

レチノイン酸はヒト歯肉上皮細胞からの
抗菌ペプチド産生を誘導する

奥羽大学大学院歯学研究科顎顔面口腔矯正学専攻

渡 辺 敦

(指導教員 : 廣 瀬 公 治)

Retinoic Acid Induces Antimicrobial Peptide
from Human Gingival Epithelial Cells

Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,
Ohu University, Graduate School of Dentistry

Atsushi Watanabe

(Director : Kimiharu Hirose)

Abstract

The aim of the present study was to investigate the effects of retinoic acid on gingival epithelial cells using the level of an antimicrobial peptide, an innate immunocompetent factor in human gingival epithelial cells.

The human gingival epithelial cell line Ca9-22 was used. Ca9-22 cells were cultured until a monolayer was formed. After adding all-trans retinoic acid (ATRA) at predetermined concentrations, culturing was continued. When culturing was completed, total RNA was recovered from the cells and reverse transcription performed. LL-37 mRNA expression was determined using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real time PCR assays, with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) utilized as an internal control. LL-37 expression was evaluated by ELISA.

ATRA stimulated LL-37 production and mRNA expressions in Ca9-22 cells as well as the mRNA expressions of retinoic acid receptor (RAR α , β) and

retinoid X receptor (RXR β), ligand-inducing transcription factors present in the nucleus, was simultaneously induced.

These findings indicate that ATRA activates the intraoral innate immune system by promoting mRNA expression and peptide production of LL-37, an antimicrobial peptide, in gingival epithelial cells. Furthermore, these effects of ATRA are induced by acceleration of the expressions of the nuclear receptors RAR and RXR.

抄 録

本研究は、歯肉上皮における自然免疫を担当する要因である抗菌ペプチドを指標として、ヒト歯肉上皮細胞に対するレチノイン酸の影響について検討することを目的とした。

ヒト歯肉上皮細胞として Ca9-22 を用いた。同細胞を単層を形成するまで培養を行った。その後、所定の濃度のオールトランス型レチノイン酸 (ATRA) を添加し、さらに培養を継続した。培養終了後、Ca9-22 から total RNA を回収し、逆転写を行ったのち、抗菌ペプチド LL-37 の mRNA 発現を RT-PCR およびリアルタイム PCR にて解析した。なお、インターナルコントロールには G3PDH を用いた。Ca9-22 培養上清中の LL-37 の産生量は ELISA により求めた。

ATRA の添加により Ca9-22 からの抗菌ペプチドである LL-37 の mRNA および同タンパクの産生が促進され、それと同時に核内に存在するリガンド誘導性転写因子であるレチノイン酸受容体 (RAR α , β) とレチノイド X 受容体 (RXR β) の mRNA 発現が誘導された。

以上の結果から、ATRA はヒト歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチドである LL-37 の mRNA 発現および同タンパクの産生を促進することにより、口腔の自然免疫系が賦活されることが示された。さらに、ATRA によるこれらの賦活作用発現は核内受容体である RAR および RXR の発現が促進された結果であることが示された。

緒 言

レチノイン酸はビタミン A の活性代謝物であり，レチノイドとも呼ばれる。レチノイン酸は生体内において，細胞の増殖・分化，生体の恒常性維持，形態形成に関わる重要な脂溶性ビタミンで¹⁾，抗体産生や T 細胞の活性化を促進するなど²⁾，免疫機能に対し多彩な機能を発揮していることが知られている。現在，レチノイドは急性前骨髄球性白血病の分化誘導療法剤としてレチノイン酸(医薬一般名トレチノイン)が用いられるほか，その異性体や類似の活性を持つ合成化合物が，乾癬，角化症，重篤なニキビなど，皮膚の炎症性，増殖性疾患の治療に用いられている^{1,3)}。

ビタミン A の摂取不足による夜盲症や免疫力の低下，さらに乳幼児の発育不良や栄養失調は深刻な問題とされている^{4,5)}。その一方で，ビタミン A 過剰症による全身倦怠感，頭痛や吐き気などの脳圧亢進などの症状も見られ⁶⁾，特に妊婦の場合には，胎児奇形が問題になっている⁷⁾。また，ヒトがビタミンを補給することによって免疫能が変化するか否かに関する介入試験の報告も増えてきており，ビタミン A 摂取による免疫能改善に関しては Villamor ら⁸⁾によって報告されている。しかし，レチノイン酸の口腔に及ぼす作用については欠乏症のような症状に関する研究はみられるものの，口腔の免疫能に与えるレチノイン酸の作用についての検討は少ない。

口腔内唾液成分には，酵素，ホルモン，抗菌ペプチド，抗体などの成分が含まれている。このうち，口腔の感染防御因子である抗菌物質としては，リゾチーム，ペルオキシダーゼ，ラクトフェリン，免疫グロブリンなどがある。しかし最近では，自然免疫の抗菌ペプチドファミリ

ーであるディフェンシンやカテリシジンが注目されている⁹⁾。LL-37は唯一のカテリシジンファミリーであり¹⁰⁾、歯肉炎、歯周炎などの歯周病原性細菌に特に強い抗菌活性のあることが示されている^{11,12)}。また、グラム陰性菌のリポ多糖の中和作用や、好中球、単球、T細胞などの細胞遊走能の活性化、血管新生促進による創傷治癒に関与し、細菌によって引き起こされた炎症反応を軽減すると同時に好中球の機能を補助するなど、LL-37は口腔における防御反応に重要な役割を果たしているものと考えられる¹³⁻¹⁹⁾。

そこで本研究では、レチノイン酸の持つ口腔の自然免疫に及ぼす作用を検索するために、口腔上皮細胞を用いLL-37を指標とし、その影響を検討した。さらに、その作用発現の機構を調べるために、レチノイン酸の作用発現に関わる核内レセプターであるレチノイン酸受容体(RAR)とレチノイドX受容体(RXR)についても併せて検討を行った。

材 料 と 方 法

1. 試薬

Fetal Bovine Serum (FBS, SIGMA, St.Louis, MO, USA), Tris-EDTA buffer (TE, 和光純薬, 大阪), Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, SIGMA, St.Louis, MO, USA), PBS-Tween buffer (PBS-T, 日水製薬, 東京), ISOGEN-LS (和光純薬, 大阪) を用いた。レチノイン酸として *all-trans*-Retinoic Acid (ATRA, 和光純薬, 大阪) を用いた。

2. 培養細胞

細胞はヒト歯肉上皮癌細胞株 Ca9-22²⁰⁾を用いた。

Ca9-22 は直径 60 mm のプラスチックシャーレ (IWAKI, 東京) を用い, 10% FBS 添加 D-MEM にて通法に従い培養した。単層を形成した Ca9-22 は, 1% FBS 添加 50mM-HEPES 含有 D-MEM に培地を置換し, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M の ATRA をそれぞれに添加し, 1 時間および 24 時間培養後, Ca9-22 から total RNA を回収した。なお, 全実験系について ATRA を添加していない培地で培養した細胞をコントロールとした。

3. RNA 回収と RT-PCR, リアルタイム PCR

Ca9-22 からの total RNA は ISOGEN-LS を用い通法に従い回収した²¹⁾。同 RNA は ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, 大阪) を用いて逆転写を行った。逆転写により得られた cDNA から LL-37 をターゲットとし RT-PCR を行った。RT-PCR は増幅過程を 27 サイクル行った。PCR の生成物は 1.5% アガロースゲルを用いて展開し, ethidium bromid で染色した後, 観察を行った。また, リアルタイム PCR は SYBR® Green Real time PCR Master Mix-Plus- (TOYOBO, 大阪) を用い, 95°C 60 秒, 95°C 15 秒, 60°C 15 秒, 72°C 45 秒の増幅過程を Applied Biosystems 7500 system (Applied Biosystems by Life Technologies, 東京) を用いて 40 サイクル行った。なお, インターナルコントロールは G3PDH を用いた。LL-37 と G3PDH のプライマーのシークエンスを表 1 に示す^{22,23)}。リアルタイム PCR に用いたプライマーは ABI Primer Express (Applied Biosystems by Life Technologies, 東京) によりゲノム DNA 由来の増幅が起こらないように設計を行った。PCR 産物は, 融解曲線の分析によって, 単一ターゲット産物であることにより確認した。

4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ca9-22 培養上清中における LL-37 の産生量は Human

LL-37 ELISA kit (Hycult Biotechnology, Uden, Netherlands)を用いて、付属の取扱説明書に記載された方法に従い測定した。

5. 統計処理

有意差検定には、Paired *t*-testを行い、有意水準 5%で統計学的有意差があると判定した。

結 果

1. ATRA を添加したヒト歯肉上皮細胞からの LL-37 の mRNA 発現

Ca9-22 からの LL-37 の mRNA は ATRA 添加濃度依存的にその発現が促進された (図 1)。次に、ATRA による Ca9-22 からの LL-37 の産生動態を、その時間経過について検討した。すなわち、10 μ M の ATRA を Ca9-22 に添加し、1 時間から 24 時間培養継続した Ca9-22 における LL-37 の mRNA 発現を検討した。その結果、LL-37 の mRNA は時間依存的に促進され、24 時間で最大となった (図 2)。

2. ATRA を添加したヒト歯肉上皮細胞からの LL-37 の産生

ATRA が Ca9-22 からの LL-37 mRNA 発現を促進することが認められたことから、LL-37 のタンパクの産生も促進しているかを確かめるため、ELISA により検討した。Ca9-22 の培養上清中における LL-37 の産生は、ATRA 1 μ M 添加後 1 時間で、促進されることが示された (図 3)。

一方、ATRA 添加後 24 時間についても同様に検討したところ、ATRA の濃度 10 μ M で有意な LL-37 の産生促進が認められた (図 4)。

3. ATRA が及ぼす Ca9-22 の核内レセプターの mRNA 発現

ATRA によるヒト歯肉上皮細胞からの LL-37 の産生促進が、どのような経路を介しているかを検討するために、レチノイン酸受容体である RAR と RXR を指標としてリアルタイム PCR によりその状況を検討した。

その結果、ATRA 添加後 24 時間では $2\mu\text{M}$ および $5\mu\text{M}$ で RAR α の mRNA 発現が促進された(図 5)。同様に RAR β について検討した。その結果、ATRA 添加後 1 時間では有意な差は認められなかったが、24 時間では mRNA の発現が促進された(図 6)。さらに、RAR とヘテロダイマーを構成する RXR についても同様に検討したところ、RXR α の mRNA 発現に対し、ATRA は何ら影響を与えなかった(図 7)。一方、RXR β においては ATRA 添加後 24 時間において、その mRNA 発現が有意に促進することが示された(図 8)。なお、リアルタイム PCR の図では ATRA 添加後 1 時間と 24 時間のコントロールを 1 とした時の、各濃度における mRNA の発現比で表している(図 5 ~ 8)。

考 察

脂溶性ビタミンであるビタミン A は、多彩な機能を有している。そのうち、Villamor ら⁸⁾は適切なビタミン A の摂取は小児における重度感染症の治療に有用であるなど、免疫機能に対する機能も有していると報告している。しかしながら、口腔の免疫機能に重要な役割を果たしている自然免疫に対するビタミン A の効果を検証した報告はない。

口腔の自然免疫を掌る液性因子のひとつに、カテリジンファミリーの抗菌ペプチド LL-37 があることが知られている²⁴⁾。この LL-37 は主に好中球から産生されるが、

口腔の上皮系細胞からも産生される²⁵⁾。さらに、LL-37は口腔内細菌、とりわけ歯周病原性細菌に対し強い抗菌活性を持つことが示されている^{10,11,18)}。そこで、本研究ではヒト歯肉上皮細胞であるCa9-22を用い、ビタミンAの持つ自然免疫への影響について抗菌ペプチドであるLL-37を指標として検討を行った。

まず初めに、Ca9-22に0.5~10 μ Mの各種濃度のATRAを添加し、LL-37mRNAの発現が誘導されるかについて検討した。その結果、Ca9-22からのLL-37mRNAはATRA添加濃度および添加時間依存的にその発現が促進された。このことからビタミンAは口腔内のバリア機構である自然免疫を賦活する可能性が示された。

ATRAは、T細胞の活性や抗体産生を修飾するなど、抗菌ペプチド以外の自然免疫系にも作用することが示されている^{2,8)}。一方、ATRAと同様の脂溶性ビタミンである1,25(OH)₂D₃がヒト口腔内の角化細胞であるOKF6/TERTからのLL-37mRNAの発現を誘導することが示されている²⁶⁾。これらのことをあわせ考えると上皮系細胞におけるLL-37のmRNA発現促進は、脂溶性ビタミンにより制御されている可能性が示唆された。

このように、ATRAはCa9-22におけるLL-37mRNA発現を促進したことから、そのプロダクトであるLL-37タンパク質が培養上清中に実際に産生されているかをELISAにて検討を行った。その結果、ATRAの濃度が低濃度の場合では添加後1時間、高濃度の場合では24時間でその産生が有意に増加した。ATRAは熱や酸性環境下において不安定であることが知られている²⁷⁾。また、ATRA濃度5 μ M以上ではコントロールと比較し、LL-37の産生が減少していることから、Ca9-22の活性が抑制されている可能性が示された。よって、低濃度のATRA添

加後 1 時間で有意に LL-37 の産生が促進されたことは ATRA の early phase の作用と考える。

レチノイン酸は RAR および RXR とヘテロダイマーを形成し、様々な遺伝子発現を制御していることが知られている²⁸⁾。そこで、ATRA によるヒト歯肉上皮細胞からの LL-37 の産生促進が、RAR および RXR のどのサブタイプの系を介しているかを検討するために、これら RAR と RXR をターゲットとしたリアルタイム PCR により検討を行った。その結果、ATRA は Ca9-22 の RAR α と β の mRNA 発現を誘導し、特に RAR α において顕著であった。一方、RXR では β においてのみ、その発現促進が認められた(図 7, 8)。このことから、Ca9-22 における ATRA の作用発現は RAR α , β と RXR β とのヘテロダイマーが LL-37 遺伝子のプロモーター領域に結合することにより、発現されている可能性が示された。詳細については今後の検討が必要である。

今回、ビタミン A の活性代謝物である ATRA が口腔の自然免疫を賦活することが示唆された。歯科矯正治療では、マルチブラケットなどの矯正装置を装着すると口腔内環境が大きく変化する²⁹⁾。その際、口腔衛生状態が不良になり、歯肉炎やう蝕の発症を認める症例がある。よって、歯科矯正治療中の口腔内環境を良好に維持すること、特に細菌に対する対策は重要である。その対策の主な方法は、ブラッシングに代表されるような歯口清掃が挙げられる。しかしながら、本研究において、栄養素の一つであるビタミン A の活性代謝物が口腔上皮からの抗菌ペプチドの産生を促進させる可能性が示された。よって、歯科矯正治療中の口腔内環境を良好に維持するために従来のブラッシングに加えて、適正な栄養素摂取で補完することも考えられる。

結 論

レチノイン酸は，ヒト歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチド LL-37 産生を誘導することが示された。

本論文の要旨は第 56 回奥羽大学歯学会（平成 25 年 11 月 9 日 郡山市）において発表した。

文 献

- 1) Chambon, P. : A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB. J.* **10** ; 940-954 1996.
- 2) Ross, A. C. : Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* **96** ; 1166S-1172S 2012.
- 3) Fisher, G. J., Voorhees, J. J. : Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB. J.* **10** ; 1002-1013 1996.
- 4) Miller, M., Humphrey, J., Johnson, E., Marinda, E., Brookmeyer, R., Katz, J. : Why do children become vitamin A deficient?. *J. Nutr.* **132** ; 2867S-2880S 2002.
- 5) Sommer, A., Davidson, F. R. : Assessment and control of vitamin A deficiency: the Annecy Accords. *J. Nutr.* **132** ; 2845S-2850S 2002.
- 6) Silverman, A. K., Ellis, C. N., Voorhees, J. J. : Hypervitaminosis A syndrome: a paradigm of retinoid side effects. *J. Am. Acad. Dermatol.* **16** ; 1027-1039 1987.
- 7) Rothman, K. J., Moore, L. L., Singer, M. R., Nguyen, U. S., Mannino, S., Milunsky, A. : Teratogenicity of high vitamin A intake. *N. Engl. J. Med.* **333** ; 1369-1373 1995.
- 8) Villamor, E., Fawzi, W. W. : Effects of vitamin a supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clin. Microbiol. Rev.* **18** ; 446-464 2005.
- 9) De, Smet. K., Contreras, R. : Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins.

- Biotechnol. Lett. 27 ; 1337-1347 2005.
- 10) Doss, M., White, M. R., Tecle, T., Hartshorn, K. L. :
Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. J.
Leukoc. Biol. 87 : 79-92 2010.
 - 11) Hosokawa, I., Hosokawa, Y., Komatsuzawa, H.,
Goncalves, R. B., Karimbux, N., Napimoga, M. H., Seki,
M., Ouhara, K., Sugai, M., Taubman, M. A., Kawai, T. :
Innate immune peptide LL-37 displays distinct
expression pattern from beta-defensins in inflamed
gingival tissue. Clin. Exp. Immunol. 146 ; 218-225
2006.
 - 12) Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Shiba, H.,
Fujiwara, T., Ohara, M., Sayama, K., Hashimoto, K.,
Kurihara, H., Sugai, M. : Susceptibilities of
periodontopathogenic and cariogenic bacteria to
antibacterial peptides, β -defensins and LL37,
produced by human epithelial cells. J. Antimicrob.
Chemother. 55 ; 888-896 2005.
 - 13) Chertov, O., Michiel, D. F., Xu, L., Wang, J. M., Tani,
K., Murphy, W. J., Longo, D. L., Taub, D. D.,
Oppenheim, J. J. : Identification of defensin-1,
defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell
chemoattractant proteins released from
interleukin-8-stimulated neutrophils. J. Biol. Chem.
271 ; 2935-2940 1996.
 - 14) Ciornei, C. D., 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 ; 2845-2850 2005.

- 15) Koczulla, R., Von, Degenfeld. G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P. S., Vogelmeier, C., Gallo, R. L., Clauss, M., Bals, R. : An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. J. Clin. Invest. 111 ; 1665-1772 2003.
- 16) Lee, S. H., Jun, H. K., Lee, H. R., Chung, C. P., Choi, B. K. : Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. Int. J. Antimicrob. Agents 35 ; 138-145 2010.
- 17) Nagaoka, I., Hirota, S., Niyonsaba, F., Hirata, M., Adachi, Y., Tamura, H., Heumann, D. : Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. J. Immunol. 167 ; 3329-3338 2001.
- 18) Isogai, E., Isogai, H., Matuo, K., Hirose, K., Kowashi, Y., Okumura, K., Hirata, M. : Sensitivity of genera *Porphyromonas* and *Prevotella* to the bactericidal action of C-terminal domain of human CAP18 and its analogues. Oral Microbiol. Immunol. 18 ; 329-332 2003.
- 19) Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K., Ogawa, H. : Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils. Br.

- J. Dermatol. **157** ; 1124-1131 2007.
- 20) Hirose, K., Isogai, E., Mizugai, H., Ueda, I. : Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to human gingival cell line Ca9-22. Oral Microbiol. Immunol. **11** ; 402-406 1996.
- 21) 黒田 栄子, 廣瀬 公治, 佐藤 直生, 福井和徳 : 培養環境 pH がおよぼす骨芽細胞のサイトカイン産生についての研究. 奥羽大歯学誌 **39** ; 19-26 2012.
- 22) McIntosh, R. S., Cade, J. E., Al-Abed, M., Shanmuganathan, V., Gupta, R., Bhan, A., Tighe, P. J., Dua, H. S. : The spectrum of antimicrobial peptide expression at the ocular surface. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **46** ; 1379-1385 2005.
- 23) Ercolani, L., Florence, B., Denaro, M., Alexander, M. : Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. J. Biol. Chem. **263** ; 15335-15341 1988.
- 24) Burton, M. F., Steel, P. G. : The chemistry and biology of LL-37. Nat. Prod. Rep. **26** ; 1572-1584 2009.
- 25) 佐藤 直生, 廣瀬 公治, 大植 一樹, 福井和徳 : 歯肉上皮細胞における抗菌タンパク質産生機構に関する研究. Orthod. Waves **72** ; 17-24 2013.
- 26) McMahon, L., Schwartz, K., Yilmaz, O., Brown, E., Ryan, L. K., Diamond, G. : Vitamin D-Mediated Induction of Innate Immunity in Gingival Epithelial Cells. Infect. Immun. **79** ; 2250-2256 2011.
- 27) 影近 弘之 : ビタミン A の機能とその制御分子. ビタミン **77** ; 501-511 2003.
- 28) 加藤 茂明 : 核内レチノイドレセプターの転写調節に関する研究. ビタミン **70** ; 217-233 1996.

- 29) Pandis. N., Papaioannou. W., Kontou. E., Nakou. M., Makou. M., Eliades. T. : Salivary Streptococcus mutans levels in patients with conventional and self-ligating brackets. Eur. J. Orthod. 32 ; 94-99 2010.

図表の説明

表 1 : RT-PCR,リアルタイム PCR に用いた各種プライマーの塩基配列

図 1 : ATRA 添加濃度における Ca9-22 からの LL-37mRNA 発現の促進

Ca9-22 からの LL-37 の mRNA は ATRA 添加濃度依存的にその発現が促進された。

図 2 : ATRA 添加時間における Ca9-22 からの LL-37mRNA 発現の促進

ATRA による Ca9-22 からの LL-37 の産生動態を, その時間経過について検討した。LL-37 の mRNA は時間依存的に促進された。

図 3 : ATRA 添加 1 時間後の LL-37 産生量

Ca9-22 に各濃度の ATRA 添加 1 時間で, LL-37 産生量を ELISA により定量した。グラフは平均値 \pm SD を表している。

図 4 : ATRA 添加 24 時間後の LL-37 産生量

Ca9-22 に各濃度の ATRA 添加 24 時間で, LL-37 産生量を ELISA により定量した。グラフは平均値 \pm SD を表している。

図 5 : RAR α mRNA の発現

Ca9-22 は, 各濃度の ATRA を添加し, 1 時間, 24 時間培養を行った。培養終了後 RNA を回収し RAR α をターゲットとしたリアルタイム PCR を行った。グラフは平均値 \pm SD を表している。

図 6 : RAR β mRNA の発現

Ca9-22 は, 各濃度の ATRA を添加し, 1 時間, 24 時間培養を行った。培養終了後 RNA を回収し RAR β をターゲットとしたリアルタイム PCR をおこなった。グラフは平均値 \pm SD を表している。

図 7 : RXR α mRNA の発現

Ca9-22 は、各濃度の ATRA を添加し、1 時間、24 時間培養を行った。培養終了後 RNA を回収し RXR α をターゲットとしたリアルタイム PCR をおこなった。グラフは平均値 \pm SD を表している。

図 8 : RXR β mRNA の発現

Ca9-22 は、各濃度の ATRA を添加し、1 時間、24 時間培養を行った。培養終了後 RNA を回収し RXR β をターゲットとしたリアルタイム PCR をおこなった。グラフは平均値 \pm SD を表している。

表 1

		Primer sequence	Reference
RT-PCR	LL-37	Forward: CAGGACGACACAGCAGTCAC	22
		Reverse: CAGCAGGGCAAATCTCTTGT	
	G3PDH	Forward: TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTT	23
		Reverse: CATGTGGGCCATGAGGTCCACCA	
Real-time PCR	LL-37	Forward: CATCATTGCCCAGGTCCTCAGCT	
		Reverse: AGGTTAGCATCCGAGGACCGCTG	
	G3PDH	Forward: TGGCATTGCCCTCAACGACCACTT	
		Reverse: CCACCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCG	

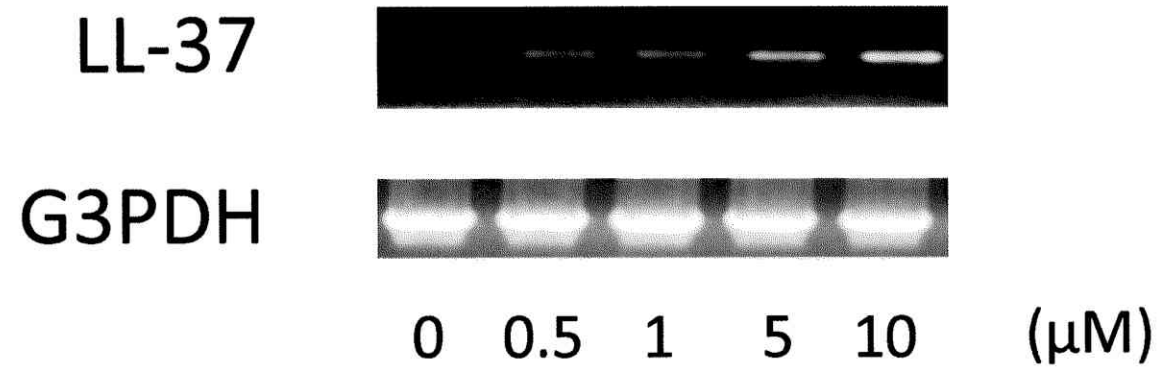


图 1

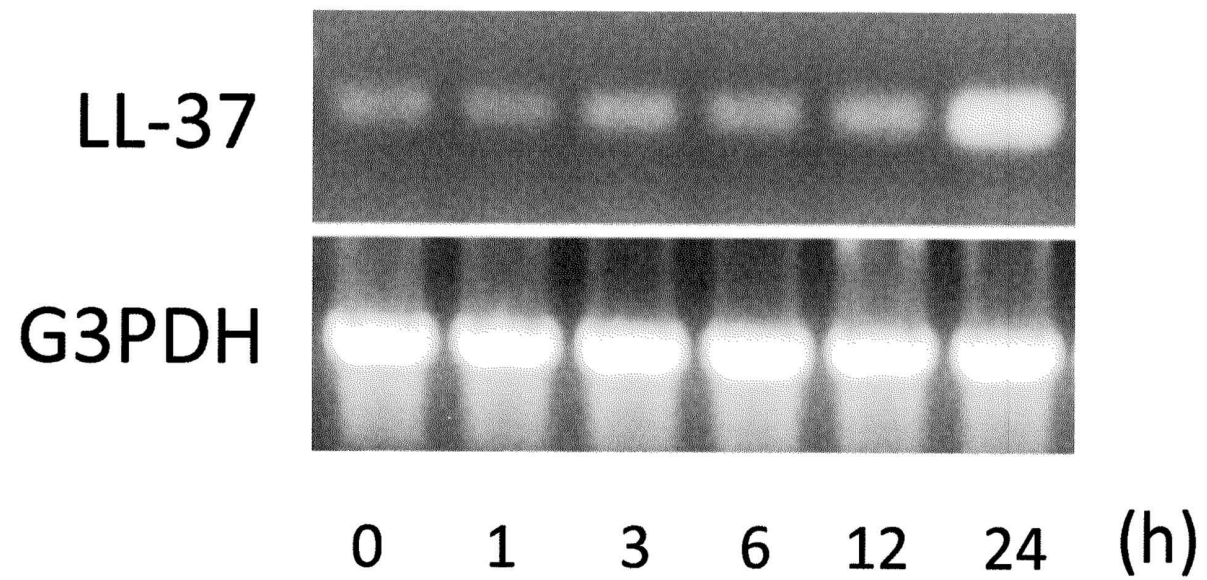


图2

LL-37

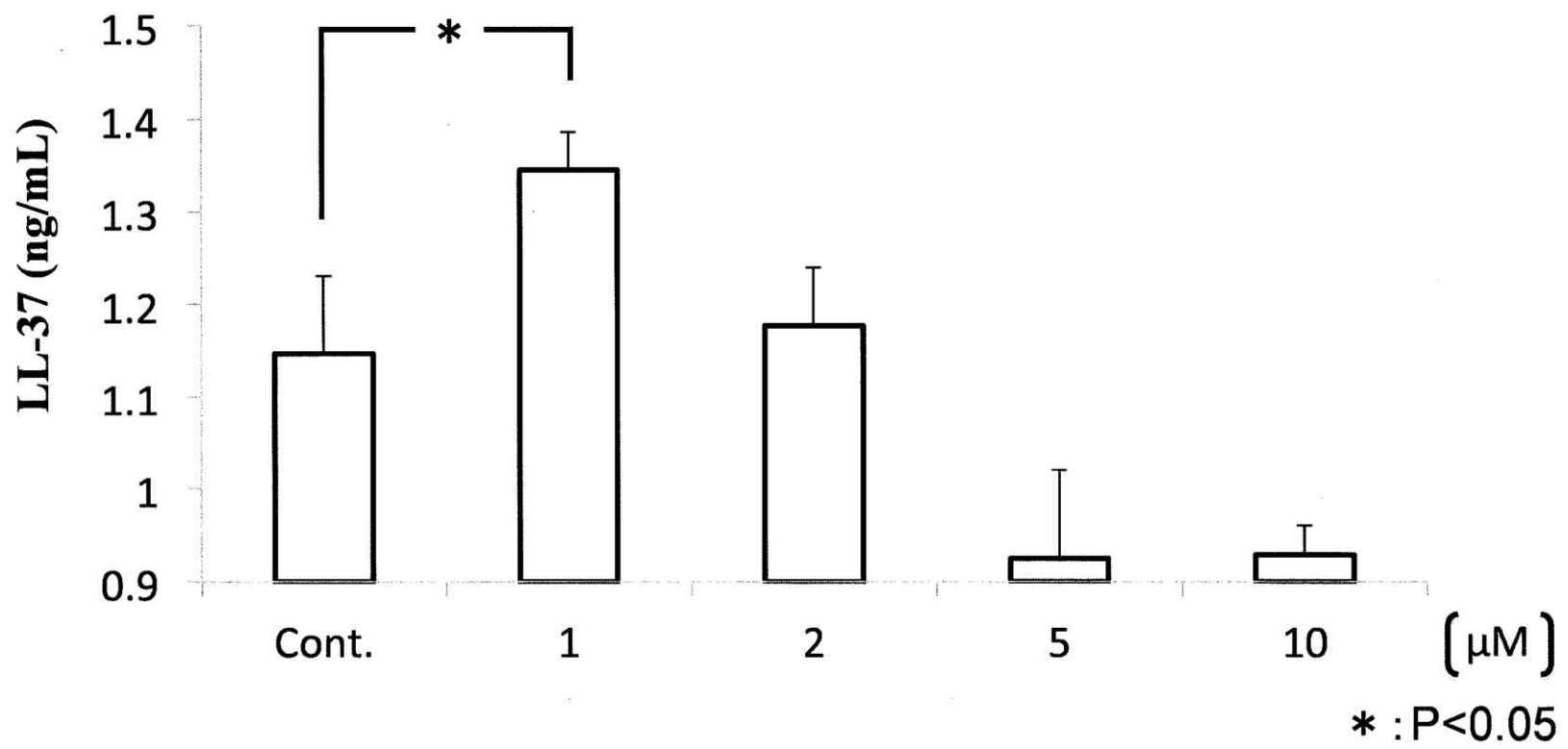


图3

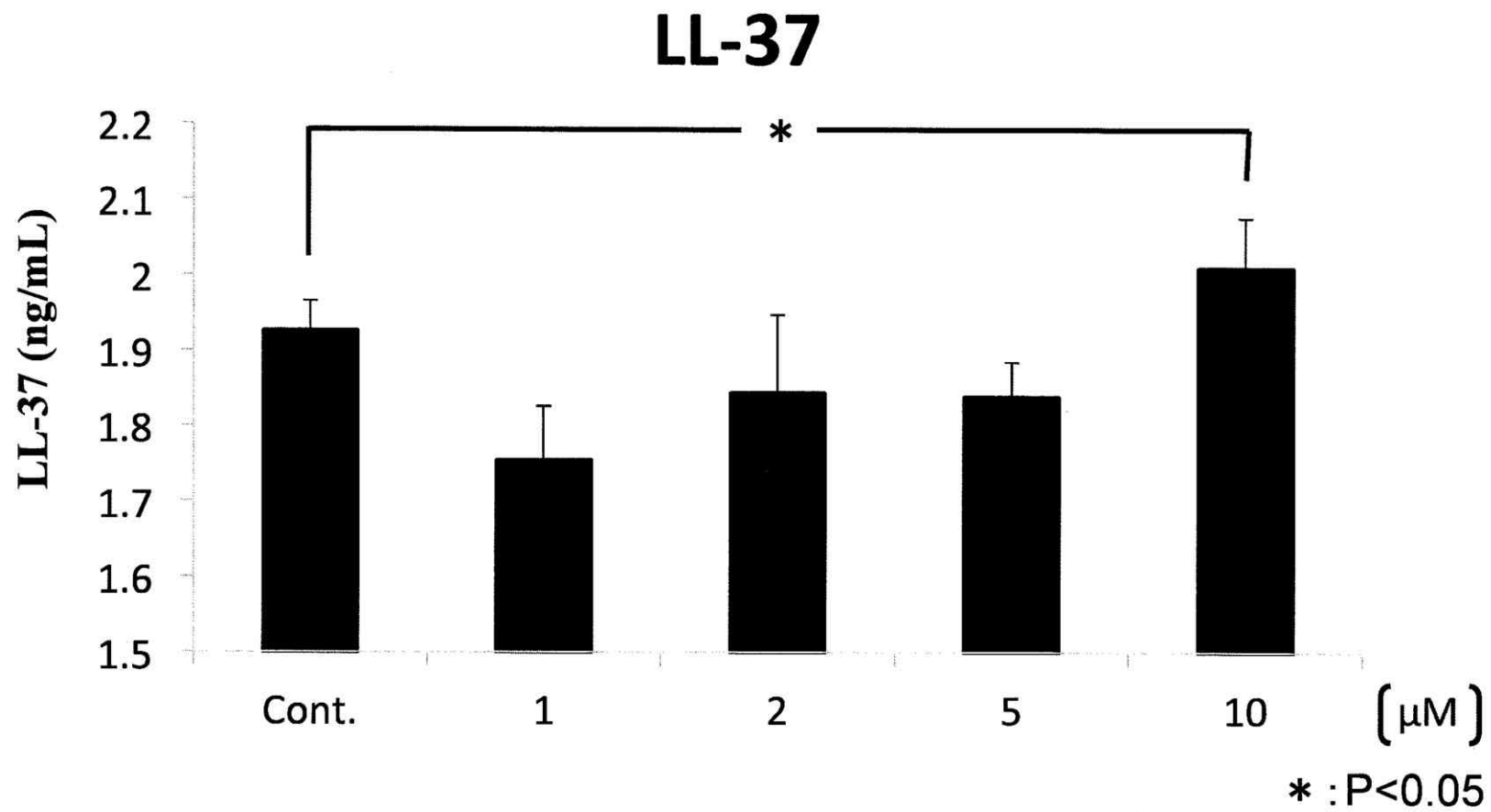


图4

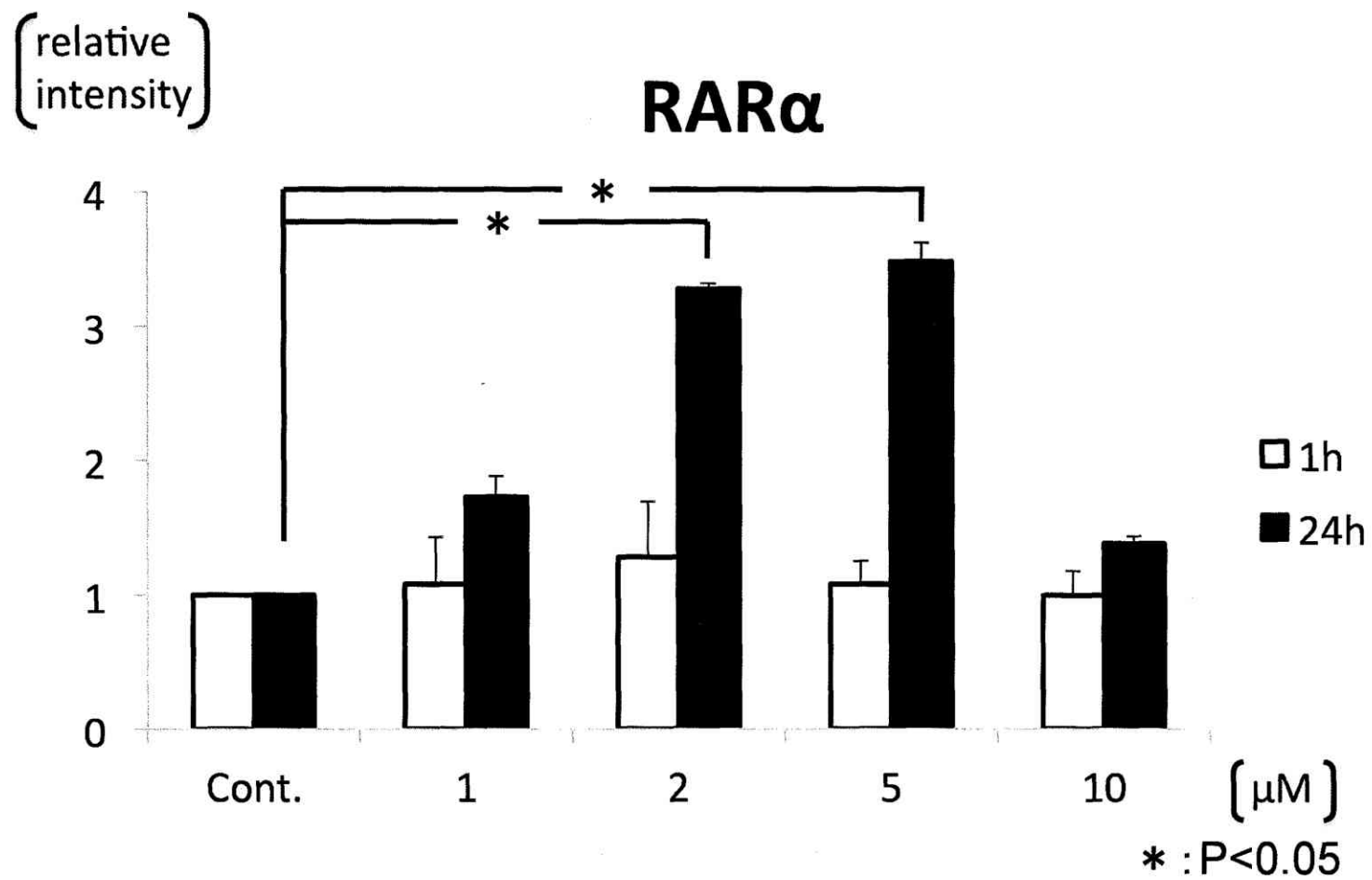


图5

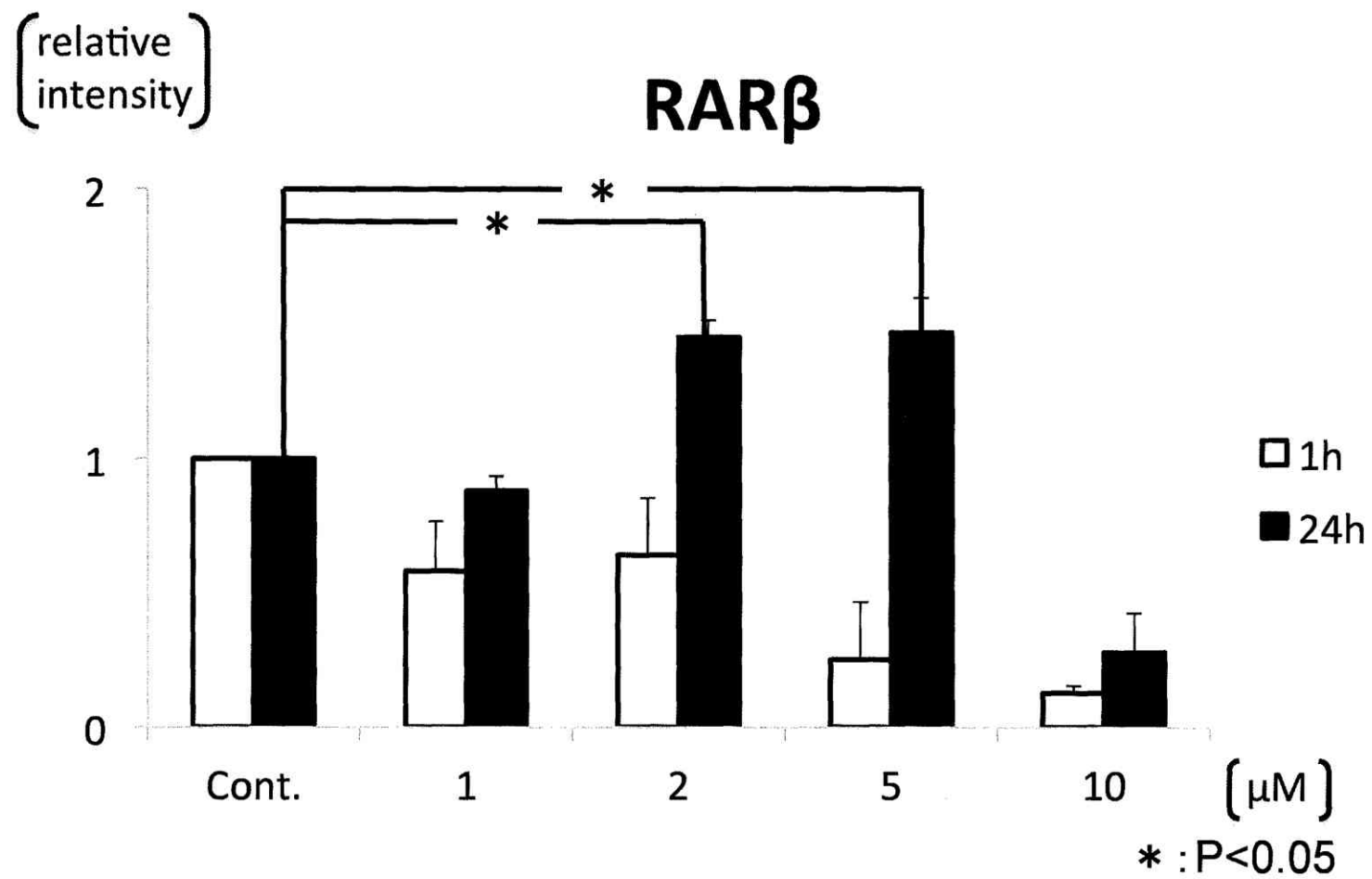


图6

(relative intensity)

RXR α

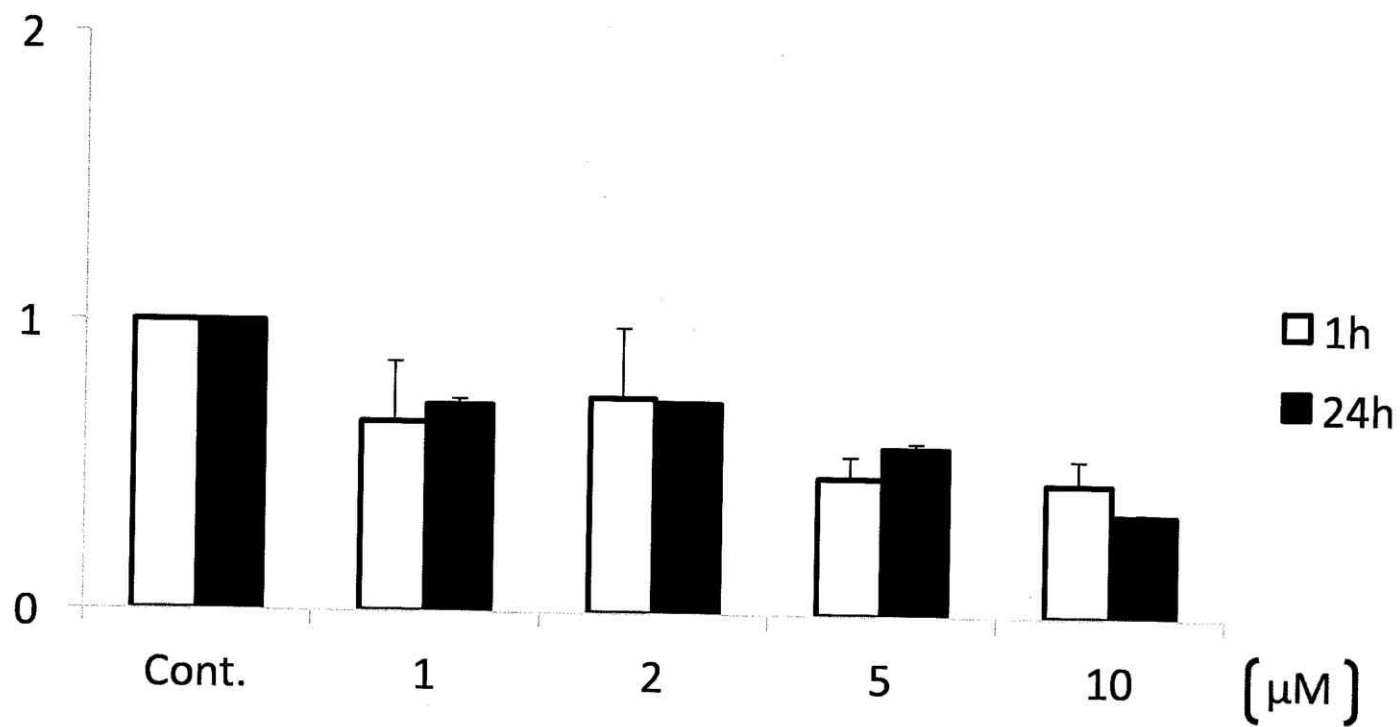


图7

(relative intensity)

RXR β

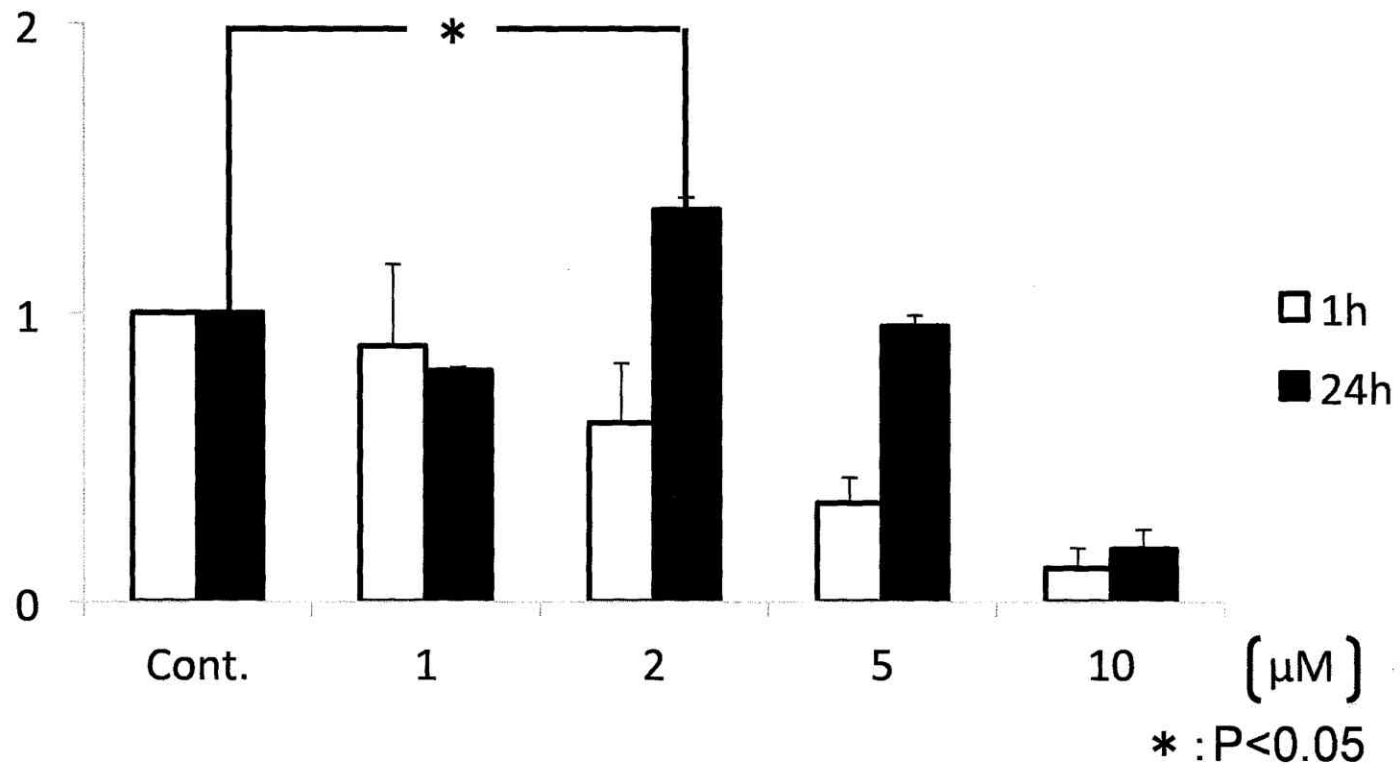


图8