

学 位 論 文

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

加藤 大喜

広島大学大学院医歯薬保健学研究科
博士課程 医歯薬学専攻

2019 年度

主指導教員：加藤 功一 教授
(医系科学研究科 生体材料学)

I. 緒言

口腔粘膜において感染や外傷，放射線治療などにより壊死した細胞から放出される核酸などの **Damage-associated molecular patterns (DAMPs)** が上皮細胞の受容体を活性化し，炎症応答を誘導することが報告されている^{1,2)}。また，様々な種類の核酸が炎症性サイトカインやケモカインの発現に関与しているという報告もある³⁾。我々は以前，口腔粘膜細胞に核酸を添加することで **IL-8** や **CXCL10** などの炎症性サイトカインやケモカインの発現が増加することを報告している⁴⁾。このことは口腔粘膜上皮細胞には自己や非自己の核酸を認識し炎症応答を誘導する機構が存在することを示唆している。

一方，37個のアミノ酸からなる **Cathelicidin** 型抗菌ペプチド **LL-37** は細菌感染によって上皮細胞や好中球から産生され，唾液中にも存在している。強い抗菌作用を持つだけでなく，創傷治癒や血管新生など様々な生理活性をもつことが知られている^{5,6)}。近年では，腸粘膜や皮膚などの炎症性粘膜疾患組織における **LL-37** の発現の増加が報告されている^{7,8)}。口腔領域での炎症性疾患においても健常組織と比較して慢性歯周炎の組織中に **LL-37** が有意に発現しているという報告⁹⁾ や，口腔扁平苔癬患者の唾液中の **LL-37** がステロイド療法によって減少するという報告¹⁰⁾がある。これらのことから **LL-37** は口腔粘膜における炎症応答に何らかの役割を担っていることが考えられる。しかしながら，口腔粘膜における **LL-37** と核酸依存性の炎症誘導機構の関連については報告されていない。

また，免疫組織化学染色によって **LL-37** は様々な皮膚疾患組織や歯周疾患組織中で上皮細胞の細胞質に局在していることが確認されており¹¹⁻¹⁴⁾，このことは細胞質内受容体と **LL-37** が関連している可能性を示唆している。我々は口腔

粘膜細胞にウイルス由来核酸を transfection reagent で導入することによって、細胞内受容体である Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)が核酸を認識し、Interferon regulatory factor 3(IRF3) Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) 経路を介して IFN- β を誘導することで口腔粘膜の RNA ウイルス感染に対する防御応答を行っていることを報告している¹⁵⁾。この細胞質内受容体である RIG-I の発現が LL-37 などの抗菌ペプチドによって誘導されるという報告¹⁶⁾もあるが、細胞質内受容体と LL-37 による炎症応答の関連については未だ解明されていない。

そこで本研究では、口腔粘膜上皮細胞の抗菌ペプチド LL-37 による核酸依存性炎症誘導機構と細胞質内受容体の関与を明らかにするため、まず不死化口腔粘膜上皮細胞 (RT7) の自己壊死画分 (Necrotic Cell Supernatants: NCS) を作製し単独添加あるいは LL-37 と同時添加することで、RT7 における炎症応答性遺伝子の発現について検討した。また、様々な構造を有した核酸と LL-37 を添加した際の核酸認識受容体の同定と炎症応答性遺伝子の発現誘導機構の検討を行った。

II. 実験材料および実験方法

1. 細胞株および細胞培養

本研究では human telomerase reverse transcriptase (hTERT) 遺伝子を導入し不死化させたヒト口腔粘膜上皮細胞 RT7 を用いた¹⁷⁾. RT7 の培養は表皮角化細胞添加因子セット-Gold (KGM-Gold™ SingleQuots; ロンザジャパン株式会社, 東京) を培地に用いた. 5% CO₂ 存在下, 37°C加湿下で培養した. 全ての継代培養はカルチャープレート (CELLSTAR, greiner bio-one ; Duesseldorf, German) に播種した細胞をトリプシン/ EDTA 溶液(ロンザジャパン株式会社, 東京) で処理し, 細胞を浮遊・回収して行った.

2. 壊死画分の作製

壊死細胞上清の作製は Diana ら¹⁸⁾の方法に従った. すなわち, RT7 をそれぞれの培地に 1×10^6 個/mL となるよう懸濁し凍結融解を 5 回繰り返した. その後, 遠心分離 (1500 rpm, 4°C, 5 分) することで得られた上清を自己壊死画分として実験に供した. 自己壊死画分中に存在する核酸の除去目的に RNaseIII (New England Biolabs Japan, 東京) を使用した.

3. 核酸とペプチドの添加

核酸は TLR8 のアゴニストである single-stranded RNA (ssRNA) [ssPolyU] (Invivogen, San Diego, CA, USA), TLR9 のアゴニストである single-stranded DNA(ssDNA) [CpG-ODN](Invivogen), TLR3 のアゴニストである double-stranded RNA (dsRNA) [Poly(I:C)] (Invivogen), 細胞質 DNA センサー (CDS) のアゴニストである double-stranded DNA (dsDNA) [Poly(dA:dT)] (Invivogen) を 1 μ g/mL

の濃度で用いた。ペプチドは LL-37 (AnaSpec, Chantilly, VA), LL-37 scrambled (GenScript, NJ, USA), Recombinant Human Beta Defensin-1 (PEPROTEC, NJ, USA), Recombinant Human Beta Defensin -2 (PEPROTEC, NJ, USA), Lactoferrin (Sigma-Aldrich ジャパン, 東京), Vasoactive Intestinal Peptide (VIP; Genscript, Piscataway, NJ, USA), Orexin B (ORXB; Genscript, Piscataway, NJ, USA) を 1 μ g/mL の濃度で使用した。核酸とペプチドを同時添加する際には、室温で 30 分間反応させた後に添加した。

4. RNA 抽出

細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて、製品マニュアルに従って DNA 導入後の細胞から Total RNA を抽出した。6well カルチャープレート (CELLSTAR, greiner bio-one; Duesseldorf, German) 上で培養した細胞の培地を吸引し、Phosphatase Inhibitor Solution (PBS) にて 1~2 回洗浄した。その後 PBS を少量追加し Cell スクレイパーにて細胞を採取し、15,000 rpm で約 10 分程度遠心し、上澄みを除去し細胞を回収した。細胞に 1% 2-メルカプトエタノールを加えた RLT Buffer を加え、23 ゲージ注射針に数十回通過させることでゲノム DNA を切断した。細胞溶解液を RNA 結合スピンカラムに移し 15,000 rpm で 30 秒遠心後、カラムに結合した Total RNA を RW Buffer を添加し遠心することで洗浄した。続いて RPE Buffer を 500 μ l 添加し遠心する操作を 2 回繰り返す。最後に RNase-free water 30 μ l を添加し 15,000 rpm で 1 分遠心して Total RNA を回収した。回収液中の RNA 濃度をナノドロップ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により測定した。

5. Real-Time RT-PCR

Total RNA 1 μ g をテンプレートとし、逆転写酵素 Rever Tra Ace 1 μ L, Random Primer (25pmol), dNTP Mixture (各 20mM), Ribonuclease Inhibitor (10U) を含む Rever Tra Ace 反応バッファー (TOYOBO, 大阪) を用い、逆転写反応を行った。30 $^{\circ}$ C 10分, 42 $^{\circ}$ C 20分, 99 $^{\circ}$ C 5分, 4 $^{\circ}$ C 5分を Master cycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いて実施し、1本鎖 cDNA 20 μ L を Real-Time RT-PCR のテンプレートとして得た。

Real-Time RT-PCR には標準遺伝子として GAPDH を使用し、上記のテンプレート cDNA 1 μ L および遺伝子特異的センス及びアンチセンスプライマー 6pmol, THUNDERBIRD SYSER qPCR Mix (TOYOBO) を含む反応液 20 μ L を用いた。反応は 95 $^{\circ}$ C 30秒, 58 $^{\circ}$ C 30秒, 72 $^{\circ}$ C 1分を 40 サイクル行った。検出には CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた。使用したプライマー (北海道システムサイエンス) の塩基配列は表 1 に別記した。

6. 各種シグナル伝達阻害剤とサイトカインの添加

各種シグナル伝達阻害剤は BX795 (Invivogen), Bay11-7082 (Focus Biomolecules), Ly294002 (CST ジャパン, 東京), AG490 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を使用した。各阻害剤を DMSO に溶解し、核酸や LL-37 を添加する 30 分前に 10 μ M で添加した。また、Recombinant Human TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を 10ng/mL となるように培地に添加した後、核酸や LL-37 を添加した。

7. 蛍光標識した核酸の観察

チャンバースライド (松浪硝子工業株式会社, 大阪) に細胞を播種し, サブコンフルエントまで培養後, Fluorescein-labeled Poly(I:C) (Invivogen), Rhodamine-labeled Poly(dA:dT) (Invivogen) を 1 μ g/mL の濃度で添加し, 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で 30 分固定した. 0. 2% TritonX-100 にて膜透過処理を行った後, 1% ウシ血清アルブミン(以下 BSA と略す) in PBS 溶液を用いてブロッキングを行い, PBS にて洗浄後, 核染色を ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Thermo Fisher Scientific Life Technologies Japan Ltd., 東京) にて行い, 蛍光励起および位相差画像を蛍光顕微鏡 BZ9000 (KEYENCE, 大阪) を用いて記録した.

8. 蛋白抽出および Western blotting 法

10cm カルチャープレート (CELLSTAR) 上で培養した細胞をスクレイパーにて剥離浮遊後, 15mL の遠沈管に回収し 4 $^{\circ}$ C 15,000 rpm にて遠心し, 上清を取り除きペレットを回収した. 蛋白抽出には Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma-Aldrich) を用いた. すなわち, 1%プロテアーゼインヒビター (Roche, Indianapolis, IN, USA) を添加した 100~300 μ L の氷冷 Lysis buffer を回収したペレットに添加し, 数十回のピペッティングを行い, 30 分~60 分氷上にて振とうした. この操作を 2 回繰り返した後, 4 $^{\circ}$ C 13,000 rpm にて 10 分遠心後, 上清をサンプルとして回収した.

抽出した各種サンプルに 5 \times sample buffer (1M Tris-HCL pH6.8, 10% SDS, glycerol, 5% 2-メルカプトエタノール, ブロモフェノールブルー) を加えた後, 95 $^{\circ}$ C で 5 分加熱し, 直ちに 4%スタッキングゲル, 10%ランニングゲルを用いて電気泳動を行った. サンプルは Immobilon - P PVDF メンブレン (Millipore

corporate Headquarters, Billerica, MA, USA) に転写後, ブロッキングワシ P (ナカライテスク, 京都) により室温にて 1 時間ブロッキングを行った. 一次抗体 RIG-I (D14G6) Rabbit mAb Antibody (CST ジャパン), NF- κ B p65 (D14E12) XP Rabbit mAb Antibody (CST ジャパン), Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (93H1) Rabbit mAb Antibody (CST ジャパン) は 5%BSA in TBS-T 溶液にて 1000 倍に希釈し 4°C にて 一晩行い, TBS-T (20mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.14M NaCl, 0.05% Tween-20) でメンブレンを洗浄後, 1000 倍に希釈した二次抗体 ECL Anti-Rabbit IgG. Horseradish Peroxidase-Linked Whole Antibody (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社, 東京) と室温で 1 時間反応させた. 二次抗体反応後, TBS-T にてメンブレンを洗浄し, ECLTM Plus Western blotting system (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を発光基質として添加し, LUMINESCENT IMAGE ANALYZER (LAS-4000 mini PR, FUJIFILM, 東京) を用い発光シグナルを検出した. 内部標準は, 細胞質蛋白において GAPDH Antibody (Millipore corporate Headquarters, Billerica) を用いた.

9. Binding assay

DNA-BIND[®] 96 Well Plate Amine Binding N-Oxysuccinimide Surface Black Polystyrene (Corning, ME, USA) に Poly(I:C) または Poly(dA:dT) を 1 μ g/mL の濃度で添加し室温で一晩反応させた. 1%BSA in PBS 溶液によって室温で 1 時間ブロッキングを行った後, PBS-T (0.05% Tween-20) にて洗浄し, biotin-labeled LL-37 (Invivogen) を 2 μ g/mL の濃度で添加し室温で 1.5 時間反応させた後, 再度 PBS-T にて洗浄した. さらに streptavidin-HRP 溶液 100 μ L を室温にて 1.5 時間反応させ基質発色溶液 (ABTS Liquid Substrate) 100 μ L にて発行させた. 検出には Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad) を用い, 450nm の波長にて検出を行

った。

Poly(I:C) または Poly(dA:dT) を 5 μ g/mL, LL-37 を 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 μ g/mL の濃度で 30 分間反応させたものを 100ng/mL ethidium bromide (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を含む 2% アガロースゲル (和光, 大阪) にて電気泳動を行い, Printgraph ゲルイメージングシステム (ATTO, 東京) により記録した。

10. 蛍光免疫細胞染色法

チャンバースライド (松浪硝子工業株式会社, 大阪) に細胞を播種し, サブコンフルエントまで培養後, 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で 30 分固定した。0.2% TritonX-100 にて膜透過処理を行った後, 1% BSA in PBS 溶液を用いてブロッキングを行い, 1% BSA in PBS 溶液にて 1:50 倍希釈した一次抗体液 RIG-I (D14G6) Rabbit mAb Antibody (CST ジャパン) を反応させ室温にて一晩反応させた。PBS にて洗浄後, 1% BSA in PBS 溶液にて 1:500 倍希釈した蛍光標識抗体 Alexa Fluor 標識 二次抗体 (サーモフィッシュャーサイエンティフィックライフテクノロジー ジャパン株式会社, 東京) を遮光下, 室温にて 1 時間反応させた。PBS にて洗浄後, 核染色を ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (サーモフィッシュャーサイエンティフィックライフテクノロジー ジャパン株式会社) にて行い, 蛍光励起および位相差画像を蛍光顕微鏡 BZ9000 (KEYENCE, 大阪) を用いて記録した。

11. Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Fluorescein-labeled Poly(I:C), Rhodamine-labeled Poly(dA:dT) を 1 μ g/mL の濃度で単独添加あるいは LL-37 (1 μ g/mL) と同時添加を行い, コントロールとして蛍光標識のない Poly(I:C), Poly(dA:dT) を用いた。サンプル解析は, Becton

Dickinson FACS Caliber™ (Becton Dickinson and company) を使用し、細胞 sorting は、Becton Dickinson FACS Aria II (Becton Dickinson and company) を使用した。これらの解析には、FACS Diva ソフトウェアを用いた。

12. 各種エンドサイトーシス阻害剤

各種エンドサイトーシス阻害剤はクラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤 Chlorpromazine (Sigma-Aldrich), カベオラ依存型エンドサイトーシス阻害剤 Nystatin (Sigma-Aldrich), カベオラ・クラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤 Dynasore (Cayman Chemical), マクロピサイトーシス阻害剤 Cytochalasin B (Cayman Chemical), ライソゾーム阻害剤 Chloroquine (Cayman Chemical) を使用した。すべてのエンドサイトーシス阻害目的に RT7 を 4°C に置いた。Chlorpromazine, Nystatin, Dynasore, Cytochalasin B は DMSO に溶解し, Chloroquine は純水に溶解し, 各種阻害剤を Fluorescein-labeled LL-37 添加の 30 分前に 20µM で添加した後, Fluorescein-labeled LL-37 (コスモバイオ株式会社, 東京) を 1µg/mL の濃度で添加した。

13. RIG-I ノックダウン株の作製

Lipofectamin RNAiMAX (Life technologies) を用いた siRNA によるノックダウン法の製品マニュアルに従って行った。すなわち, Opti-MEM 培地に RIG-I Stealth siRNA (Life technologies), Lipofectamin RNAiMAX を各々溶解し, 両者を混合させ, 5~10 分反応させた。その後, RT7 に添加し, トランスフェクションを行った。48 時間作用後, 核酸・LL-37 の添加を行った。RIG-I のノックダウンは Western blotting 法によって確認した。siRNA の塩基配列は表 2 に示した。Control として, Control siRNA (Stealth RNAi Negative Control, Medium GC

Duplex; invitrogen by life technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いた.

14. 統計解析

すべての検定は例数を 3 以上で行い, 標準誤差は \pm , 例数は n にて示した. 得られたデータの統計的優位性は, 2 群間比較に Student's t-test を用いて解析し, P value <0.05 の場合を有意差ありとした.

III. 結果

1. 自己壊死画分による炎症応答遺伝子の発現誘導と LL-37 の影響

RT7 に自己壊死画分および RNaseIIIを添加し炎症応答遺伝子の発現誘導を検討した。自己壊死画分の添加によって Th1 細胞活性化因子である CXCL10 の発現誘導が増加した。自己壊死画分を RNaseIIIで前処理し RT7 に添加したところ CXCL10 の発現誘導が減少した。また、LL-37 を同時添加することで自己壊死画分誘導性の CXCL10 に対する影響を検討した。自己壊死画分に LL-37 を混和したものを RT7 に添加したところ自己壊死画分単独添加と比較して CXCL10 の発現誘導が増加した。自己壊死画分を RNaseIIIで前処理し LL-37 と混和したものを RT7 に添加したところ自己壊死画分・LL-37 同時添加と比較して CXCL10 の発現誘導が減少した(図 1)。

2. 核酸依存性炎症応答に対する LL-37 の影響

RT7 に様々な構造の核酸を単独添加あるいは LL-37 と同時添加し核酸依存性の炎症応答に対する LL-37 の影響について検討した。ssDNA である CpG-ODN や ssRNA である Poly(U) を単独添加あるいは LL-37 と同時添加したところ CXCL10 の発現誘導に影響は認めなかった(図 2-A)。次に、dsDNA である Poly(dA:dT) や dsRNA である Poly(I:C) を単独添加あるいは LL-37 と同時添加したところ、核酸と LL-37 の同時添加において CXCL10 の発現誘導が増加した(図 2-B)。また、Poly(dA:dT) と LL-37 の同時添加と比較して Poly(I:C) と LL-37 の同時添加において著明な CXCL10 の発現誘導の増加を認めた(図 2-B)。

さらに、dsRNA 誘導性の様々な炎症性サイトカインやケモカインの発現誘導に対する LL-37 の影響について検討した。LL-37 は dsRNA 誘導性の様々な炎症

性サイトカインやケモカインの発現誘導を増加させた(図 3).

3. LL-37 以外のペプチドによる核酸依存性炎症応答に対する影響

核酸依存性炎症応答が LL-37 に特異的に増強されるのか否かを検討するために、他のペプチドによる核酸依存性炎症応答に対する影響について検討した。唾液中には LL-37 以外にも Lactoferrin や β -defensin などの抗菌ペプチドが存在する¹⁹⁾。また、LL-37 と分子量が近い正の電荷を帯びたペプチドとして LL-37 scramble (LL-37 と同じアミノ酸をランダムに配列しなおしたもの) や血管作動性腸管ペプチド (Vasoactive intestinal peptide: VIP), オレキシン B (orexin B: ORXB) が報告されている²⁰⁾。dsRNA 誘導性 CXCL10 の発現誘導に対する LL-37 以外のペプチドの影響は認めなかった(図 4)。

4. dsRNA/LL-37 誘導性 CXCL10 の発現誘導に対する NF- κ B シグナル伝達経路の関与

各種シグナル伝達阻害剤にて前処理を行った後、dsRNA/LL-37 誘導性 CXCL10 の発現誘導に対するシグナル伝達経路を検討した。その結果、NF- κ B 関連シグナル伝達阻害剤である BX795, Bay11-7082 により CXCL10 の発現誘導が著明に減少した。一方、AKT 阻害剤である Ly294002 では CXCL10 の発現誘導がやや減少し、JAK/STAT 阻害剤である AG490 では CXCL10 の発現誘導に影響は認めなかった(図 5)。

また、NF- κ B の活性化で生じる p65 ダイマーのリン酸化について検討したところ、dsRNA 単独添加と比較して dsRNA/LL-37 同時添加では NF- κ B のリン酸化の増加を認めた(図 6)。

さらに、NF- κ B の活性化因子である TNF- α の影響についても検討した。核酸

と LL-37 同時添加による CXCL10 の発現誘導と比較して、TNF- α 存在下での核酸と LL-37 同時添加による CXCL10 の発現誘導は著明に増加した(図 7).

5. 核酸と LL-37 の結合親和性

Binding assay により LL-37 の核酸との結合親和性について検討した. 核酸を結合させた Plate と非処理の Plate に対する LL-37 の結合を比較したところ、核酸を結合させた Plate に有意に LL-37 の結合を認めた(図 8). また、核酸と LL-37 を混和したものを電気泳動にかけ、移動する核酸量の比較により LL-37 と核酸の結合親和性について検討した. LL-37 の混和量を増やすにしたがって電気泳動で移動する核酸が減少することが明らかとなった(図 9).

6. LL-37 による核酸の細胞内導入能力と経路

RT7 に蛍光標識した核酸の単独添加あるいは LL-37 と蛍光標識した核酸の複合体を添加することで蛍光される細胞について Flow cytometry にて検討した. 核酸の単独添加と比較して、核酸/LL-37 複合体添加では蛍光される細胞が増加することが明らかとなった(図 10-A). また、dsDNA と比較して dsRNA の方が蛍光される細胞が多く認められた(図 10-A). さらに、その細胞を蛍光顕微鏡にて観察したところ、核酸単独添加と比較して核酸/LL-37 複合体添加により蛍光される細胞が多く観察された (図 10-B).

LL-37 の核酸細胞内導入経路についてエンドサイトーシスに着目した. エンドサイトーシスは大きく分けてファゴサイトーシスとピノサイトーシスに分類される. ファゴサイトーシスは好中球やマクロファージなどの貪食細胞にみられる特異的な機構である. 一方、ピノサイトーシスはすべての細胞に見られ、栄養取り込みや Cell signaling などの役割がある²¹⁾. RT7 をピノサイトーシス

各種阻害剤にて前処理を行い、蛍光標識した LL-37 を添加することで蛍光される細胞について Flow cytometry にて検討した。クラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤およびカベオラ依存型エンドサイトーシス阻害剤を使用した際に蛍光される細胞数の減少を認めた(図 11)。

7. LL-37 誘導性炎症応答と細胞内受容体の関与

我々は以前の研究で細胞内受容体 RIG-I が RT7 の細胞質内に発現しており、Transfection reagent を用いて細胞内に導入した核酸を RIG-I が認識することで口腔粘膜細胞の炎症応答が活性化されることを報告している¹⁵⁾。

RT7 に発現している RIG-I と LL-37 によって細胞内に導入された核酸による炎症応答との関連について検討した。RIG-I に特異的な siRNA による RT7 の RIG-I ノックダウン細胞を作製した。まず、RIG-I siRNA による RIG-I ノックダウンの確認を行った(図 12-A)。次に RIG-I ノックダウン細胞を用いて核酸/LL-37 誘導性の CXCL10 の発現誘導に対する影響を検討した。その結果、RIG-I ノックダウン細胞ではコントロール細胞と比較して核酸/LL-37 誘導性の CXCL10 の発現誘導が抑制された(図 12-B)。

また、RIG-I ノックダウンによる dsRNA/LL-37 誘導性の NF- κ B の活性化に対する影響について検討した結果、RIG-I ノックダウンによって NF- κ B のリン酸化が抑制された(図 13)。

さらに、LL-37 と蛍光標識した核酸の複合体を RT7 に添加し、蛍光免疫染色にて RIG-I を観察したところ、細胞質内での核酸と RIG-I の共局在化を認めた(図 14)。

IV. 考察

壊死した細胞から放出される核酸や蛋白は **Damage-associated molecular patterns (DAMPs)** とよばれ上皮細胞の **Toll like receptor (TLR)** などの受容体を活性化し炎症応答が誘導されることが報告されている^{1,2)}。実際に、皮膚の炎症性疾患組織や、口腔粘膜の炎症性粘膜疾患組織における核酸の存在が示唆され²²⁾、壊死組織から放出された核酸が口腔粘膜における炎症応答の惹起や増悪に関与している可能性が考えられる。本研究では RT7 に対する自己壊死画分の添加により CXCL10 の発現誘導が増加し、自己壊死画分を RNaseIII で処理したものを RT7 に添加することで自己壊死画分単独添加と比較して CXCL10 の発現誘導が減少した。この RNaseIII は dsRNA 特異的分解酵素であり、自己壊死画分中の dsRNA を口腔粘膜上皮細胞が認識することで CXCL10 の発現誘導を増加させていることを示唆している。これらのことから、自己壊死により放出される核酸のうち、特に dsRNA が炎症応答に関与していることが考えられた。

人間の生体内に存在する dsRNA としては **microRNA (miRNA)** が知られている。ゲノム DNA に存在する miRNA 遺伝子から RNA ポリメラーゼ II によって ssRNA に転写されると、配列内で相補的な部分は内在的に結合することでヘアピンループ構造を有した数百～数千塩基長をもつ dsRNA となる。これを **primary miRNA (pri-miRNA)** と呼び、核内の RNaseIII 様酵素である **Drosha** や細胞質内の RNaseIII 様酵素である **Dicer** によって修飾され 20～25 塩基長の **precursor miRNA (pre-miRNA)** を作る^{23,24)}。microRNA は生体内で様々な遺伝子発現の調整を行うことで、様々な皮膚疾患やがんの発生、創傷治癒などに関与していると報告されている²⁵⁻²⁸⁾。また、ミトコンドリア RNA も dsRNA 構

造をとることが知られている²⁹⁾。近年では、ミトコンドリア由来の dsRNA が細胞質内へ移行することで細胞内受容体である MDA5 や RIG-I を介して IFN- β などの抗ウイルス性サイトカインの発現を増加させるという報告がある³⁰⁾。本研究ではこのような dsRNA が壊死した細胞から放出されることで隣接した口腔粘膜上皮細胞の何らかの受容体を活性化し炎症応答を促進している可能性について検討した。

一方、LL-37 は 2 つのロイシンから始まる 37 個のアミノ酸から構成される Cathelicidin 型の抗菌ペプチドとして知られている。正の電荷を帯びたペプチドであるため負に帯電した細菌膜と電氣的に結合し小孔を形成することで膜透過性を上昇させ強い抗菌作用を示すという報告³¹⁾や、LPS と結合することで毒性を中和し抗炎症作用を発揮する³²⁾との報告がある。皮膚領域における上皮細胞の TLR3 などの細胞膜受容体を介して起こる核酸依存性の炎症応答を LL-37 が増長させるとの報告も散見されるが³³⁻³⁵⁾、口腔粘膜における核酸依存性炎症応答の促進との関連は明らかにされていない。本研究で明らかになった LL-37 による核酸依存性の炎症応答促進機構は、唾液中に存在するラクトフェリンやディフェンシンなどの抗菌ペプチド並びに、LL-37 scramble, VIP, ORXB などの分子量や電荷の近いペプチドでは炎症応答の促進は認められなかった。これらの結果は、LL-37 に特異的な炎症誘導機構と考えられ、アミノ酸配列や分子構造の違いによるものと推察された。LL-37 は 12 番目の K (リシン) で bending 構造をとっており、N 末端側と C 末端にそれぞれ α ヘリックス構造を有するペプチドで親水基と疎水基を併せ持つ正の電荷を帯びたペプチドである。LL-37 のフラグメンテーションによって抗菌作用の関係性を検討するための構造解析を行った論文も多く、これらの配列が重要な役割を示すと考えられているが、未だにその結論は出ていない³⁶⁻³⁹⁾。

LL-37 と dsRNA による炎症応答のシグナリング経路を検討する際に使用した BX795 は TBK1 阻害剤として使用されるが、TBK1 は IRF3 経路を介して IFN- β を誘導することが知られている⁴⁰⁾。本研究では示していないが、dsRNA あるいは dsRNA/LL-37 添加による IRF3 のリン酸化についても検討したところ、いずれでも IRF3 のリン酸化は認められたが両者の間に有意な差は認められなかった。一方、Ly294002 は AKT 阻害剤として知られているが、本研究で使用した Poly(I:C) は TLR3 のリガンドであり、TLR3 を介して AKT を活性化することで NF- κ B や IRF3 を誘導する経路が報告されていることから⁴¹⁾、dsRNA/LL-37 添加による炎症応答シグナリング経路には TLR3 が関与している可能性が示唆された。しかしながら、本研究では示していないが、TLR3 特異的な siRNA による TLR3 ノックダウン細胞における dsRNA/LL-37 誘導性の炎症応答に対する影響について検討したところ、RIG-I ノックダウン細胞で見られたような炎症応答の抑制は認められなかった。LL-37 が TLR3 と複合体を形成することで TLR3 への結合頻度を上昇させ炎症応答を増加させるという報告もあるが⁴²⁾、口腔粘膜上皮細胞における dsRNA/LL-37 添加による炎症応答シグナリング経路は TLR3 および RIG-I の両方が関与している可能性があり、主な経路は RIG-I 経路と考えている。

TNF- α は T 細胞、単球、マクロファージなどから分泌される炎症性サイトカインであり、口腔粘膜の炎症に重要な役割を担っている⁴³⁾。TNF- α は主に口腔粘膜の T 細胞浸潤部位に発現していることが報告されている⁴³⁾。さらに、TNF- α は強力な NF- κ B の活性化因子であり⁴⁴⁾、本研究でも dsRNA/LL-37 による CXCL10 の発現誘導を著明に増加させた。TNF- α は様々な経路を介して炎症応答や細胞死に影響を与え⁴⁵⁾、RIG-I などの核酸受容体の発現を調節することも報告されている⁴⁶⁾。我々は以前、TNF- α が口腔粘膜上皮細胞に

における RIG-I の発現を誘導することを発見しており (unpublished data), TNF- α による RIG-I の発現の調整作用が口腔粘膜の dsRNA/LL-37 による炎症誘導をさらに促進する可能性が考えられた。

我々は以前の研究で口腔粘膜細胞にウイルス由来核酸を transfection reagent で導入することによって, 細胞内受容体である RIG-I が核酸を認識し, IFN- β や CXCL10 の発現を誘導することを報告している¹⁵⁾. 本研究における dsRNA/LL-37 による炎症応答でも IFN- β や CXCL10 の発現誘導の増加が認められたことから, 細胞内受容体である RIG-I による認識の関連性に着目した. RIG-I は細胞質内に存在する dsRNA レセプターであり抗ウイルス性の免疫応答に関与していると考えられている^{47,48)}. ここで, LL-37 と dsRNA がエンドサイトーシスによって取り込まれた後, どのようにして RIG-I の存在する細胞質内へと移行するのか疑問が生じる. 前述したように LL-37 は細菌の細胞膜に小孔を形成する能力を有しており, 直接上皮細胞の細胞膜に小孔を形成して核酸を細胞内に導入している可能性も考えられるが本研究の予備実験において上皮細胞に対する細胞傷害性は認められていない. 多くの細胞はリン脂質による二重膜で形成された細胞膜に覆われているが, 細菌は原核細胞であり細胞膜の主なリン脂質はホスファチジルエタノールアミンであるのに対して, 人間は真核細胞であり細胞膜の主なリン脂質はホスファチジルコリンであるという違いがある⁴⁹⁾. この違いは細菌の細胞膜との安定性の差が生じ上皮細胞に対する LL-37 による細胞毒性の違いに関連することが考えられる. 一方で, ある化学物質や蛋白がエンドソーム内から細胞質内へ様々な方法を介して移行するという報告があり, その一つの方法としてエンドソーム膜に対する小孔形成機構が挙げられている⁵⁰⁾. LL-37 はもともと細菌の細胞膜に対する小孔形成能力を有するペプチドであることから, 細胞膜からエンドソーム膜を形成する際に膜の安定

性が低下し LL-37 の小孔形成能を発揮することで核酸を細胞内に導入している可能性が考えられる。細胞質内での核酸と RIG-I の共局在化では凝集しているような像が観察されることから、エンドソーム内の核酸ではなく細胞質内へ移行した dsRNA は細胞内受容体である RIG-I と結合し、同時にそれらの dsRNA が LL-37 を介して結合することで凝集した像を呈している可能性を考えている。

口腔粘膜疾患では様々な慢性炎症や細菌感染、放射線治療などにより上皮細胞の壊死を伴っており⁵¹⁻⁵³、その組織から放出される DAMPs は周囲の上皮細胞の受容体を活性化し炎症応答を促進していると言われている^{54,55}。また、そういった慢性炎症組織や細菌感染のある組織中には LL-37 の発現が増加しており、上皮組織における防御機構として機能していると考えられている^{56,57}。これらのことから様々な難治性口腔粘膜疾患には細菌やウイルス感染による慢性的な炎症応答だけでなく、細胞死を伴った壊死組織から放出される自己核酸と LL-37 による炎症応答が関与している可能性が考えられる。口腔粘膜における慢性的な炎症性疾患の一つとして口腔扁平苔癬が知られ、その難治性から様々な研究⁵⁸⁻⁶⁰がなされてきたが、その発生機序や病因については未だ不明な点が多い。ある研究では口腔扁平苔癬の上皮組織中に Th1 細胞活性化因子である CXCL10 の発現の増加を報告しているが^{61,62}、これは口腔扁平苔癬の病理組織学的特徴である上皮直下の帯状リンパ球浸潤と矛盾しない。また、口腔扁平苔癬組織における NF- κ B の発現の増加についての報告もある^{63,64}。本研究でも dsRNA/LL-37 による炎症応答によって NF- κ B の活性化や CXCL10 の発現の増加を確認していると同時に、口腔扁平苔癬患者の上皮組織中に LL-37 の発現の増加を発見している。これらの結果は、口腔扁平苔癬をはじめとする様々な口腔粘膜の炎症性疾患の発生や症状の増悪に、LL-37 によ

る核酸依存性の炎症誘導機構が関与している可能性を示唆している。

今回の結果より以下のことが明らかとなった。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。

これらの結果から、口腔粘膜上皮細胞の自己壊死などで放出される核酸の認識による炎症応答を抗菌ペプチド LL-37 が活性化することで、口腔粘膜の炎症応答が促進され、口腔粘膜における炎症性疾患の病態形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

V. 結論

1. RT7 に自己壊死画分を添加することで Th1 細胞活性化因子である 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 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。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。

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、口腔粘膜の炎症を促進することで口腔粘膜の炎症性疾患の病態形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜った広島大学大学院医系科学研究科 生体材料学 加藤 功一教授に深甚なる謝意を表しますとともに，御校閲，御助言賜りました医系科学研究科 口腔生物工学 二川 浩樹教授，医系科学研究科 顎顔面解剖学 寺山 隆司教授，医系科学研究科 粘膜免疫学 飛梅 圭准教授，医系科学研究科 口腔外科学 武知 正晃准教授に深謝いたします。

また，本研究遂行のために御指導頂いた医系科学研究科 公衆口腔保健学 太田 耕司教授を始めとする口腔外科学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に，本研究を陰で支えてくれた両親及び家族に心より感謝いたします。

VII. 参考文献

1. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G.: Decoding cell death signals in inflammation and immunity.: *Cell.*; 140:798-804.(2010)
2. Brentano F, Schorr O, Gay RE, Gay S, Kyburz D.: RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3.: *Arthritis Rheum.*; 52:2656-65.(2005)
3. Allam R, Lichtnekert J, Moll AG, Taubitz A, Vielhauer V, Anders HJ.: Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells.: *J Am Soc Nephrol.*; 20:1986-96.(2009)
4. Fukui A, Ohta K, Nishi H, Shigeishi H, Tobiume K, Takechi M, Kamata N.: Interleukin-8 and CXCL10 expression in oral keratinocytes and fibroblasts via Toll-like receptors.: *Microbiol Immunol.*; 57:198-206.(2013)
5. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L.: A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide.: *Cell Immunol.*; 280:22-35.(2012)
6. Khurshid Z, Naseem M, Yahya I Asiri F, Mali M, Sannam Khan R, Sahibzada HA, Zafar MS, Faraz Moin S, Khan E.: Significance and Diagnostic Role of Antimicrobial Cathelicidins (LL-37) Peptides in Oral Health.: *Biomolecules.*;

7:80(2017)

7. Kusaka S, Nishida A, Takahashi K, Bamba S, Yasui H, Kawahara M, Inatomi O, Sugimoto M, Andoh A.: Expression of human cathelicidin peptide LL-37 in inflammatory bowel disease.: *Clin Exp Immunol.*; 191:96-106.(2018)
8. Kim JE, Kim BJ, Jeong MS, Seo SJ, Kim MN, Hong CK, Ro BI.: Expression and modulation of LL-37 in normal human keratinocytes, HaCaT cells, and inflammatory skin diseases.: *J Korean Med Sci.*; 20:649-54.(2005)
9. Türkoğlu O, Kandiloğlu G, Berdeli A, Emingil G, Atilla G.: Antimicrobial peptide hCAP-18/LL-37 protein and mRNA expressions in different periodontal diseases.: *Oral Dis.*; 17:60-7.(2011)
10. Davidopoulou S, Theodoridis H, Nazer K, Kessopoulou E, Menexes G, Kalfas S.Salivary concentration of the antimicrobial peptide LL-37 in patients with oral lichen planus.: *J Oral Microbiol.*; 6:26156.(2014)
11. Peric M, Koglin S, Kim SM, Morizane S, Besch R, Prinz JC, Ruzicka T, Gallo RL, Schaubert J.: IL-17A enhances vitamin D3-induced expression of cathelicidin antimicrobial peptide in human keratinocytes.: *J Immunol.*; 181:8504-12.(2008)
12. Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, Iwatsuki K, Hata T, Gallo RL.: Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis

enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands.: *J Invest Dermatol.*; 132:135-43.(2012)

13. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stähle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH.: The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders.: *J Biol Chem.*; 272:15258-63.(1997)

14. Yılmaz D, Güncü GN, Könönen E, Barış E, Çağlayan F, Gursoy UK.: Overexpressions of hBD-2, hBD-3, and hCAP18/LL-37 in Gingiva of Diabetics with Periodontitis.: *Immunobiology.*; 220:1219-26.(2015)

15. Ohta K, Fukui A, Shigeishi H, Ishida Y, Nishi H, Tobiume K, Takechi M, Kamata N.: Expression and function of RIG-I in oral keratinocytes and fibroblasts.: *Cell Physiol Biochem.*; 34:1556-65.(2014)

16. Agier J, Różalska S, Wiktorska M, Żelechowska P, Pastwińska J, Brzezińska-Błaszczyk E.: The RLR/NLR expression and pro-inflammatory activity of tissue mast cells are regulated by cathelicidin LL-37 and defensin hBD-2.: *Sci Rep.*; 8:11750.(2018)

17. Fujimoto R, Kamata N, Yokoyama K, Taki M, Tomonari M, Tsutsumi S, Yamanouchi K, Nagayama M.: Establishment of immortalized human oral keratinocytes by gene transfer of a telomerase component.: *J Jpn Oral Muco*

Membr.; 8:1-8.(2002)

18. Lim DM, Wang ML.: Toll-like receptor 3 signaling enables human esophageal epithelial cells to sense endogenous danger signals released by necrotic cells.:
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.; 301:G91-9.(2011)
19. Gorr SU.: Antimicrobial peptides of the oral cavity.: Periodontol 2000.;
51:152-80.(2009)
20. Ohta K, Kajiya M, Zhu T, Nishi H, Mawardi H, Shin J, Elbadawi L, Kamata N,
Komatsuzawa H, Kawai T.: Additive effects of orexin B and vasoactive intestinal
polypeptide on LL-37-mediated antimicrobial activities.: J Neuroimmunol.;
233:37-45.(2011)
21. Doherty GJ, McMahon HT.: Mechanisms of endocytosis.: Annu Rev Biochem.;
78:857-902.(2009)
22. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, Homey B,
Barrat FJ, Zal T, Gilliet M.: Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate
human dendritic cells through TLR7 and TLR8.: J Exp Med.; 206(9):1983-
94.(2009)
23. Ha M, Kim VN.: Regulation of microRNA biogenesis.: Nat Rev Mol Cell Biol.;
15:509-24.(2014)

24. Bushati N, Cohen SM.: microRNA functions.: *Annu Rev Cell Dev Biol.*; 23:175-205.(2007)
25. Sonkoly E, Ståhle M, Pivarcsi A.: MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation.: *Clin Exp Dermatol.*; 33:312-5.(2008)
26. Yang X, Wang J, Guo SL, Fan KJ, Li J, Wang YL, Teng Y, Yang X.: miR-21 promotes keratinocyte migration and re-epithelialization during wound healing.: *Int J Biol Sci.*; 7:685-90.(2011)
27. Sand M, Gambichler T, Sand D, Skrygan M, Altmeyer P, Bechara FG.: MicroRNAs and the skin: Tiny players in the body's largest organ.: *J Dermatol Sci.*; 53:169-75.(2009)
28. Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J.: Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer.: *Cancer Res.*; 68:2094-105.(2008)
29. Young PG, Attardi G.: Characterization of double-stranded RNA from HeLa cell mitochondria.: *Biochem Biophys Res Commun.*; 65:1201-7.(1975)
30. Dhir A, Dhir S, Borowski LS, Jimenez L, Teitell M, Rötig A, Crow YJ, Rice GI, Duffy D, Tamby C, Nojima T, Munnich A, Schiff M, de Almeida CR, Rehwinkel J, Dziembowski A, Szczesny RJ, Proudfoot NJ.: Mitochondrial double-stranded RNA

triggers antiviral signalling in humans.: *Nature.*; 560:238-242.(2018)

31. Xhindoli D, Pacor S, Benincasa M, Scocchi M, Gennaro R, Tossi A.: The human cathelicidin LL-37--A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator.: *Biochim Biophys.*; 1858:546-66.(2016)
32. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE.: Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37.: *J Immunol.*; 176:2455-64.(2006)
33. Takahashi T, Kulkarni NN, Lee EY, Zhang LJ, Wong GCL, Gallo RL.: Cathelicidin promotes inflammation by enabling binding of self-RNA to cell surface scavenger receptors.: *Sci Rep.*; 8:4032.(2018)
34. Lai Y, Adhikarakunnathu S, Bhardwaj K, Ranjith-Kumar CT, Wen Y, Jordan JL, Wu LH, Dragnea B, San Mateo L, Kao CC.: LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs.: *PLoS One.*; 6(10):e26632.(2011)
35. T Takiguchi, S Morizane, T Yamamoto, A Kajita, K Ikeda, K Iwatsuki.: Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 augments IFN-beta expression and antiviral activity induced by double-stranded RNA in keratinocytes.: *Br J Dermatol.*; 171:492-498.(2014)

36. Porcelli F, Verardi R, Shi L, Henzler-Wildman KA, Ramamoorthy A, Veglia G.: NMR structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles.: *Biochemistry.*; 47:5565-72.(2008)
37. Ciornei CD, Sigurdardóttir T, Schmidtchen A, Bodelsson M.: Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37.: *Antimicrob Agents Chemother.*; 49:2845-50.(2005)
38. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B.: Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37.: *J Biol Chem.*; 273:3718-24.(1998)
39. Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A.: LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides.: *Biochim Biophys Acta.*; 1758:1408-25.(2006)
40. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T.: IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway.: *Nat Immunol.*; 4:491-6.(2003)
41. Zhao J, Benakanakere MR, Hosur KB, Galicia JC, Martin M, Kinane DF.: Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates TLR3 induced cytokines in human oral keratinocytes.: *Mol Immunol.*; 48:294-304.(2010)

42. Lee EY, Takahashi T, Curk T, Dobnikar J, Gallo RL, Wong GCL.: Crystallinity of Double-Stranded RNA-Antimicrobial Peptide Complexes Modulates Toll-Like Receptor 3-Mediated Inflammation.: ACS Nano.; 11:12145-12155.(2017)
43. Taubman MA, Kawai T: Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med.; 12:125-135(2001)
44. Chen F, Castranova V, Shi X: New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. Am J Pathol.; 159: 387-397 (2001)
45. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G.: A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway.: Nat Cell Biol.; 6:97-105.(2004)
46. Imaizumi T, Matsumiya T, Yoshida H, Naraoka T, Uesato R, Ishibashi Y, Ota K, Toh S, Fukuda S, Satoh K.: Tumor-necrosis factor-alpha induces retinoic acid-inducible gene-I in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes.: Immunol Lett.; 122:89-93.(2009)

47. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T.: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.: *Nat Immunol.*; 5:730-7.(2004)
48. Myong S, Cui S, Cornish PV, Kirchhofer A, Gack MU, Jung JU, Hopfner KP, Ha T.: Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA.: *Science.*; 323:1070-4.(2009)
49. Philip LY.: *The Membranes of Cells.*: Third Edition, Academic Press, USA, 27-45.(2016)
50. Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma HJ.: Endosomal escape pathways for delivery of biologicals.: *J Control Release.*; 151:220-8.(2011)
51. van der Velden WJ, Herbers AH, Netea MG, Blijlevens NM.: Mucosal barrier injury, fever and infection in neutropenic patients with cancer: introducing the paradigm febrile mucositis.: *Br J Haematol.*; 167:441-52.(2014)
52. Bui FQ, Johnson L, Roberts J, Hung SC, Lee J, Atanasova KR, Huang PR, Yilmaz Ö, Ojcius DM.: *Fusobacterium nucleatum* infection of gingival epithelial cells leads to NLRP3 inflammasome-dependent secretion of IL-1 β and the danger signals ASC and HMGB1.: *Cell Microbiol.*; 18:970-81.(2016)

53. Al-Ansari S, Zecha JA, Barasch A, de Lange J, Rozema FR, Raber-Durlacher JE.: Oral Mucositis Induced By Anticancer Therapies.: *Curr Oral Health Rep.*; 2:202-211.(2015)
54. Yilmaz Ö, Lee KL.: The inflammasome and danger molecule signaling: at the crossroads of inflammation and pathogen persistence in the oral cavity.: *Periodontol 2000.*; 69:83-95.(2015)
55. Sahingur SE, Yeudall WA.: Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer.: *Front Immunol.*; 6:214.(2015)
56. Dale BA.: Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease.: *Periodontol 2000.*; 30:70-8.(2002)
57. Doss M, White MR, Teclé T, Hartshorn KL.: Human defensins and LL-37 in mucosal immunity.: *J Leukoc Biol.*; 87:79-92.(2010)
58. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M.: The pathogenesis of oral lichen planus.: *Crit Rev Oral Biol Med.*; 13:350-365.(2002)
59. Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A.: Pathogenesis of oral lichen planus--a review.: *J Oral Pathol Med.*; 39:729-34.(2010)

60. Cheng YS, Gould A, Kurago Z, Fantasia J, Muller S.: Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology.: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.*; 122:332-54.(2016)
61. Iijima W, Ohtani H, Nakayama T, Sugawara Y, Sato E, Nagura H, Yoshie O, Sasano T.: Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism.: *Am J Pathol.*; 163:261-8.(2003)
62. Ichimura M, Hiratsuka K, Ogura N, Utsunomiya T, Sakamaki H, Kondoh T, Abiko Y, Otake S, Yamamoto M.: Expression profile of chemokines and chemokine receptors in epithelial cell layers of oral lichen planus.: *J Oral Pathol Med.*; 35:167-74.(2006)
63. Santoro A, Majorana A, Bardellini E, Festa S, Sapelli P, Facchetti F.: NF-kappaB expression in oral and cutaneous lichen planus.: *J Pathol.*; 201:466-72.(2003)
64. Zhou G, Xia K, Du GF, Chen XM, Xu XY, Lu R, Zhou HM.: Activation of nuclear factor-kappa B correlates with tumor necrosis factor-alpha in oral lichen planus: a clinicopathologic study in atrophic-erosive and reticular form.: *J Oral Pathol Med.*; 38:559-64.(2009)

VIII. 付図説明

図 1. 自己壊死画分および LL-37 を添加した際の CXCL10 mRNA の発現誘導

RT7 に自己壊死画分 (200 μ L/mL) あるいは LL-37 (1 μ g/mL) を単独添加あるいは同時添加し、12 時間後に採取した細胞から RNA を抽出し Real-Time RT-PCR 法にて検討した。RNaseIII の添加では予め自己壊死画分と 30 分間反応させた。

図 2. 様々な核酸と LL-37 による CXCL10 mRNA の発現誘導に対する影響

RT7 に各種核酸 (1 μ g/mL) を単独添加あるいは LL-37 (1 μ g/mL) と同時添加し、12 時間後に採取した細胞から RNA を抽出し Real-Time RT-PCR 法にて検討した。

図 3. dsRNA 誘導性の様々な炎症応答に対する LL-37 の影響

RT7 に Poly(I:C) (1 μ g/mL) を単独添加あるいは LL-37 (1 μ g/mL) と同時添加し、12 時間後に採取した細胞から RNA を抽出し Real-Time RT-PCR 法にて検討した。

図 4. LL-37 以外のペプチドの dsRNA 誘導性 CXCL10 mRNA の発現誘導に対する影響

RT7 に Poly(I:C) (1 μ g/mL) と LL-37 以外のペプチド (1 μ g/mL) も単独添加あるいは同時添加し、12 時間後に採取した細胞から RNA を抽出し Real-Time RT-PCR 法にて検討した。

図 5. dsRNA/LL-37 誘導性の CXCL10 mRNA の発現誘導に対する各種炎症性シグナリング経路阻害剤の影響

RT7 において NF- κ B 阻害剤, AKT 阻害剤, JAK/STAT 阻害剤 (10 μ M) にて 30 分前に前処理し, Poly(I:C) (1 μ g/mL) を単独添加あるいは LL-37 (1 μ g/mL) と同時添加し, 12 時間後に採取した細胞から RNA を抽出し Real-Time RT-PCR 法にて検討した.

図 6. dsRNA 誘導性の NF- κ B のリン酸化に対する LL-37 の影響

RT7 に Poly(I:C) (1 μ g/mL) を単独添加あるいは LL-37 (1 μ g/mL) と同時添加し, 0, 0.5, 1, 2, 4 時間後の蛋白を抽出し, NF- κ B のリン酸化に対する影響を Western blotting 法にて検討した.

図 7. dsRNA/LL-37 誘導性の CXCL10 mRNA の発現誘導に対する TNF- α の影響

TNF- α (10ng/mL) の存在下に, RT7 に Poly(I:C) (1 μ g/mL) を単独添加あるいは LL-37 (1 μ g/mL) と同時添加し, 12 時間後に採取した細胞から RNA を抽出し Real-Time RT-PCR 法にて検討した.

図 8. Binding assay による LL-37 と核酸の結合親和性の検討

核酸と結合親和性をもつ Plate に核酸 (1 μ g/mL) を結合させたものと結合させていないものを用意し, そこに biotin-labeled LL-37 (2 μ g/mL) を反応させた後, streptavidin-HRP 溶液 100 μ L 反応させ, 基質発色溶液 100 μ L にて発光させた. 検出にはプレートリーダーを用い, 450nm の波長にて検出を行った.

図 9. 電気泳動による LL-37 と核酸の結合親和性の検討

核酸を 5 μ g/mL, LL-37 を 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 μ g/mL の濃度で 30 分間反応させたものを 100ng/mL ethidium bromide を含む 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い, Printgraph ゲルイメージングシステムにより記録した.

図 10. LL-37 による核酸の細胞内導入能力の検討

A) RT7 に蛍光標識した核酸 (1 μ g/mL) を単独添加あるいは, LL-37 (1 μ g/mL) との複合体を添加し, 蛍光される細胞について Flow cytometry にて検討した.

B) A)で蛍光した細胞を蛍光顕微鏡にて観察した.

図 11. LL-37 による核酸の細胞内導入経路の検討

RT7 において各種エンドサイトーシス阻害剤 (20 μ M) にて 30 分前に前処理し, 蛍光標識した LL-37 (1 μ g/mL) を添加し, 蛍光される細胞について Flow cytometry にて検討した.

図 12. dsRNA/LL-37 誘導性の CXCL10 mRNA の発現誘導に対する RIG-I ノックダウンの影響

A) RIG-I siRNA (90pmol) を Lipofectamin 法により 48 時間トランスフェクションを行い, 採取した細胞から RNA を抽出し Real-Time RT-PCR 法にて RIG-I ノックダウン細胞の作製を検討した.

B) Control siRNA, RIG-I siRNA (各 90pmol) を Lipofectamin 法により 48 時間トランスフェクションを行った後, 核酸 (1 μ g/mL) を単独添加あるいは, LL-37 (1 μ g/mL) との複合体を添加し, 12 時間後に採取した細胞から RNA を抽出し Real-Time RT-PCR 法にて CXCL10 mRNA の発現誘導について検討した.

図 13. dsRNA/LL-37 誘導性の NF- κ B のリン酸化に対する RIG-I ノックダウンの影響

Control siRNA, RIG-I siRNA (各 90pmol) を Lipofectamin 法により 48 時間トランスフェクションを行った後, 核酸 (1 μ g/mL) を単独添加あるいは, LL-37 (1 μ g/mL) との複合体を添加し, 4 時間後の細胞から蛋白を抽出し, NF- κ B のリン酸化に対する影響を Western blotting 法にて検討した.

図 14. 細胞質内における核酸と RIG-I の共局在化

RT7 に蛍光標識した核酸 (1 μ g/mL) と LL-37 (1 μ g/mL) の複合体を添加し, 3 時間後の RIG-I の局在を細胞蛍光免疫染色にて検討した.

IX. 表および図

表 1. Primer の塩基配列

Target mRNA	Primer sequences
CXCL1	5'-GTG TGA ACG TGA AGT CCC CC-3'
	5'-GCT GCA GAA ATC AGG AAG GC-3'
CXCL8	5'-TAG CAA AAT TGA GGC CAA GG-3'
	5'-AAA CCA AGG CAC AGT GGA AC-3'
CXCL9	5'-CAT GCT GGT GAG CCA AGC AGT TTG AA-3'
	5'-CAC TTC TGT GGG GTG TTG GGG ACA AG-3'
CXCL10	5'-TGC AAG CCA ATT TTG TCC ACG TG-3'
	5'-GCA GCT GAT TTG GTG ACC ATC AT-3'
CCL20	5'-TAC TCC ACC TCT GCG GCG AAT CAG AA-3'
	5'-GTG AAA CCT CCA ACC CCA GCA AGG TT-3'
IFN- β	5'-AAA CTC ATG AGC AGT CTG CA-3'
	5'-AGG AGA TCT TCA GTT TCG GAG G-3'
IL-1 β	5'-CAG CCA ATC TTC ATT GCT CA-3'
	5'-GCA TCT TCC TCA GCT TGT CC-3'
RIG-I	5'-GCA TAT TGA CTG GAC GTG GCA-3'
	5'-GTG CAA TGT CAA TGC CTT CAT CAG-3'
G3PDH	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
	5'-CAG CCC CAG CGT CGT CAA AGG TG-3'

表 2. siRNA の塩基配列

Target mRNA	Primer sequences
siRIG-I sense	UUU ACA GCG GGA CUU GCC AUA UCU C
siRIG-I antisense	GAG AUA UGG CAA GUC CCG CUG UAA A

☒ 1

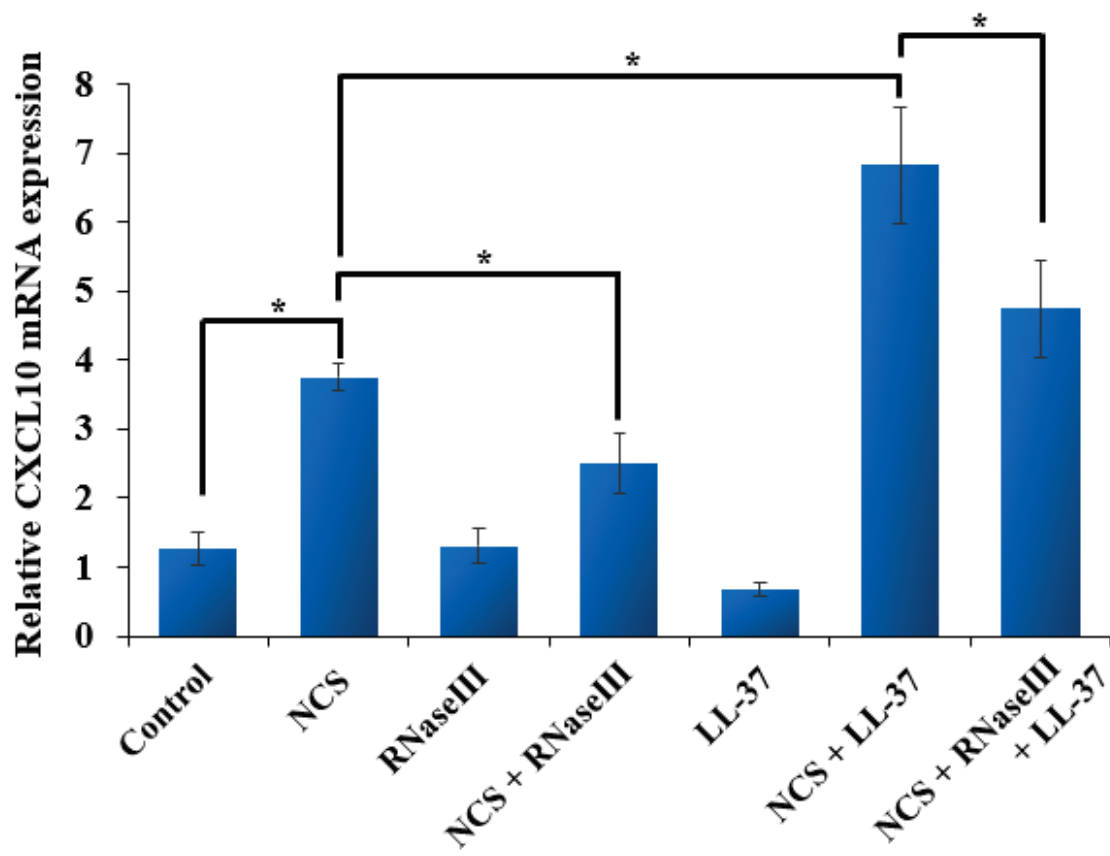
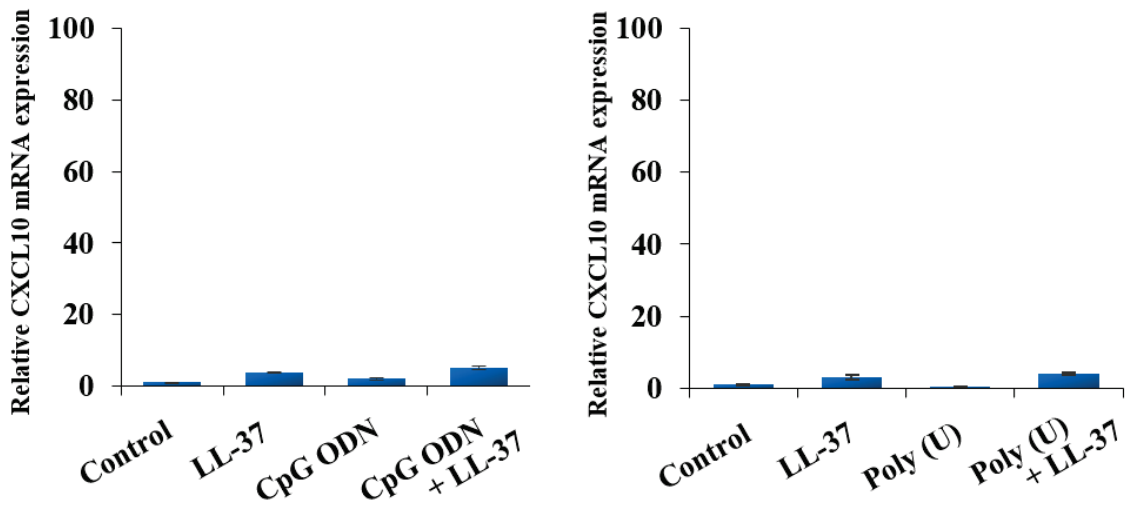
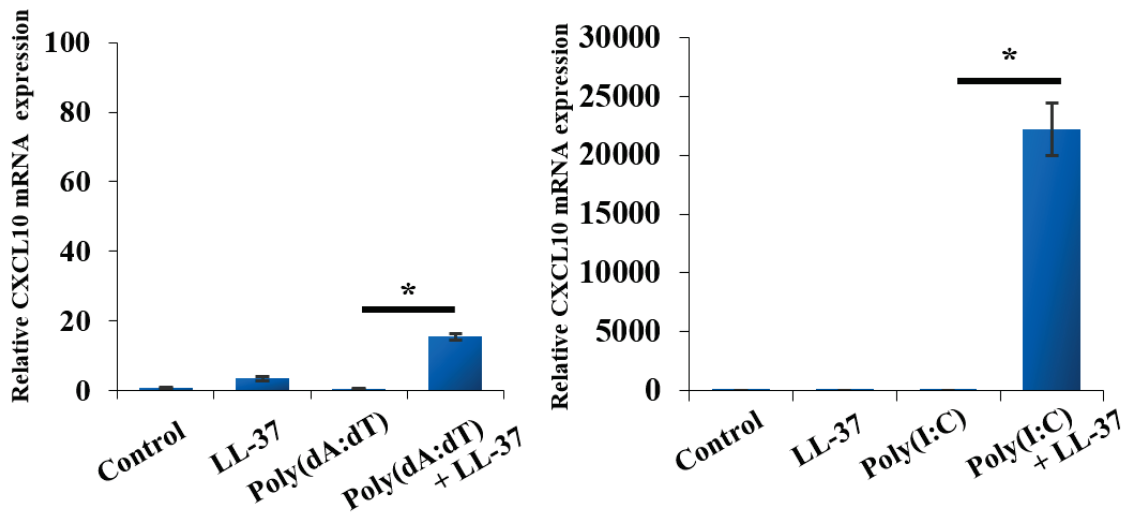


Figure 2

A)

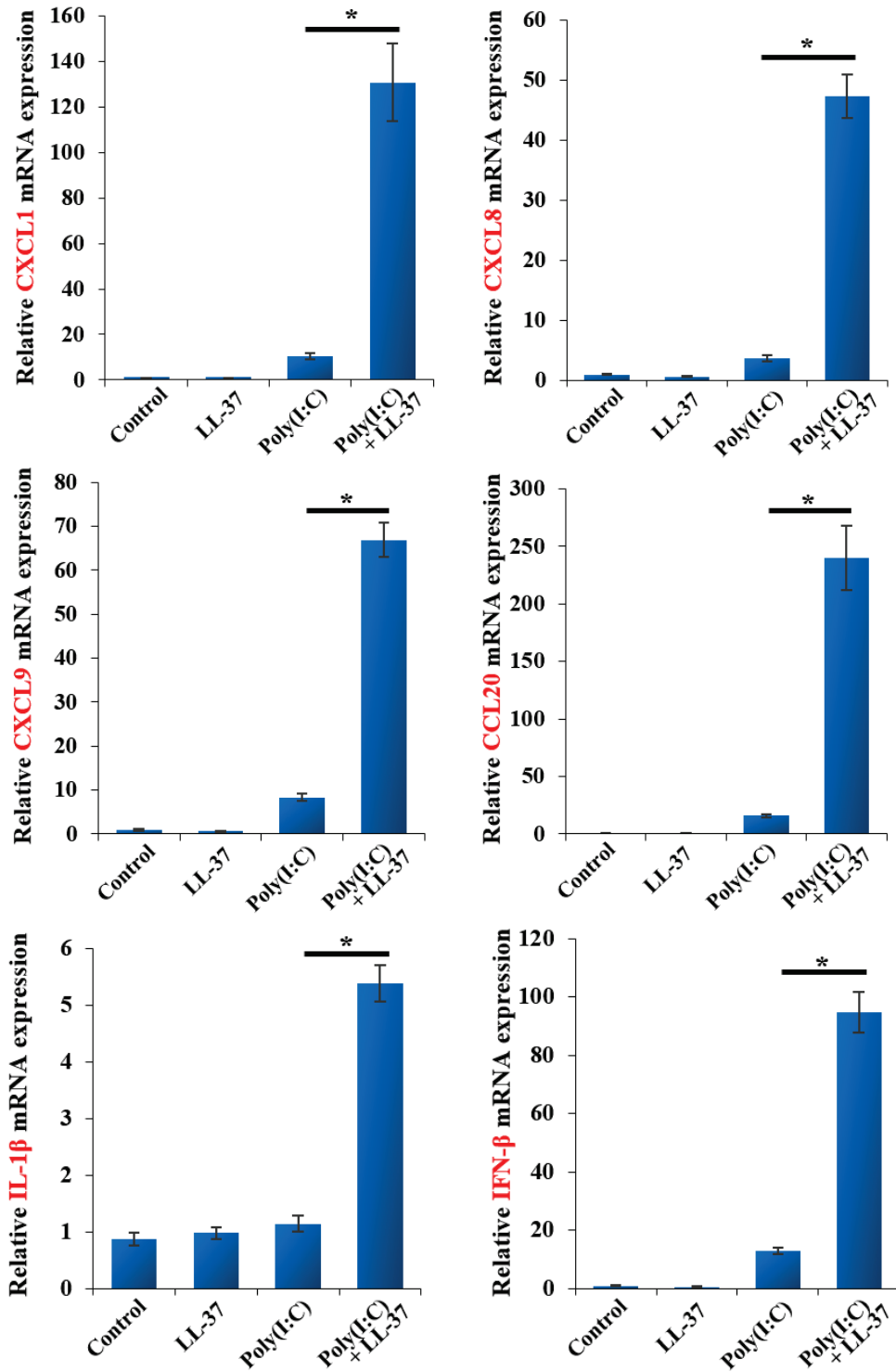


B)



* $p < 0.01$; Significantly different from control cell.

3



* $p < 0.01$; Significantly different from control cell.

Figure 4

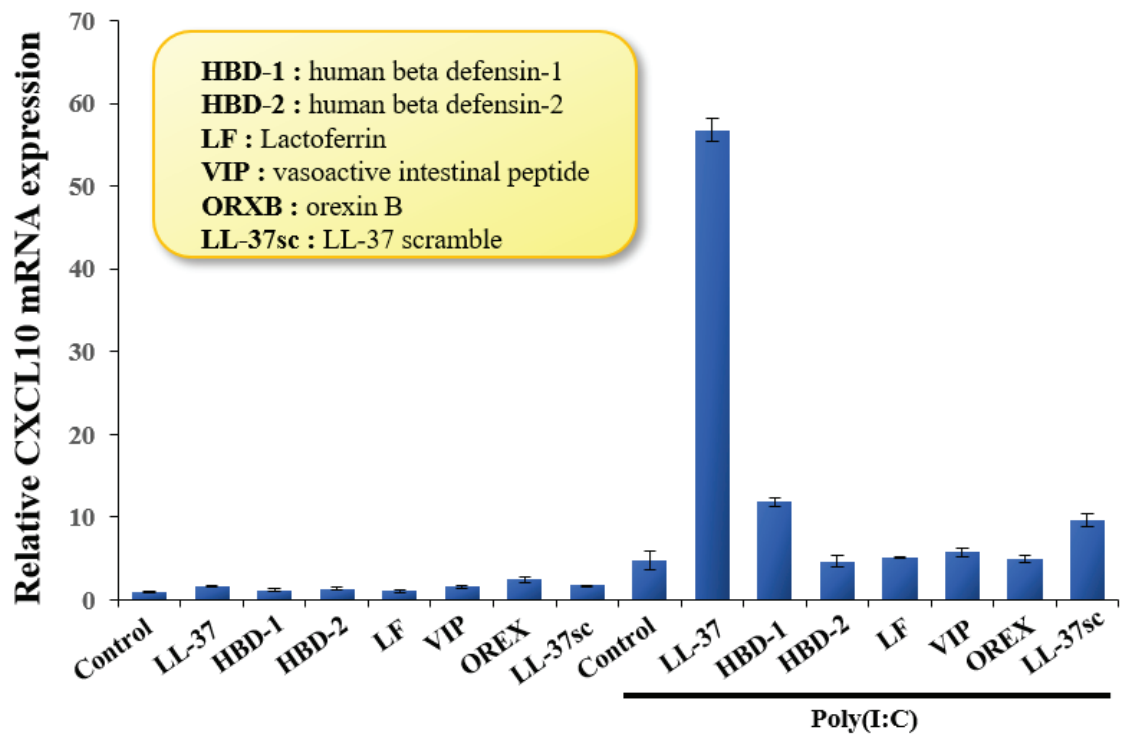


Figure 5

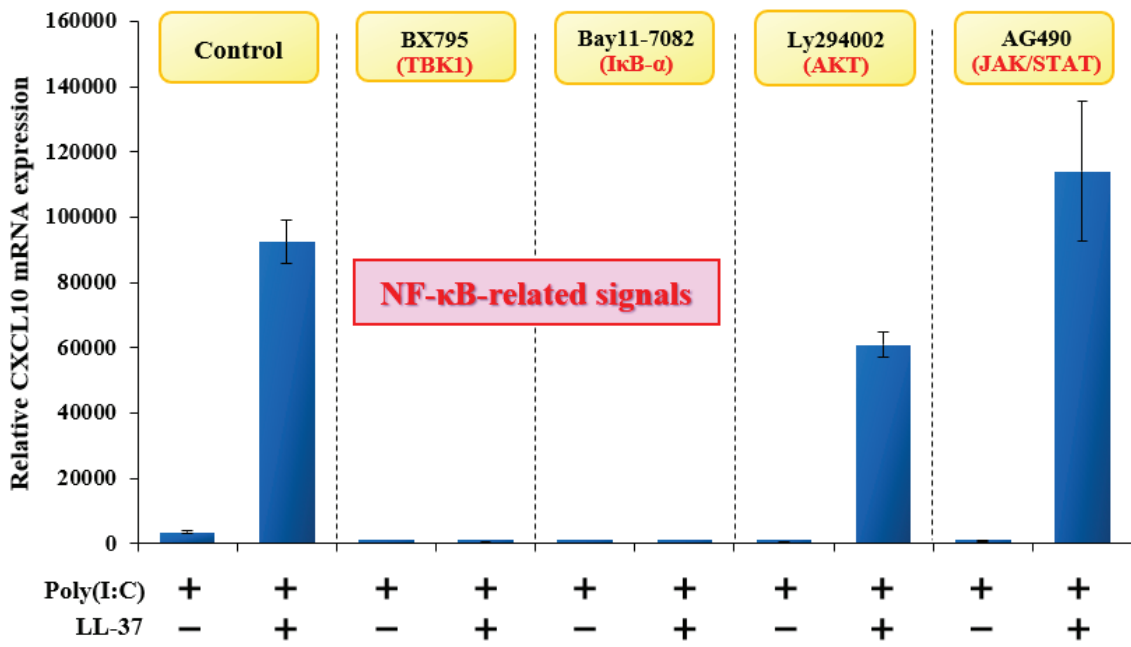
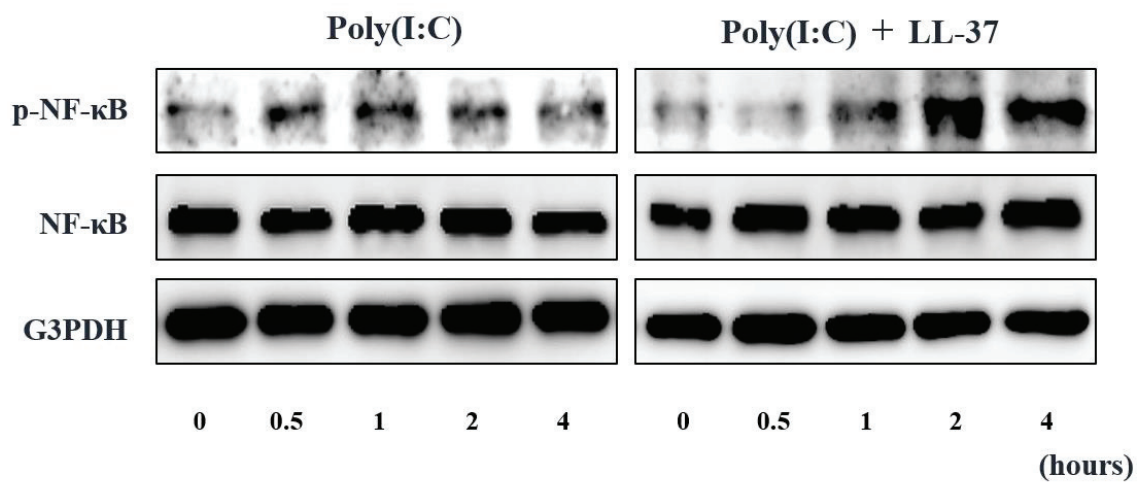
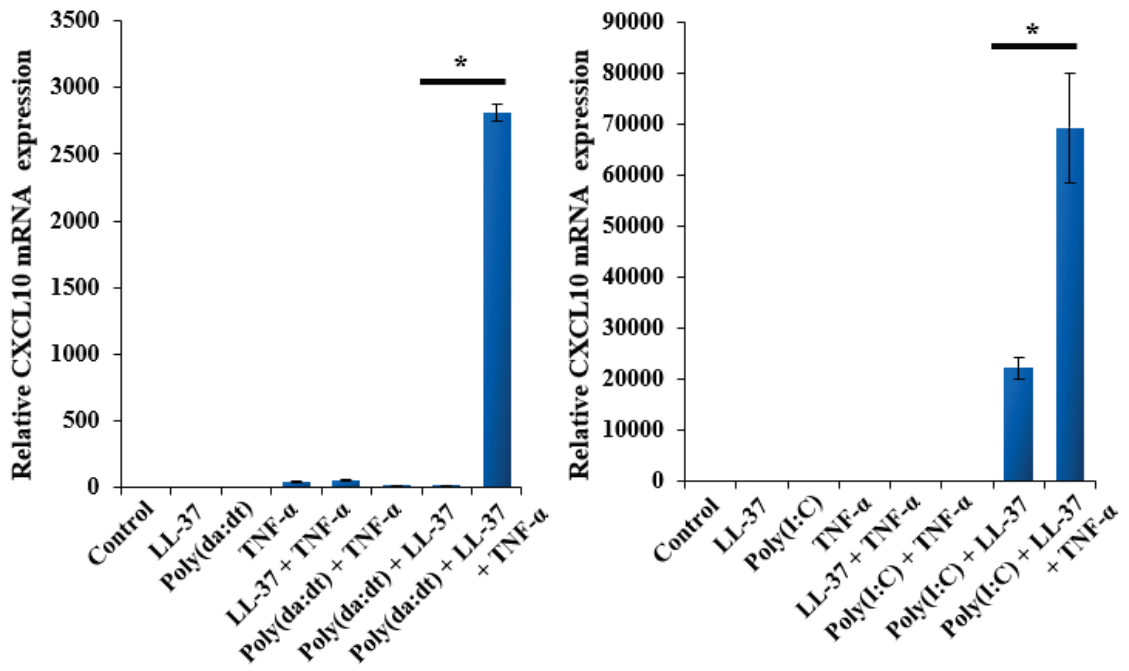


图 6

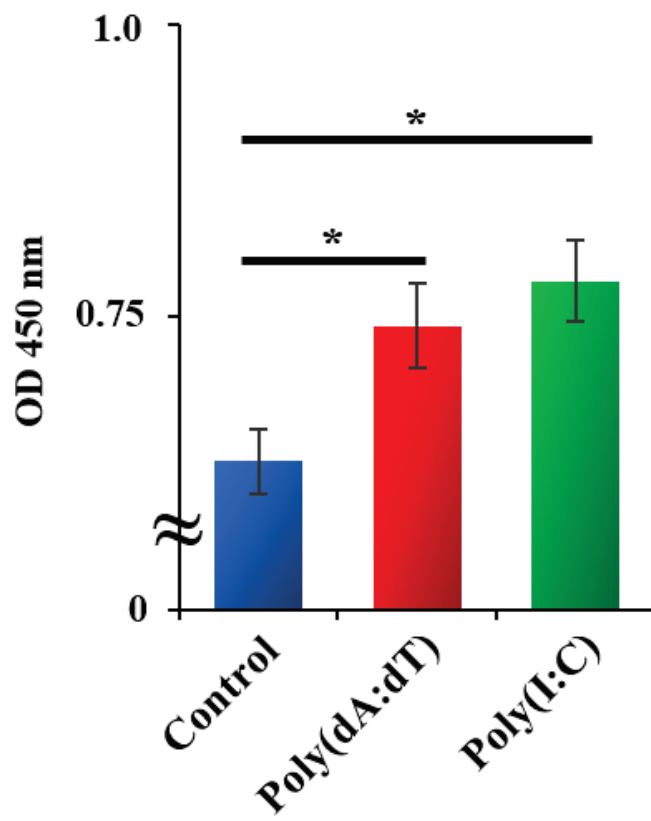


7



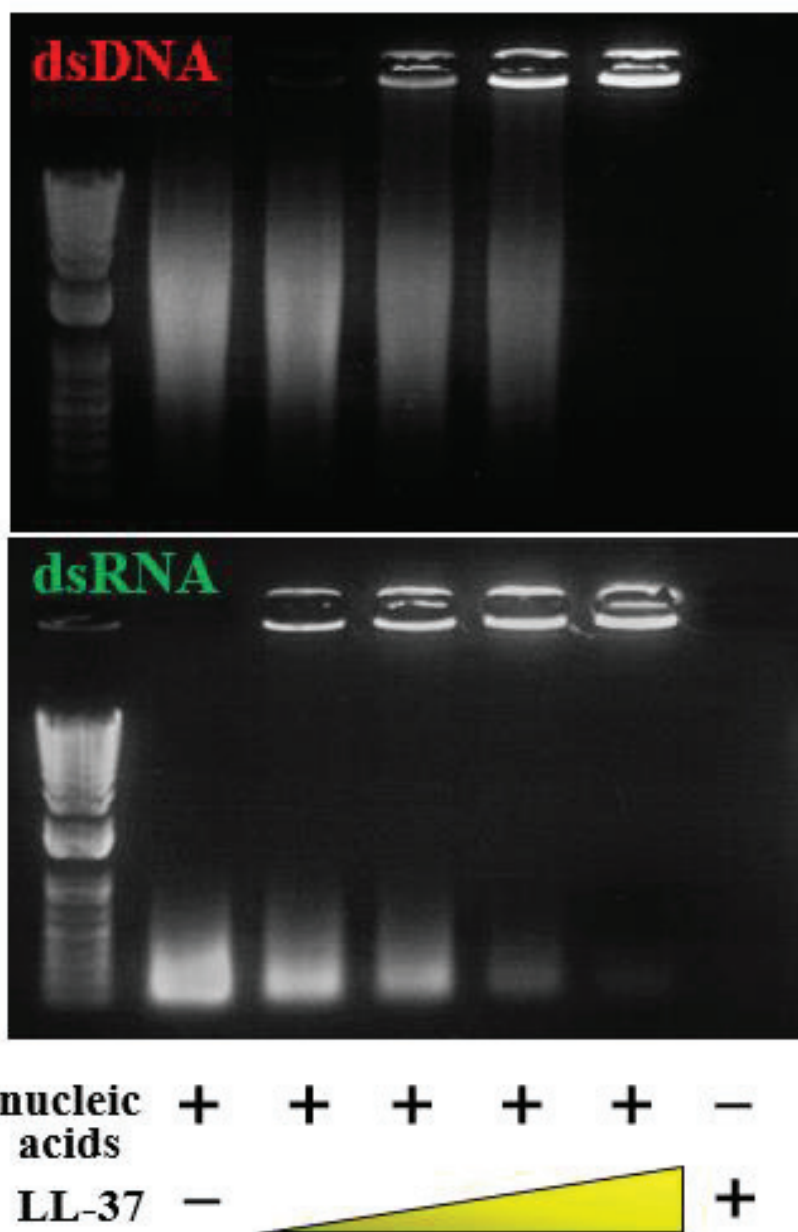
* $p < 0.01$; Significantly different from control cell.

图 8



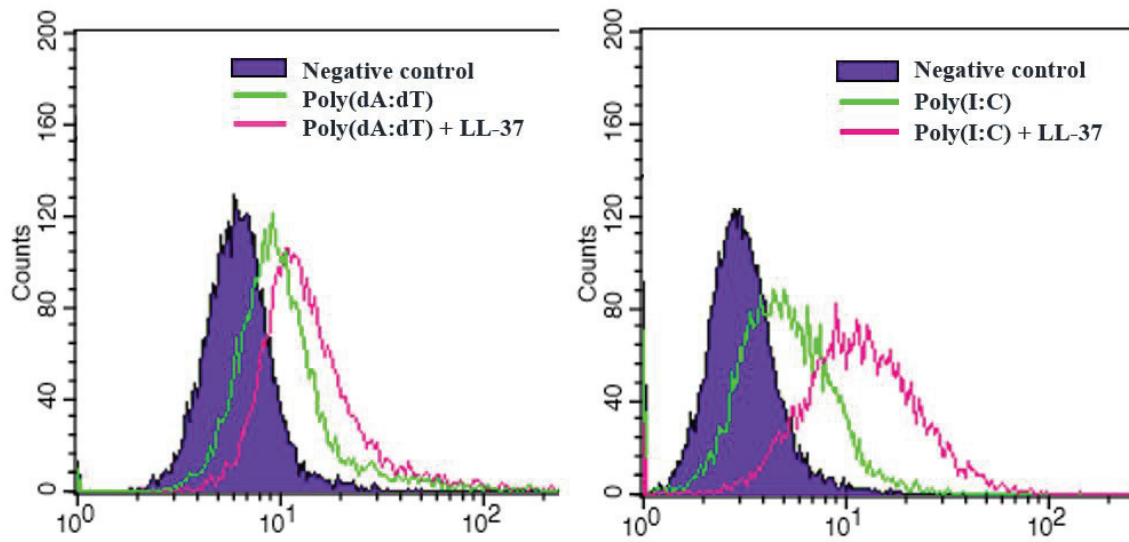
* $p < 0.05$; Significantly different from control cell.

图 9

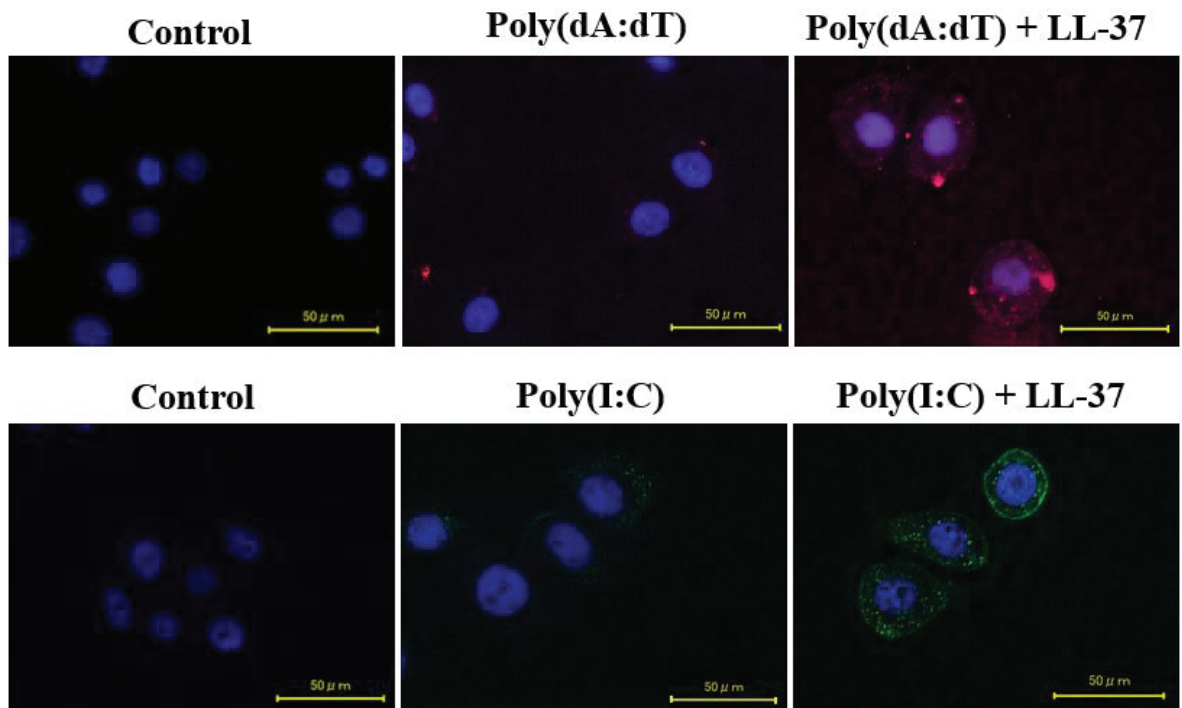


☒ 10

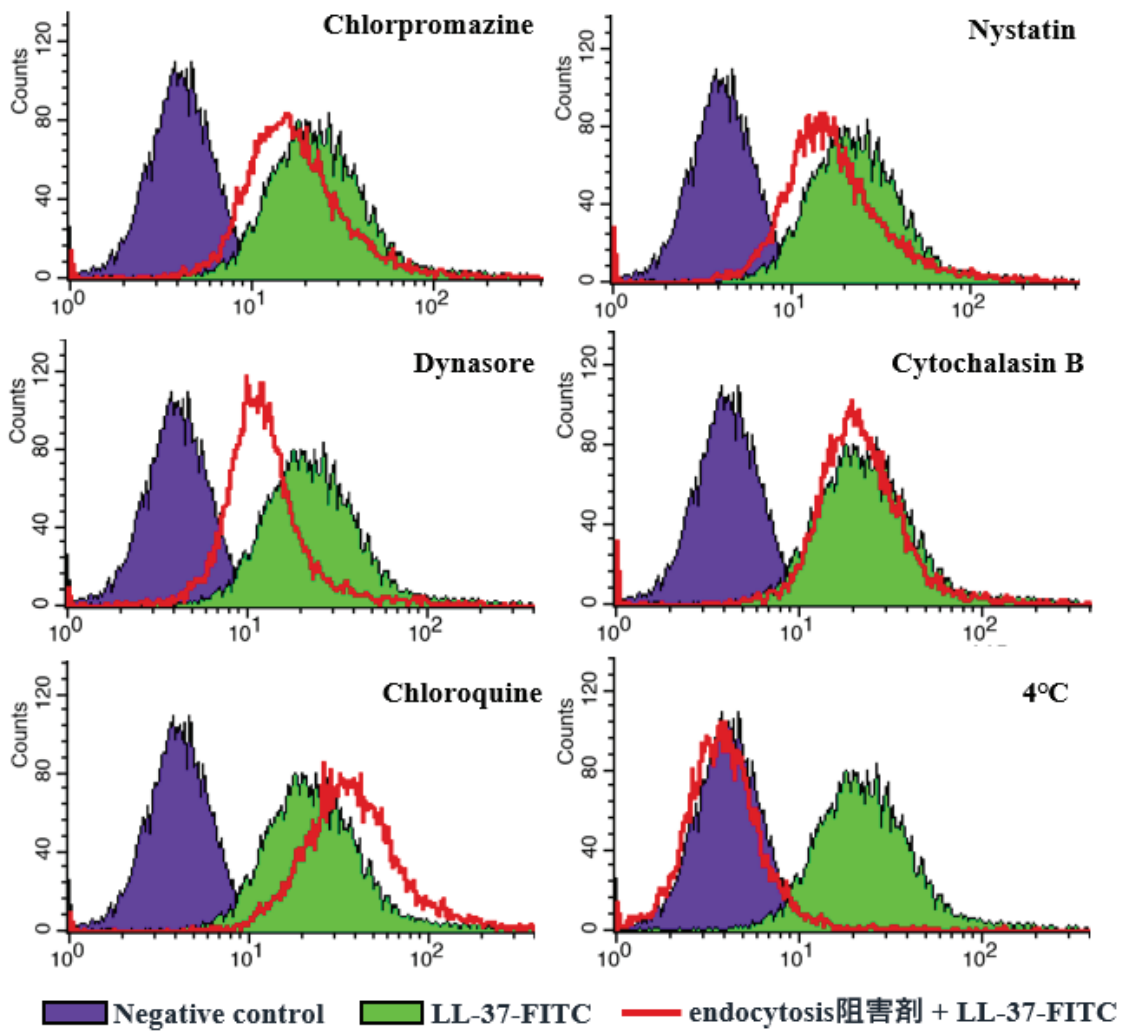
A)



B)

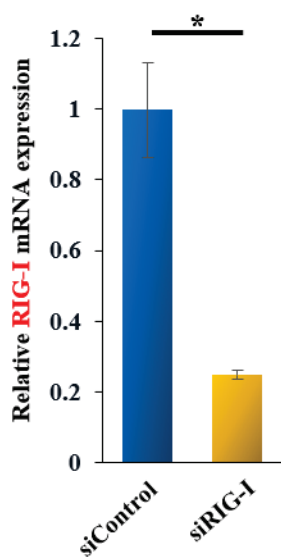


☒ 11

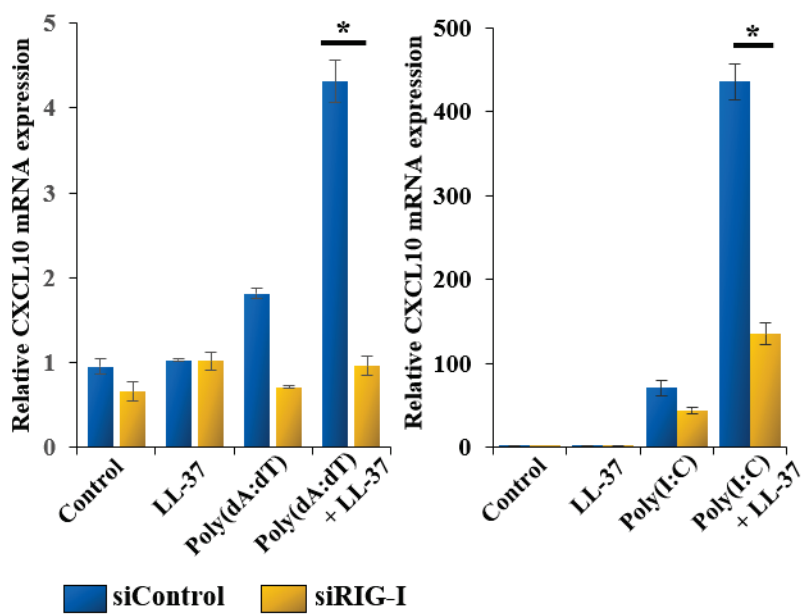


☒ 12

A)



B)



* $p < 0.01$; Significantly different from control cell.

☒ 13

