

論文内容要旨

口腔粘膜上皮細胞の核酸認識と
抗菌ペプチドの炎症応答活性化機構

主指導教員：加藤 功一 教授

(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：太田 耕司 教授

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

副指導教員：武知 正晃 准教授

(医系科学研究科 口腔外科学)

加藤 大喜

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

口腔粘膜において感染や外傷などにより、細胞死が生じることが知られている。近年、組織壊死を伴う細胞死によって放出された核酸や蛋白などのダメージ関連分子パターン (DAMPs) を細胞内外受容体が認識し、粘膜炎症が惹起されることが考えられている。しかしながら口腔粘膜上皮細胞における自己核酸認識機構と口腔粘膜の炎症応答の関連については報告がない。

一方、Cathelicidin 型抗菌ペプチド LL-37 は、37 個のアミノ酸からなり、細菌の感染により好中球や口腔粘膜上皮細胞から産生され、唾液中にも存在する。近年では皮膚、腸粘膜の炎症性疾患組織における LL-37 の発現の増加が報告されており、粘膜炎症の免疫応答に何らかの役割をもつ可能性が考えられる。

本研究で申請者は、口腔粘膜上皮細胞の自己核酸認識機構と抗菌ペプチド LL-37 による炎症応答の解明を目的として、不死化口腔粘膜上皮細胞 (RT7) を用いた実験を行い以下の結果を得た。

1. RT7 に自己壊死画分を添加することで白血球遊走因子である CXCL10 の発現が増加した。LL-37 は自己壊死画分で誘導された CXCL10 の発現をさらに増加させた。LL-37 誘導性 CXCL10 の発現は二本鎖 RNA (dsRNA) 特異的分解酵素を加えることで抑制された。
2. LL-37 は dsRNA である Poly(I:C) や dsDNA である Poly(dA:dT) で誘導される炎症性サイトカインの発現を著しく増加させた。一方、LL-37 のスクランブルペプチドや、他の抗菌ペプチドでは、核酸誘導性の CXCL10 の発現に影響は認めなかった。
3. NF- κ B 阻害剤の処理は dsRNA と LL-37 で誘導される CXCL10 の発現を抑制した。また、LL-37 は dsRNA で誘導される NF- κ B のリン酸化を増加させた。
4. Binding assay によって LL-37 が dsRNA、dsDNA と結合親和性をもつことを確認した。Flow cytometry および蛍光顕微鏡によって LL-37 と核酸の複合体が上皮細胞内に導入されることが示唆された。添加により蛍光される細胞について確認した。LL-37 の核酸細胞内導入能は各種エンドサイトーシス阻害剤の中でもクラスリン・カベオラ依存型エンドサイトーシス阻害剤によって抑制されることが認められた。
5. 蛍光顕微鏡によって、LL-37 で細胞内導入された核酸と細胞内受容体 RIG-I との結合が観察された。RIG-I のノックダウンにより NF- κ B のリン酸化が抑制され、LL-37 の核酸依存性炎症応答が抑制された。

以上の結果より下記のことが示唆された。1) 口腔粘膜上皮細胞において LL-37 は自己壊死画分中の dsRNA で誘導された CXCL10 の発現を増加させる。2) LL-37 の核酸誘導性の炎症応答に NF- κ B の活性化が関与する。3) LL-37 は核酸と結合しクラスリン・カベオラ依存型エンド

サイトローシスによって核酸を細胞内に導入する。4) LL-37によって細胞内に導入された核酸は細胞内受容体である RIG-I と結合することによって炎症応答が活性化される。

本研究によって抗菌ペプチド LL-37 が口腔粘膜上皮細胞の自己壊死などによって放出される核酸の認識による炎症応答を活性化し、口腔粘膜の炎症促進に重要な役割を担っている可能性が示唆された。