

## 論文の内容の要旨

氏名：五條堀 孝 廣

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Signaling pathways of electrolytically-generated acid functional water in epithelial cells  
(上皮細胞における電解酸性機能水のシグナル伝達経路)

機能水は、「人為的な処理をして再現性のある有用な機能を付与された水溶液の中で、処理と機能に関して科学的根拠が明らかにされたもの、及びされようとしているもの」と定義されており、その安全性あるいは殺菌作用とともに臨床応用の可能性について報告されている。しかし、電解酸性機能水 (FW) の生体に対する直接的な効果に関する報告はほとんどない。そこで、口腔扁平上皮癌細胞株 (OSCC) に FW を作用させ、その遺伝子発現の変化についてマイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、極めて多種類の遺伝子発現が増強していることが明らかとなった。これまでの研究から、human  $\beta$ -defensin 2 (hBD2) に関しては、RNA ウイルスの増殖副産物である double-stranded RNA (dsRNA) が、腸管上皮細胞 (IECs) に表出されている toll-like receptor 3 (TLR3) を介して nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 依存的に hBD2 の遺伝子発現を増強させることが明らかとされている。しかし、OSCC における hBD2 発現誘導の有無とそのメカニズムについては、不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、FW の臨床応用を目指し、抗菌作用や創傷治癒促進作用のある hBD2 に着目し、FW による hBD2 の遺伝子発現誘導に関するシグナル伝達経路を解明することを目的とした。

実験には、培養細胞として、OSCC (HSC3, Ca9-22) を使用し、これを 10% ウシ胎児血清を添加した RPMI 1640 培地によって 37°C, 5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。FW として、pH 2.7, 電気伝導度 3,000  $\mu$ S/cm, 有効塩素濃度 30 ppm としたものを使用した。また、dsRNA として polyinosinic-polycytidylic acid を 0, 1, 10 および 100  $\mu$ g/ml に調整して使用した。HSC3, Ca9-22 における hBD2 の産生に対する FW あるいは dsRNA の経時的および濃度依存的変化についてリアルタイム PCR による検索を行った。

hBD2 の遺伝子発現に関与する転写調節因子についてはルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。ルシフェラーゼアッセイは hBD2 遺伝子の 5'-untranslated region 約 1.2 kb を PCR によって増幅し、pGL4-basic vector に subclonig して用いた。この領域には転写調節因子 NF- $\kappa$ B の結合領域が 2 ヶ所あることから、それぞれの NF- $\kappa$ B 結合部位を欠失させた mutant を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。また、NF- $\kappa$ B の特異的阻害剤である 1-1'-4'-tosyla-mino-phenylethyl-chloromethyl-ketone および isohelenin で HSC3 を前処理し、FW および dsRNA の作用による hBD2 の遺伝子発現を検討した。

OSCC による interleukin 8 (IL-8) の自発的産生に対する影響については、6 穴プレートに  $1 \times 10^6$  個播種した Ca9-22 に FW を 3 分間作用させ、3, 6, 9 および 12 時間後の培養上清を回収し、IL-8 濃度を ELISA 法によって測定した。

OSCC における dsRNA および FW の感知システムの解析のために TLR3 に対する small interfering RNA transfection を行い、hBD2 の遺伝子発現を検討した。

その結果、hBD2 遺伝子発現の変化は dsRNA を HSC3 に 10  $\mu$ g/ml で 3 時間作用させると約 5 倍に、Ca9-22 では 100  $\mu$ g/ml, 1 時間作用させると約 4 倍に増強された。一方、FW を HSC3 に 3 分間作用させると 6 時間後に約 40 倍、Ca9-22 で 3 時間後に約 120 倍の hBD2 遺伝子発現を認め、どちらの細胞においても dsRNA の作用と比較して FW ではより顕著な遺伝子発現の増強が認められた。また、FW による hBD2 のタンパク質発現誘導については免疫蛍光染色で検討したが、タンパク質レベルでも hBD2 の発現の増強が確認された。

ルシフェラーゼアッセイでは dsRNA, FW の作用はともにルシフェラーゼ活性を増強することが確認された。dsRNA によるルシフェラーゼ活性は下流の NF- $\kappa$ B 結合部位を欠失させることによって

完全に消失した。一方、FW においてはいずれの結合部位を欠失させても、ルシフェラーゼ活性に変化は認められなかった。また、特異的阻害剤で前処理することによって FW による hBD2 の遺伝子発現の増強に変化が認められなかったことから、FW による hBD2 の遺伝子発現の増強には NF- $\kappa$ B が関与しないことが確認された。さらに、FW が経時的に NF- $\kappa$ B の活性を抑制することが明らかとなった。ELISA の結果から、FW は作用後 3 時間以降に顕著に IL-8 産生を抑制した。このことから、FW の作用は NF- $\kappa$ B の活性を抑制することによって IL-8 の産生を抑制することが確認された。

さらに、dsRNA および FW 刺激の感知システムに関しては TLR3 遺伝子をノックダウンして実験を行ったが、dsRNA を作用させたものでは hBD2 の遺伝子発現は顕著に減少したのに対して、FW では変化は認められなかった。すなわち、OSCC における dsRNA と FW の認識機構は異なることが明らかとなった。

以上のように、本実験の結果から dsRNA と FW はともに hBD2 の遺伝子発現を増強させたが、両者は異なったシグナル伝達経路をとる可能性が示唆された。