

# 論文内容要旨

Reversible binding of heparin to high-dose LL37 eliminates its cytotoxicity with undiminished antimicrobial and LPS-neutralizing abilities

(Heparin との可逆的な結合は抗菌活性および LPS 中和能を減弱することなく, 高濃度 LL37 の細胞障害性を改善する)

主指導教員：柴 秀樹 教授

(医歯薬保健学研究科 歯髓生物学)

副指導教員：香西 克之 教授

(医歯薬保健学研究科 小児歯科学)

副指導教員：宿南 知佐 教授

(医歯薬保健学研究科 生体分子機能学)

吉田 和真

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【研究目的】

歯内疾患の主要原因は細菌である。口腔内細菌やその産生物が歯髄組織に侵入し、炎症を引き起こす。またマウスにおいて、リポ多糖(LPS)の歯髄への塗布によって根尖性歯周炎が惹起される。このように、LPSは歯内疾患発症の重要な因子であることから、抗菌活性に加えてLPS中和能を有する薬剤は歯内治療への応用が期待される。

LL37はcathelicidin familyに属する陽性帯電の抗菌ペプチド(AMPs)で、弱陰性帯電の細菌細胞膜に誘引され、細胞膜に孔を形成することによって抗菌力を発揮する。抗菌活性に加えて、LL37はLPS中和能を持つため、歯内疾患治療薬の候補であると考えられる。一方、高濃度LL37は宿主細胞障害性を示すことから、AMPsの抗菌活性を維持し、細胞障害性を改善する試みがなされてきたが、臨床応用に至る成果は未だ得られていない。したがって、抗菌活性およびLPS中和能を有しつつ、細胞障害性のないLL37の開発が必要である。

本研究では、LL37が陰性帯電分子のグリコサミノグリカン(GAGs)と電気的に結合することに着目し、GAGsとLL37の複合体を作製し、その複合体が歯内疾患治療薬として必要な活性を有しているかどうかを検討した。

## 【材料および方法】

1. LL37の抗菌活性：大腸菌HST-08をLL37で刺激した後、寒天培地に播種し、コロニー形成単位(CFU)によって抗菌活性を調べた。2. LL37の細胞障害様式：ヒト歯髄細胞、ヒト骨肉腫様細胞およびヒトマクロファージ様細胞を血清存在下で24時間培養した。引き続き、24時間無血清条件下で培養した後、LL37(0~40 μM)を加えた。添加24時間後、MTT, LDH, Caspase 3/7の各 assayによって、細胞生存、細胞膜障害性、アポトーシスを評価した。3. GAGsがLL37に与える影響：LL37(10 μM)と種々のGAGs (heparin: 0~10 μg/ml, chondroitin sulfate: 0~5 μg/ml, hyaluronic acid: 10, 100 μg/ml), あるいは heparin-agarose beads (heparin 5 μg/ml 相当)を混和したものをそれぞれGAG-LL37複合体, heparin-LL37 agarose beadsとして実験に用い、抗菌活性と細胞障害性を調べた。4. GAGs, LL37およびLPSの会合：GAG-LL37複合体を非変性・変性条件下でSDS-PAGEに展開し、ウエスタンブロッティング(WB)によってGAGsとLL37の結合を調べた。また、heparin-LL37 agarose beadsにLPS(0~200 μg)を加え、beadsに残ったLL37の量をWBによって比較した。さらに、heparinまたはLL37を固相化した固相法 assayによってLPSとの会合を検討した。5. heparin-LL37 agarose beadsのLPS中和能：マクロファージ様細胞をLPS単独またはbeadsとともに刺激した際の炎症性サイトカイン発現をELISA法とRT-PCR法によって調べた。

## 【結果】

1. 1.0 μM以上のLL37で大腸菌のCFUは0になった。2. LL37は濃度依存的に供試細胞の生存率を低下させ、LDH放出量を増加させたが、アポトーシス活性を増加させなかったことから、LL37の細胞障害性は細胞膜傷害に起因することが判明した。3. 供試したGAGsの中でheparinが最も有用であることが判明した。すなわち、口腔内細菌である*S. mutans* UA159, *S. salivarius* GTC215, *S. sobrinus* OMZ176, *A. actinomycetemcomitans* HK1651 および

IDH781 に対する抗菌活性を妨げず、細胞障害性を改善する heparin と LL37 の特定の混合比 (2~6  $\mu\text{g/ml}$  heparin-10  $\mu\text{M}$  LL37) が存在した。4. Heparin と LL37 は直接的に結合していた。LPS は、Heparin ではなく LL37 と直接的に会合した。LPS との競合的な会合によって heparin-LL37 複合体は LL37 を遊離した。5. Heparin-LL37 agarose beads から遊離された LL37 は LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) によって誘導される TNF- $\alpha$  産生および TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 発現を抑制した。

#### 【結論と考察】

LL37 と可逆的に結合した Heparin は LL37 の細胞障害性を低減し、抗菌活性と LPS 中和能を抑制しないことが明らかとなった。さらに、LL37 の細胞障害性低減は、高濃度投与を可能とすることから、より強い抗菌活性と LPS 中和能を発揮できると考えられた。以上から、heparin-LL37 複合体は歯内疾患の感染と炎症制御に有用であることが示唆された。