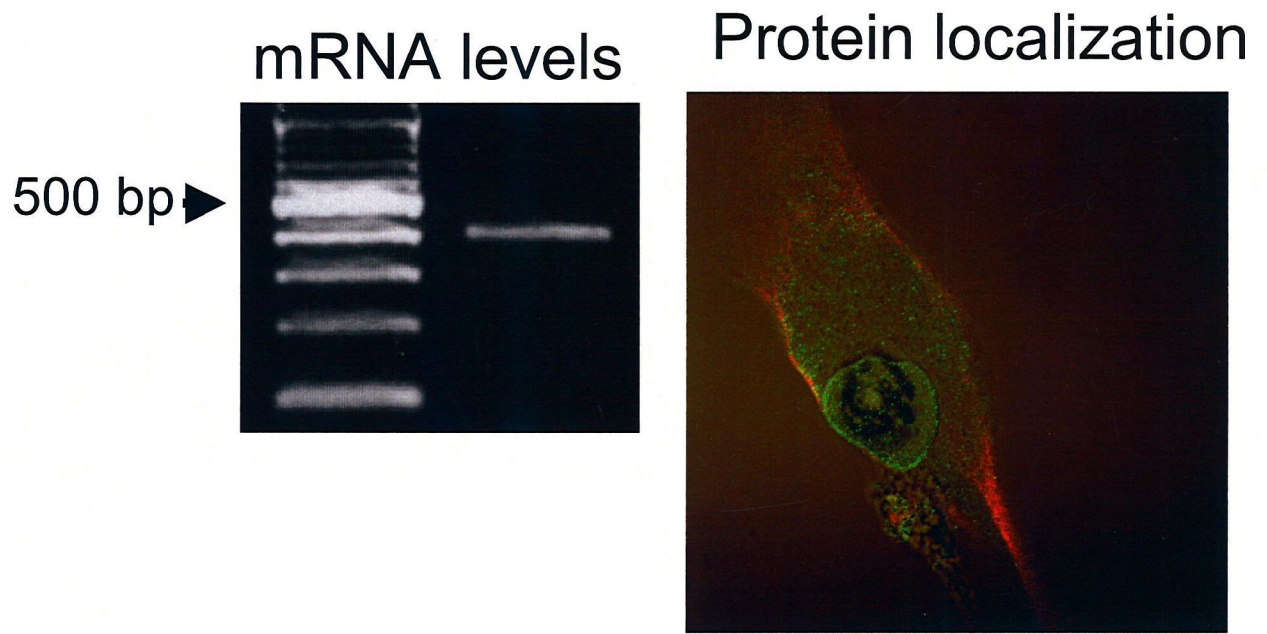


図6. HP cellsにおけるP2X₇ receptor発現

mRNA発現

PCR 産物サイズ : 399 bp

タンパク質局在

緑 : P2X₇ receptor、赤 : Actin

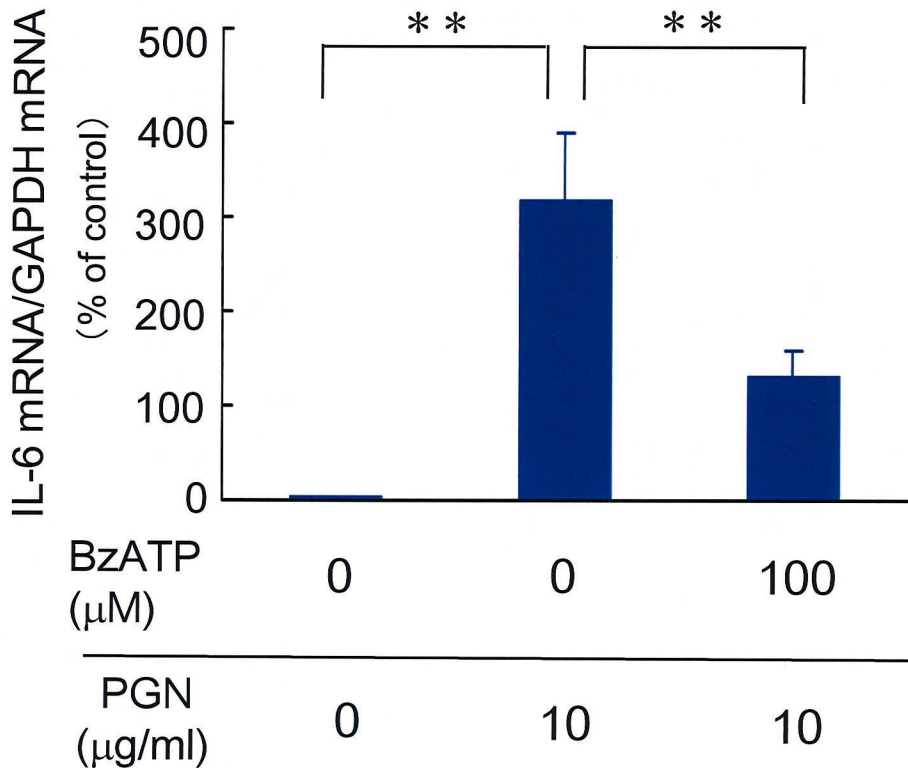
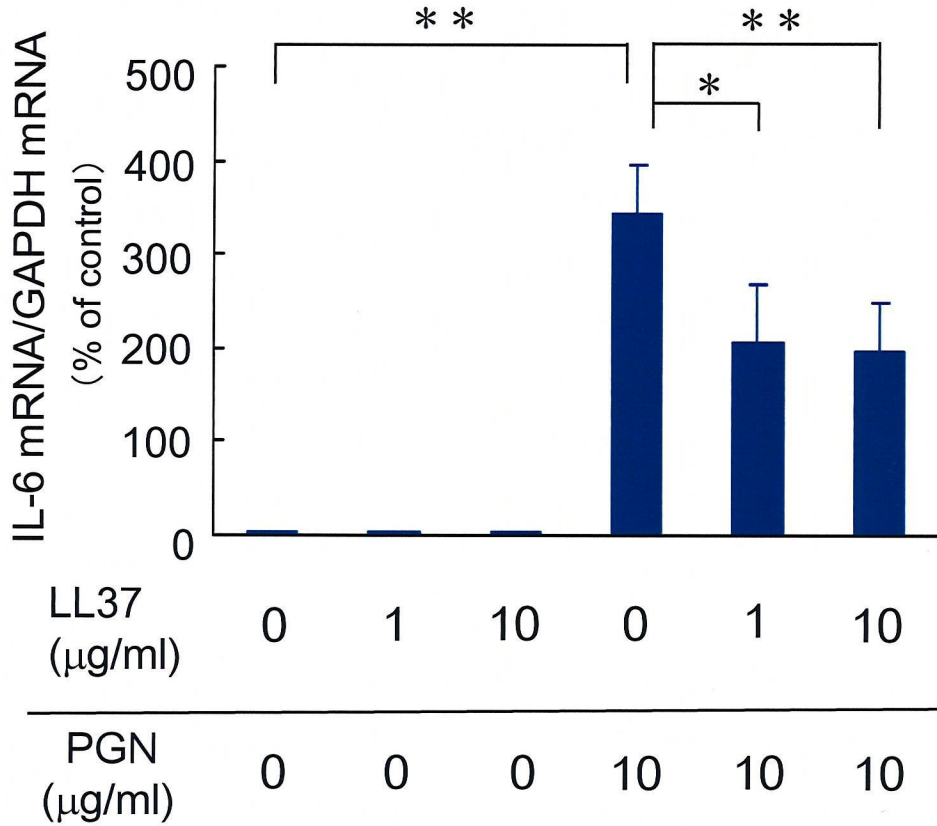


図7. PGN存在下におけるHP cellsのIL-6 mRNA発現に及ぼすLL37の影響

上段：LL37の影響、下段：BzATPの影響

各値は4つの培養系の平均値±SDを示す。

*P<0.05, **P<0.01

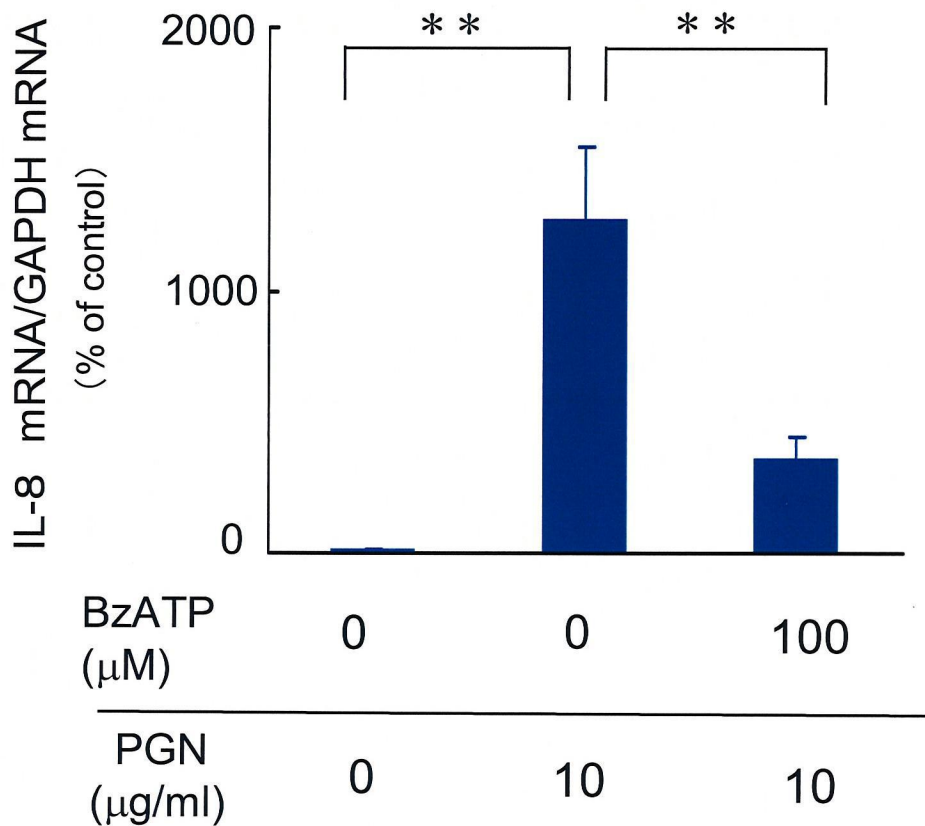
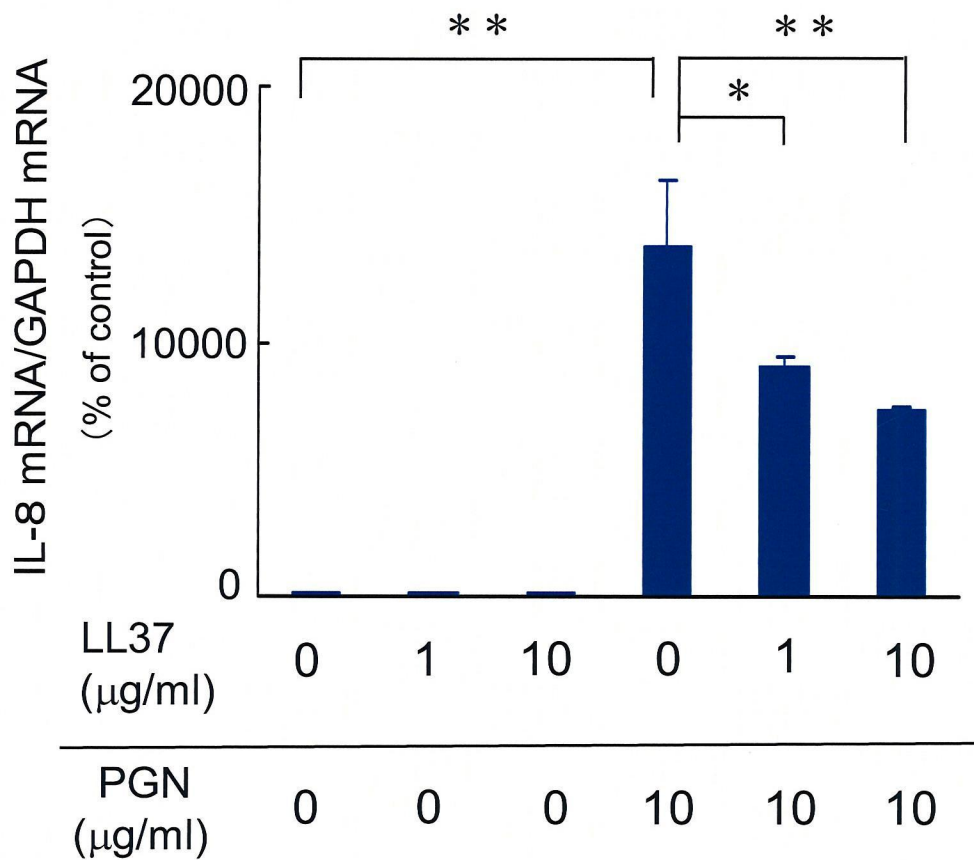


図8. PGN存在下におけるHP cellsのIL-8 mRNA発現に及ぼすLL37の影響

上段：LL37の影響、下段：BzATPの影響
 各値は4つの培養系の平均値±SDで示す。
 *P<0.05, **P<0.01

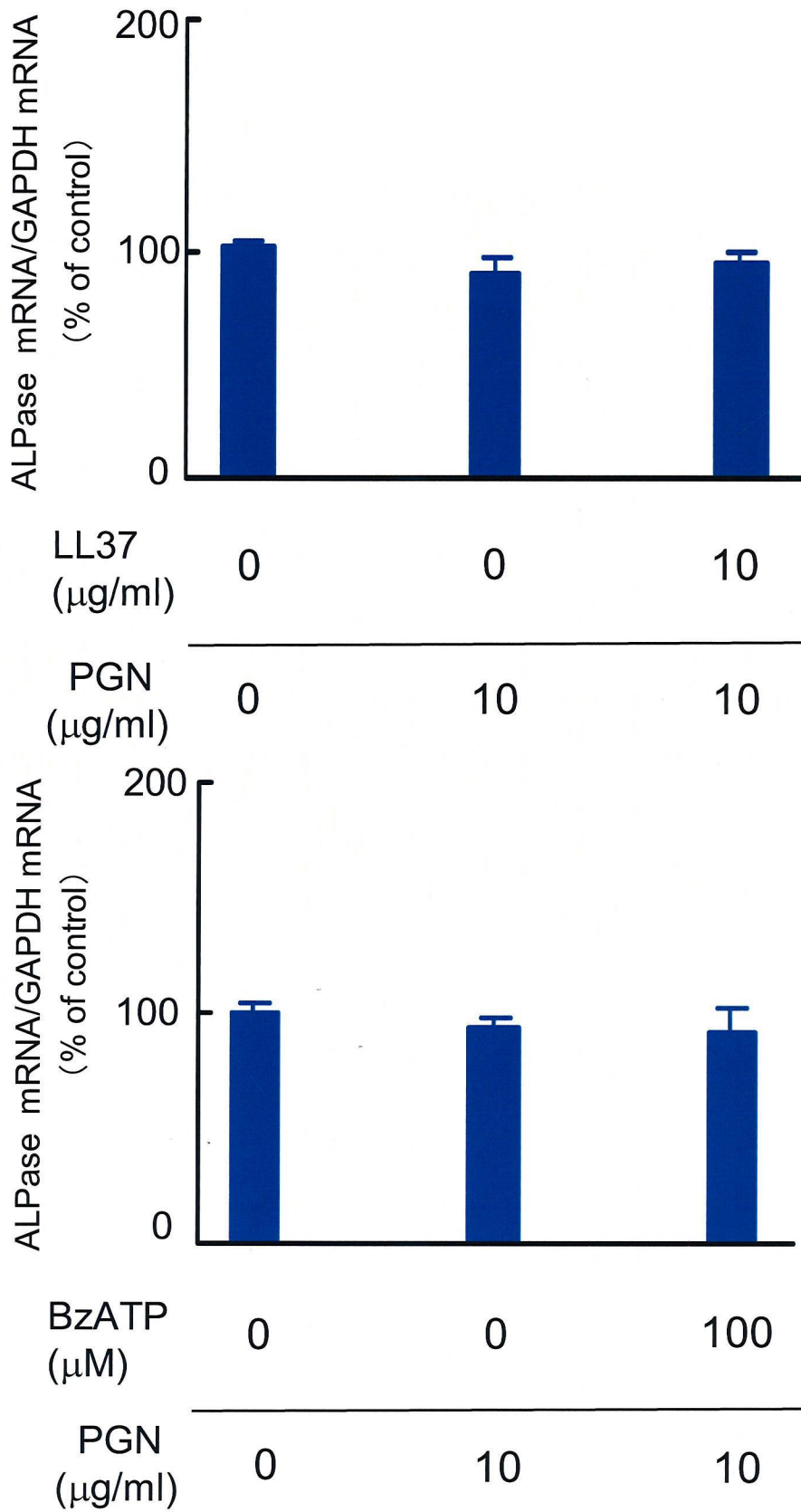


図9. PGN存在下におけるHP cellsのALPase mRNA発現に及ぼすLL37の影響

上段：LL37の影響、下段：BzATPの影響

各値は4つの培養系の平均値±SDを示す。

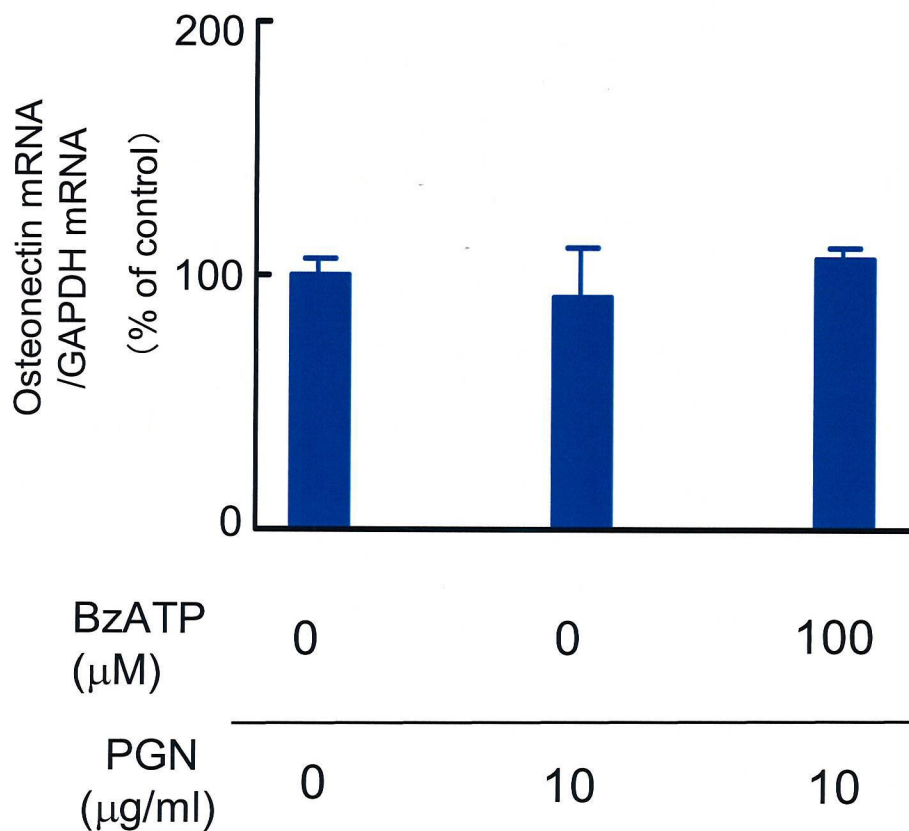
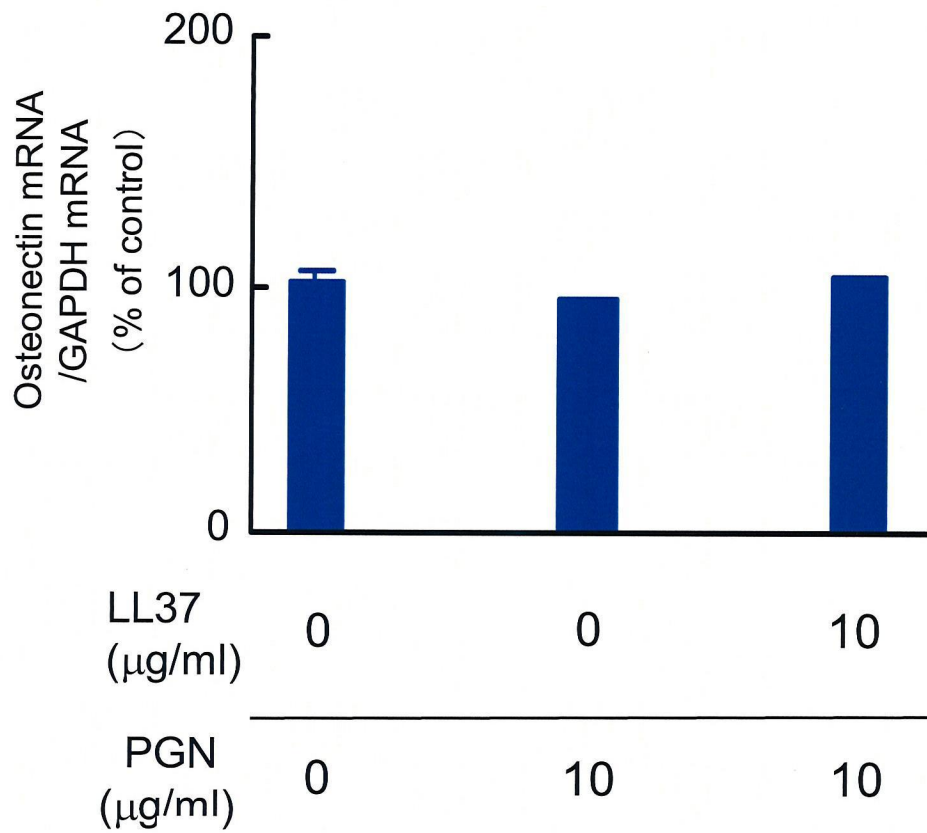
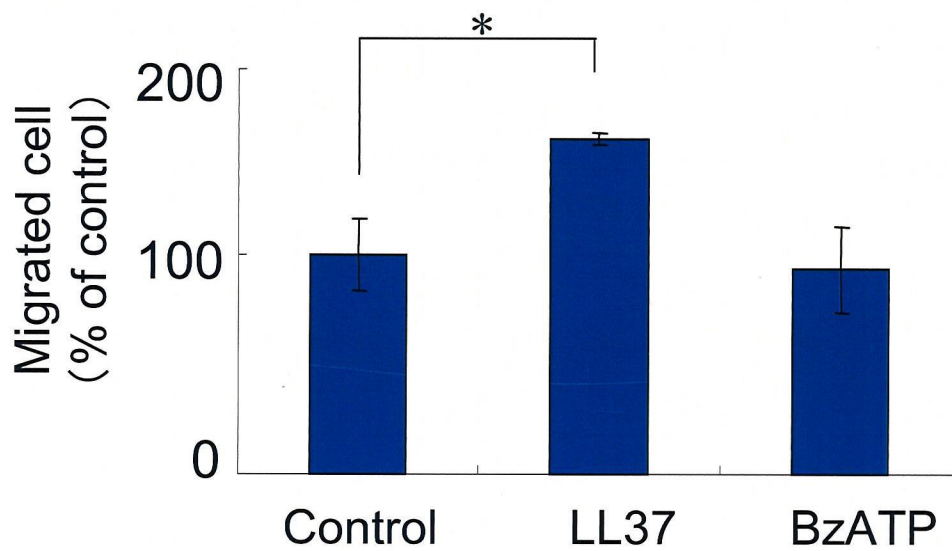
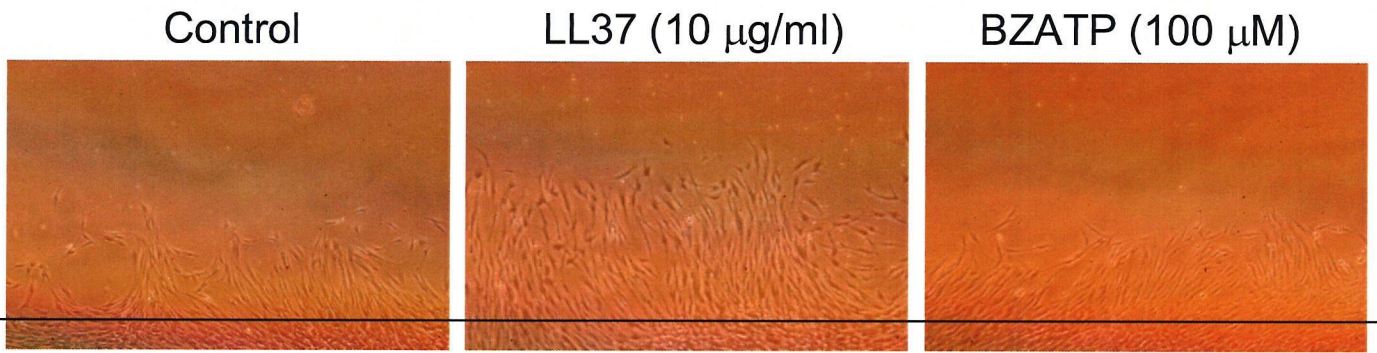


図10. PGN存在下におけるHP cellsのオステオネクチン mRNA発現に及ぼすLL37の影響
 上段：LL37の影響、下段：BzATPの影響
 各値は4つの培養系の平均値±SDで示す。

Wound healing 法



Transwell insert 法

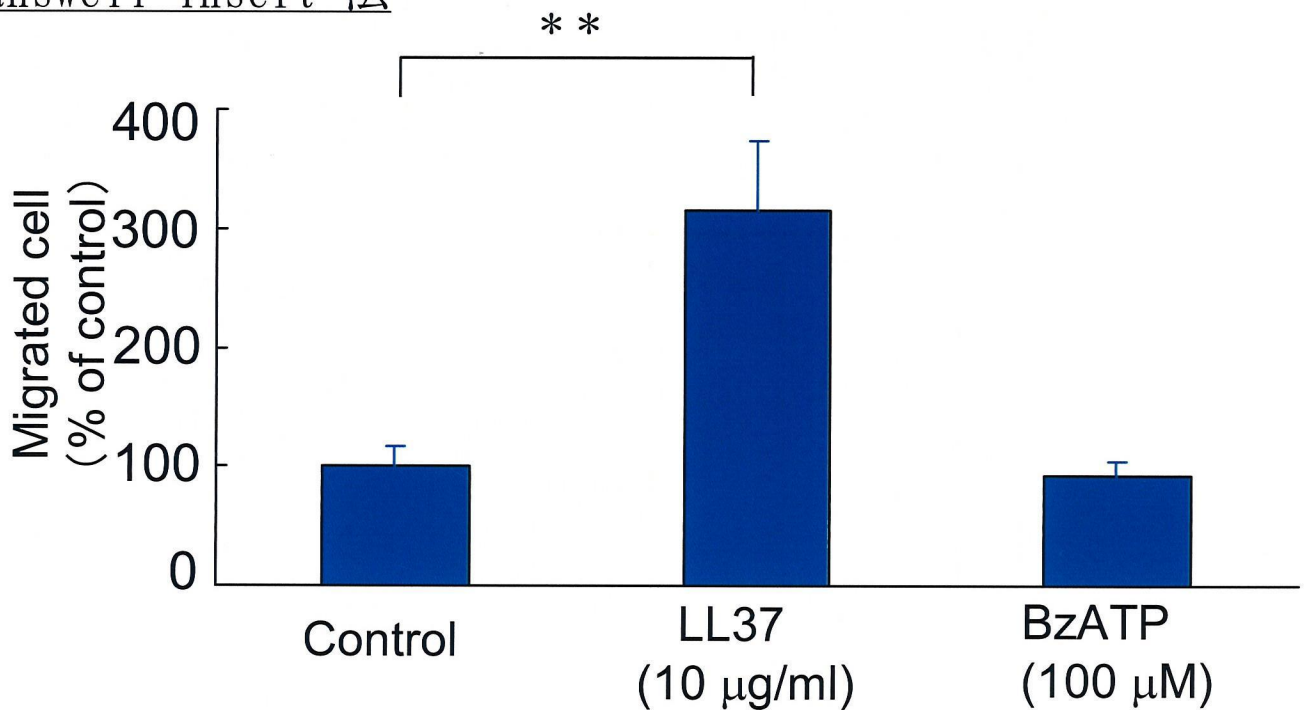
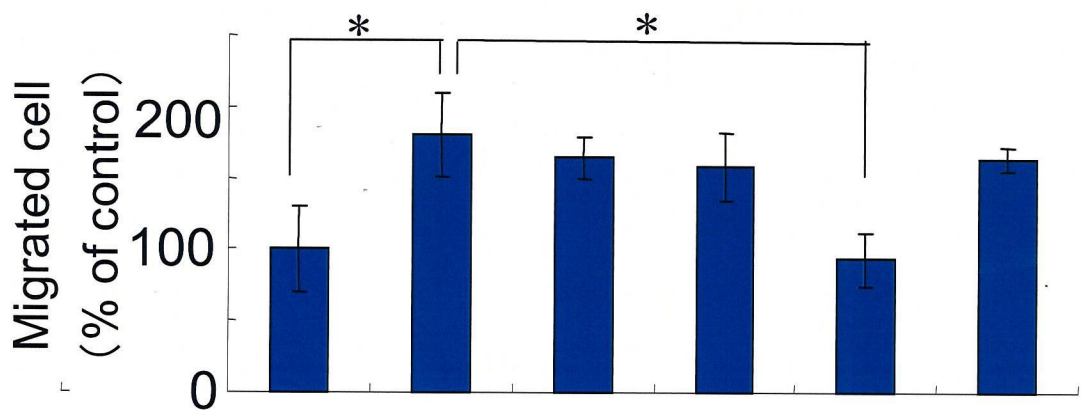
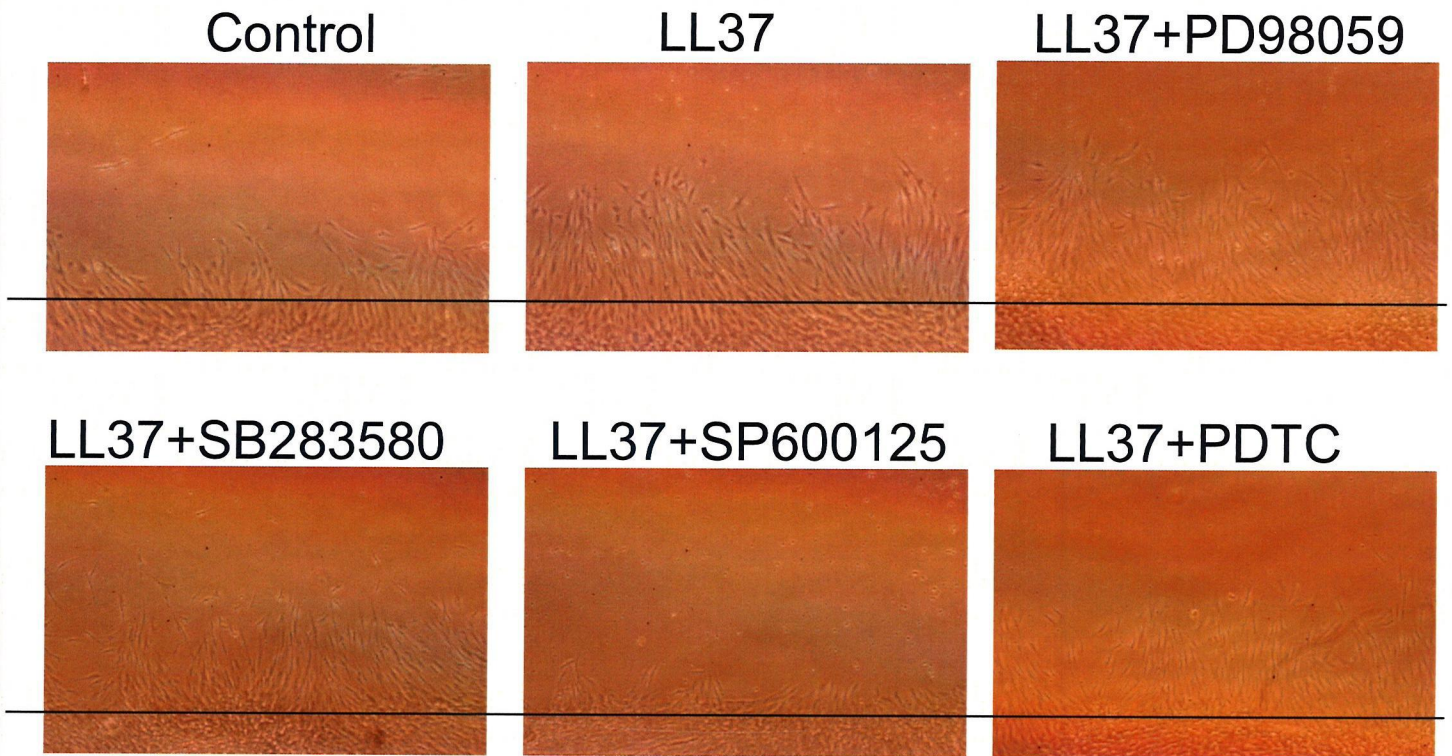


図 1 1 . HP cellsのmigrationに及ぼすLL37の影響
各値は3つの培養系の平均値±SDで示す。

P<0.01、P<0.01



LL37 (10 $\mu\text{g/ml}$)	-	+	+	+	+	+
PD98059 (50 μM)	-	-	+	-	-	-
SB203580 (10 μM)	-	-	-	+	-	-
SP600125 (10 μM)	-	-	-	-	+	-
PDTC (10 μM)	-	-	-	-	-	+

図1 2. LL37によって誘導されるMigrationに及ぼす各種阻害剤の影響
 値は3つの培養系の平均値 \pm SDで示す。
 * $P < 0.05$

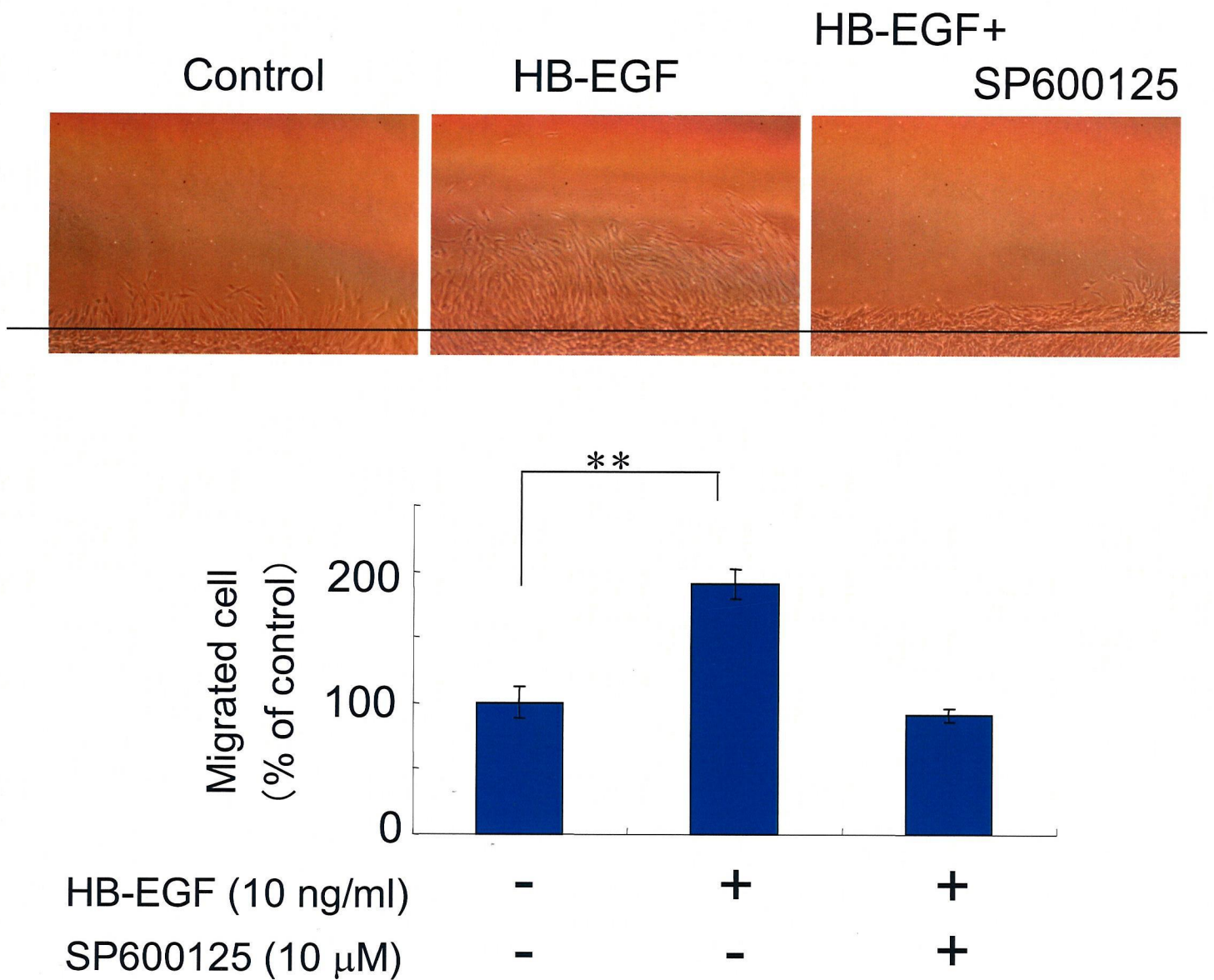
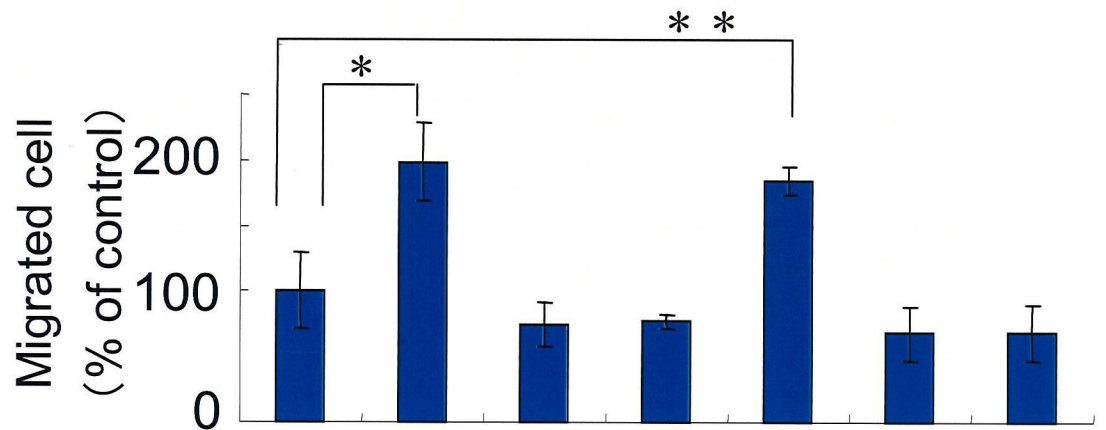
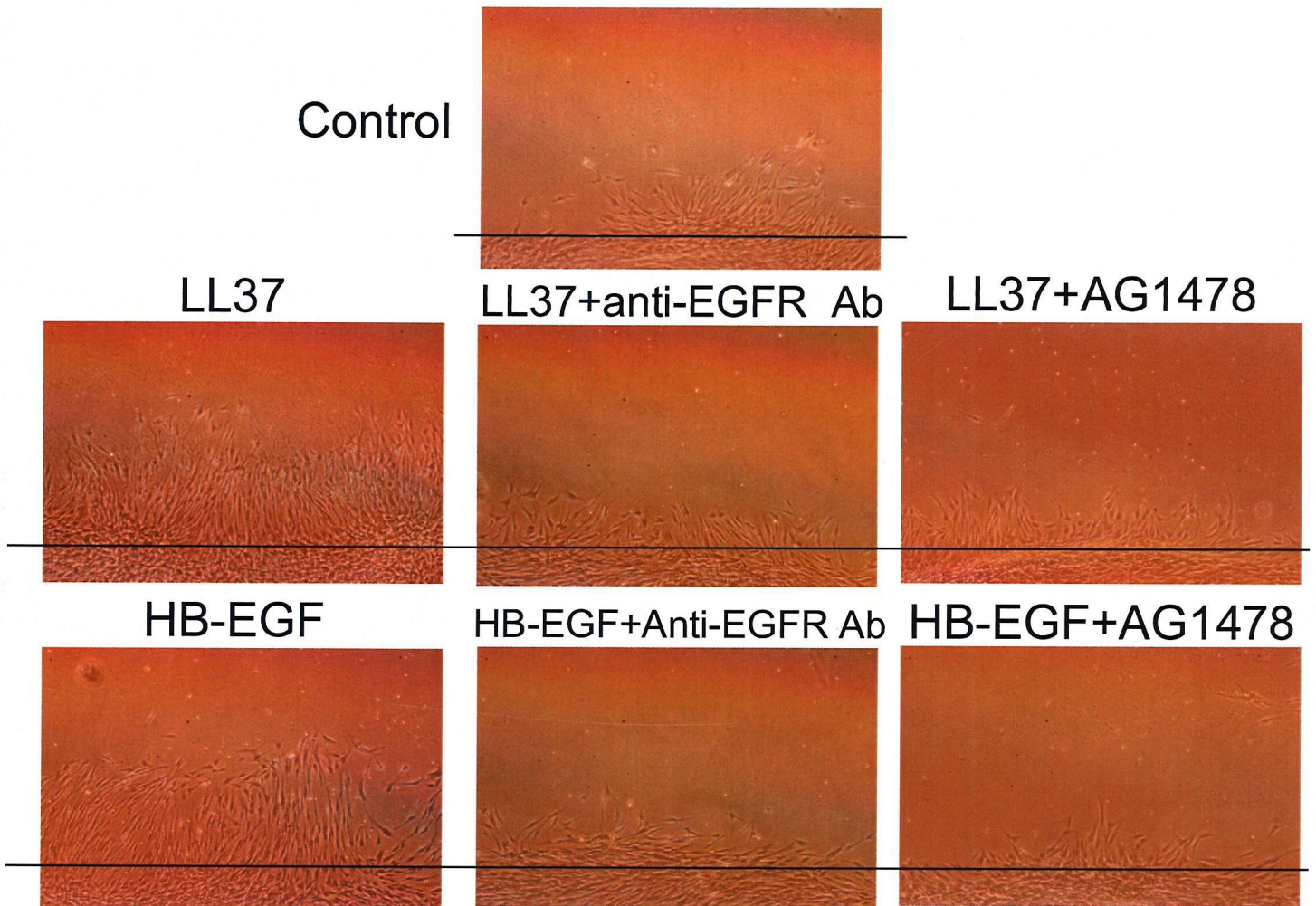


図13. Migrationに及ぼすHB-EGFの影響
 値は3つの培養系の平均値±SDで示す。
 **P<0.01



LL37 (10 μ g/ml)	-	+	+	+	-	-	-
HB-EGF(10 ng/ml)	-	-	-	-	+	+	+
Anti-EGFR Ab (10 μ g/ml))	-	-	+	-	-	+	-
AG1478 (30 nM)	-	-	-	+	-	-	+

図1 4. LL37およびHB-EGFによって誘導されるMigrationに及ぼすEGFRの関与値は3つの培養系の平均値 \pm SDで示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

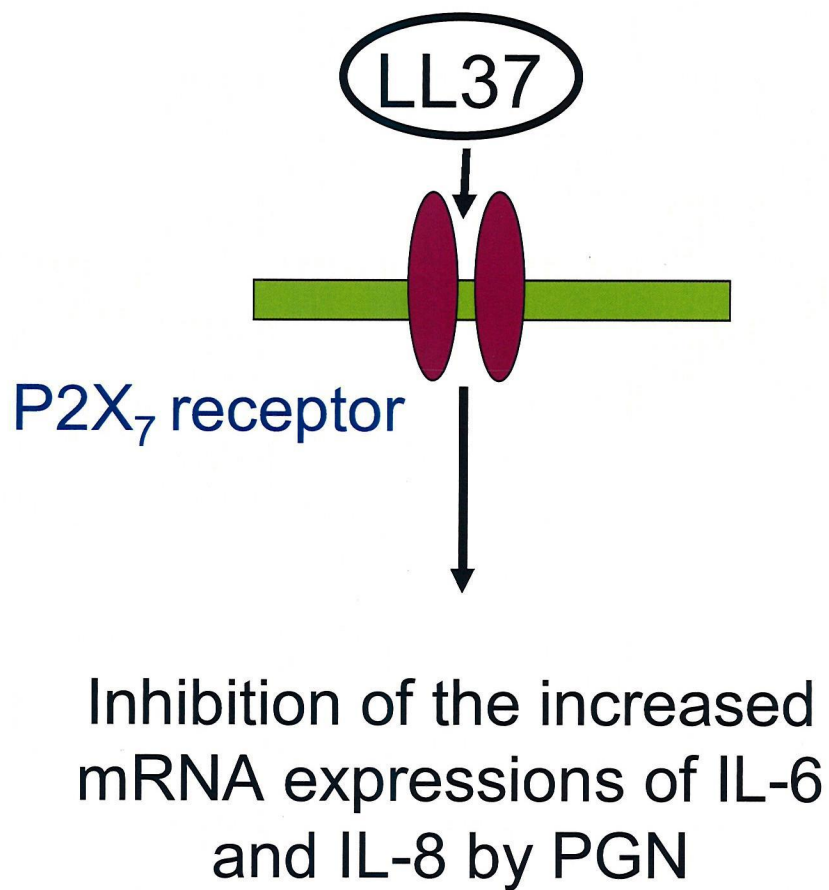


図15. HP cellsにおいてPGNによって誘導されたIL-6及びIL-8 mRNA発現促進をLL37はP2X₇受容体を介して抑制する

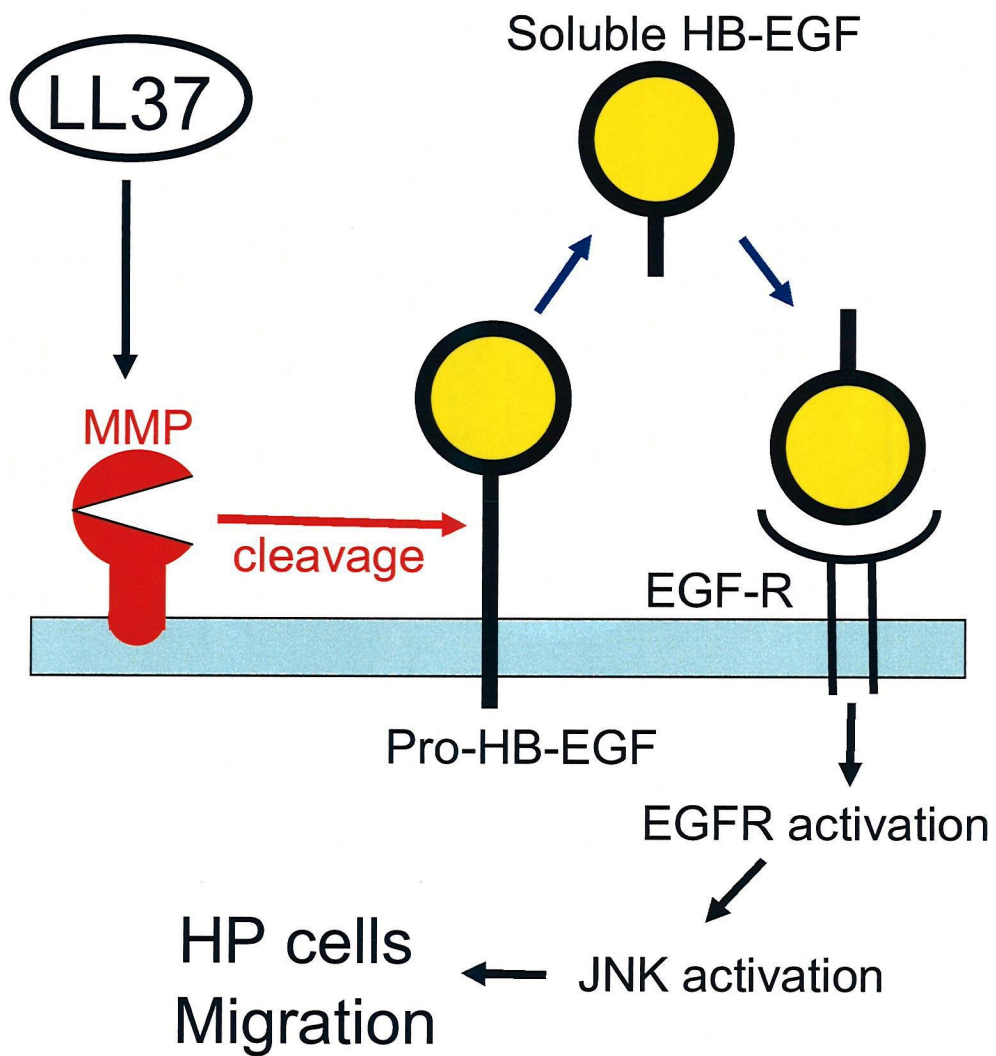


図16. LL37によるHP cellsのmigrationの予想されるメカニズム