

Title	mRNA Expression and Localization of LPS-induced defensin Isoforms in Rat Salivary Glands
Author(s)	四宮, 敬史
Journal	歯科学報, 115(2): 156-157
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3565">http://hdl.handle.net/10130/3565</a>
Right	

氏名(本籍)	しの 四 宮 敬 史 (兵庫県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1720号(甲第1003号)
学位授与の日付	平成19年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	mRNA Expression and Localization of LPS-induced $\beta$ -defensin Isoforms in Rat Salivary Glands
掲載雑誌名	The Bulletin of Tokyo Dental College 第55巻 3号 139-147頁 2014年8月
論文審査委員	(主査) 川口 充教授 (副査) 木崎 治俊教授 水口 清教授 山根 源之教授 一戸 達也教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

$\beta$ ディフェンシンは、分子量が3~4kDa、抗菌作用および抗炎症作用を有するカチオンペプチドである。初期の研究ではこのペプチドは好中球で産生されると考えられていたが、近年になり脳、気管、食道、膵臓、小腸などの臓器組織でも産生されることが明らかにされた。唾液および唾液腺と $\beta$ ディフェンシン1および $\beta$ ディフェンシン2/3との関係について述べた報告は、数編のものが散見されるが、いずれも唾液腺の組織全体におけるmRNA発現あるいはその量的変動を調べることとどまっており、しかも混在する好中球由来の $\beta$ ディフェンシンの影響を完全に排除することができない状態で評価している。この研究では、qRT-PCR、レーザーマイクロダイセクション(LCM)、*in situ* hybridization (ISH)の方法を用いて、ラット唾液腺細胞に $\beta$ ディフェンシン1(RBD-1)、 $\beta$ ディフェンシン2/3(RBD-2/-3)を産生する機構が存在することを明確にし、さらに腺組織の産生能力の違いと管上皮細胞/腺房細胞における局在を明らかにするために実験を行った。

#### 2. 研究方法

動物は生後7週齢の雄性SDラットを用い、麻酔下で耳下腺、顎下腺、舌下腺の摘出あるいはカニューレの挿入を行なった。摘出した各唾液腺およびLCMによって分離した管上皮細胞と腺房細胞のRBD-1、RBD-2/-3 mRNA量の測定はOpticon™2 (MJ Research, MA, USA)によりqRT-PCRを行ない、内部標準のGAPDH  $10^3$ コピー当たりのRBD mRNAのコピー数を求めた。また、LPS刺激によるRBD mRNAの変動を明らかにするために、耳下腺と顎下腺の排泄管にカニューレを挿入し、50 $\mu$ l(2.6 $\mu$ g)を1分間で逆行性に注入し、4時間~24時間後のRBD mRNA量の経時変化を測定した。さらに、ISHによりRBD mRNAの細胞局在を証明した。

#### 3. 研究成績および考察

各唾液腺組織におけるRBD-1およびRBD-2/-3のmRNA量は、耳下腺、顎下腺、舌下腺の順であった。LPSで刺激後のRBD-1およびRBD-2/-3のmRNA量の発現量の経時変化を調べたところ、12時間後に、RBD-1、RBD-2/-3ともに最大値を示した。次に、細胞レベルでRBD-1およびRBD-2/-3の発現量を調べたところ、各唾液腺において両者ともに管上皮細胞の方が腺房細胞よりも1.1~6.9倍の値を示した。また、LPS刺激後のRBD-1およびRBD-2/-3のmRNA量の増加率は腺房細胞では両方とも舌下腺、顎下腺、耳下

腺の順で大きい値を示した。また管上皮細胞でも同様の傾向が認められた。ISHの検索では、多くの管上皮細胞および少数の腺房細胞に陽性のシグナルが認められた。以上の結果から、唾液中に見られるRBDの一部は耳下腺、顎下腺および舌下腺由来であることが示唆された。

#### 4. 結 論

RBD-1およびRBD-2/-3のmRNAは、耳下腺、顎下腺、舌下腺に発現し、特に耳下腺に多いこと、LPSにより各唾液腺の管上皮細胞だけでなく腺房細胞でも増加すること、ISHによる組織化学検索でも両細胞における局在とLPS刺激後のシグナル増強が確かめられたことから、RBD-1、RBD-2/-3は唾液腺の腺房細胞と管上皮細胞で産生されることが明らかにされた。

### 論 文 審 査 の 要 旨

唾液中のβディフェンシンは炎症性細胞、口腔上皮細胞、ケラチノサイトのほかに、唾液腺にも由来することが報告されている。しかしながら、唾液腺に関する報告では、各唾液腺組織における存在量の比較ならびに唾液腺の管上皮および腺房細胞における局在性など詳細なデータは示されていない。この研究では、ラット耳下腺・顎下腺・舌下腺の細菌侵襲に対する固有の防御機構にラットβディフェンシン(RBD)が関与することを明らかにするために、qRT-PCR、レーザーマイクロディセクション(LCM)、*in situ* hybridization (ISH)を用いて各唾液腺組織におけるRBD mRNAの量的な差異、各唾液腺の細胞内RBD mRNA分布量の相違および局在を調べたところ、RBD-1およびRBD-2/-3のmRNAは、耳下腺、顎下腺、舌下腺に発現し、特に耳下腺に多いこと、LPSにより各唾液腺の管上皮細胞だけでなく腺房細胞でも増加すること、ISHによる組織化学検索でも両細胞における局在とLPS刺激後のシグナル増強が確認されたことから、RBD-1、RBD-2/-3は唾液腺の管上皮細胞と腺房細胞で産生されることが明らかにされた。

本審査委員会では、1) LPSの使用量の妥当性、2) 唾液腺におけるRBD増加の生理的意義、3) 耳下腺腺組織と細胞局所でRBD mRNAの増加率が異なる意味、4) LPS刺激で起こる変化が短時間しか続かないことの考察、5) 遺伝子量の個体差、6) LPSを逆行性に注入することの臨床的意義、7) LPSを腺腔側から作用させて生じる炎症反応の発生機序についての質問が行われた。これに対し、1) LPS静脈投与実験例を参考にし、局所量を3通り想定し反応が出る最少量を用いたこと、2) 各唾液腺に細菌侵襲に対する固有の防御機構が推測されること、3) 腺体に含まれる好中球の反応による影響が考えられること、4) カイネティックスによる影響が考えられること、5) ヒトと異なり同じ系統の実験動物では、遺伝子の個体差は少ないことが想定されること、6) 逆行性感染のモデル実験として可能であること、7) LPS反応性受容体であるTLR(Toll-like receptor)が管腔側に分布すると想定されるが詳細は今後の検討を要することが回答された。

本研究で得られた知見は、歯科医学の進歩発展に寄与すること大であり、学位授与に値するものと判定された。