

令和元年6月17日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11433

研究課題名(和文) 低濃度フッ化物による老化・寿命制御の分子機構の解明

研究課題名(英文) Role of low-level fluoride in aging and its underlying cellular mechanisms

研究代表者

荒川 浩久 (Arakawa, Hirohisa)

神奈川歯科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：00130906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：3ヶ月齢および加齢モデルの24ヶ月齢のWild-type (WT), Differentiated Embryo Chondrocyte (Dec) 1 Knockout (KO) マウスを使用し、DNAマイクロアレイおよびmiRNAアレイを用いて解析した。遺伝子オントロジー(GO)分析は、miRNAを標的とした遺伝子の極めて重要な転写関連プロセスと細胞内シグナル伝達を組み込んでいることを明らかにした。シグナル経路で、cAMP媒介シグナル、タイトジャンクションシグナル、およびギャップジャンクションシグナルが骨老化に関与していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フッ化物は骨や歯質など硬組織への影響は以前から報告されているが、申請者はNHOKがフッ化物を作用させることで増殖すること、また、ラットにおいても皮膚創傷実験において線維芽細胞増殖因子FGF2, FGF7の発現が上昇し、歯周組織のアンチエイジングのみならず、皮膚をはじめ全身のアンチエイジングの創薬へと繋がる可能性があると考えたことと、老化細胞マスター転写因子(DEC1: Differentiated Embryo Chondrocyte 1) KOマウスを用い、フッ化物投与がどのような影響があるかを明らかにしていくところから、先進的で独創的な結果が期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed genome-wide screening of NaF induced senescent cell master transcription factor (Dec1: Differentiated Embryo Chondrocyte 1) to clarify the regulation of target genes and the control mechanism of senescent cells using DEC1 KO mice. We evaluated the influence of DEC1 gene on bone tissue to elucidate physiological function of senescent cells in term of bone metabolism and autoimmunity. Total RNA was isolated from femoral tissue of 3-month-old and 24-month-old WT and Dec1 Knockout (KO) mice. Their gene expression and miRNA expression findings were analyzed using DNA microarrays and miRNA arrays in combination with GeneSpring and Ingenuity Pathways Analysis. Gene ontology (GO) analysis revealed that it incorporates critical transcription-related processes and intracellular signaling of genes targeted to miRNA. Several signaling pathways, such as cAMP-mediated signal, tight junction signal, and gap junction signal are involved in bone senescence.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：低濃度フッ化物 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フッ化物 (F) は、齲蝕や歯周疾患に対して抵抗性の高い歯と丈夫な骨を作り、それを維持していくうえで生体にとって必要不可欠な微量元素である。F の細胞への影響として、 μM レベルの低濃度では、骨芽細胞 (Burgener et al, J Bone Miner Res, 1995) やエナメル芽細胞 (Yan et al, J Dent Res, 2007) の増殖を促進する報告の他、申請者らは、角化歯肉上皮細胞(以下:NHOK)に対して、低濃度 F では増殖・移動を促進することを明らかにした。(Arakawa et al., Biomedical Research, 2009).また、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、線維芽細胞増殖因子 FGF2, FGF7 の発現が上昇することで、上皮移動、増殖が強く見られ、上皮の形態発育、再生を促進することを明らかにした。さらに、間葉細胞マーカーTwist1 発現が上昇することで、上皮間葉相互作用を刺激し、上皮間葉相互作用においても、上皮の形態発育、再生を促進した。(He et al. Journal of Hard Tissue Biology, 2012).

F と歯周疾患の関係は、近年、水道水 F 濃度調整地区において、住民の歯周組織の健全性が高いとの疫学的報告がある(Kumar et al, Med Oral Pathol Oral Cir Bucal, 2009)。申請者らの最近の研究により、歯周病感染モデルラットを用いた実験で、低濃度 F 摂取群では非摂取群に比べ、有意に歯槽骨吸収を抑制することを見出した。

歯周病は老化とともに進行する歯周組織を破壊する慢性炎症性疾患である。歯周炎は歯周病原細菌や咬合性外傷および喫煙等のリスクファクターにより一過性、慢性的な低酸素状態が生じているのではないかと示唆される。また、生体内の酸素分圧は多様で、局所的ではあるものの低酸素状態を保っている組織も存在する。

2. 研究の目的

フッ化物は、骨や歯の硬組織に対して高い親和性を有する。申請者らは、低濃度フッ化物の全身投与が、実験的歯周病モデルラットの歯槽骨吸収を抑制するメカニズムを解析し、細胞レベルではヒト角化歯肉上皮細胞の増殖を確認した。本研究は、歯肉上皮に対する低濃度フッ化物の影響を解析し、将来的には歯周組織のアンチエイジングの創薬の一助となることを目的とする。

低酸素ストレスに対する細胞で中心的な役割を果たす低酸素誘導因(Hypoxia-inducible factor: HIF) は、酸化ストレスの抑制、代謝の適応、血管新生等の応答を引き起こす遺伝子である。HIF の過剰発現により RANKL が活性化することは報告されており(Tang et al., Biochem Biophys Res Commun, 2011) 、歯槽骨吸収や骨粗鬆症等の骨密度が低下する老化関連疾患と関係する。

また、老化した細胞は細胞周期を停止しているだけでなく、炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼなどの生理活性因子を分泌することが報告されており、この現象を SASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼んでいる。老化細胞はこの SASP 因子を放出することによって周辺細胞に炎症を誘発させる。申請者らは、増殖中 NHOK 細胞と老化 NHOK 細胞をもちいて DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、老化関連遺伝子を同定した(Jang and Bhawal et al, Journal of Gerontology Biological Sciences, 2014)。

当該研究において F による老化細胞マスター転写因子 (DEC1: Differentiated Embryo Chondrocyte 1, SIRT1: Sirtuin 1 など) が制御している標的遺伝子の全貌と低酸素応答マスター因子 HIF による老化細胞の制御機構を明らかにするため、HIF1 α トランスジェ

ニックマウスを用いてゲノムワイドにスクリーニングを展開し老化細胞制御遺伝子を同定、さらに HIF 遺伝子による歯肉上皮、骨組織への影響を明らかにすることで、老化細胞の生理的機能の解明のみならず、異常活性および機能不全で誘発される代謝性、自己免疫性骨疾患のメカニズム解明を目的とする。

3 . 研究の方法

(1) F 添加後、Flow cytometry 法にて増殖中の NHOK 細胞、 β -ガラクトシダーゼ染色にて老化 NHOK 細胞をそれぞれ評価する。F 添加による増殖中 NHOK 細胞および老化 NHOK 細胞を DNA マイクロアレイ解析にて網羅的遺伝子発現解析を行う。

(2) マウスから骨髄細胞を採取し、F 添加による骨芽細胞および破骨細胞の評価をリアルタイム PCR 法、ウェスタンブロッティング法、SEM 法および TRAP 染色法を用いて解析する。

(3) マウスを用いて F 摂取による歯周組織に及ぼす影響をマイクロ CT、ヘマトキシリン・エオジン染色法および免疫組織科学染色法を用いて解析する。

4 . 研究成果

F を添加した増殖中の細胞を用いて、DNA と細胞周期の解析は FACS 解析(BD Biosciences, San Jose, CA)にて評価した。NHOK の細胞老化の評価には SA- β gal 染色を用いた。60 mm Dish に老化細胞播種し 70 %コンフルエント状態になった時点で培地を除去し、PBS で一度洗浄後、Fixation Buffer を加え 7 分間インキュベートし、その後 3 回 PBS にて洗浄し、Staining Mixture を加えて 12 時間 37 °Cでインキュベートし、最後に倒立顕微鏡にて NHOK 細胞を確認した。F を添加した増殖中の NHOK と老化 NHOK から RNA 画分を回収し、GeneAmp RNA PCR kit を用いて蛍光標識 cRNA を合成した。次いで、標識 cRNA を GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 にてハイブリダイズさせ、GeneSpring GX software を用いてデータ解析を行った。マイクロアレイデータ分析の促進や、特異遺伝子の発現量の変化増加および低下を関連づける IPA 解析では、インシリコゲノミクス・ネットワーク分析を使用して、予測される生物学的過程、転写経路およびネットワークの探索を行った。Total RNA は TRI-reagent を使用し作製する。cDNA は SuperScriptTM と SYBR Green PCR Master Mix EX Taq を使って増幅させた。QuantStudio 6 Flex リアルタイム PCR にて各 mRNA の発現量は cycle threshold 値 (Ct 値) にて算出し、 β -actin およびコントロールの Ct 値で補正し、デルタデルタ Ct 値を算出、各遺伝子の発現量は 70% コンフルエント細胞に対するパーセンテージで算出した。Western blot 法による抗体を用いてタンパク質の発現を検討した。

培地で 7 日間培養し、F 添加の有無による影響を解析した。骨芽細胞の活性化は、分化マーカーである 1 型コラーゲン、Alkaline Phosphatase (ALP)、Osteopontin (OPN)、Osteocalcin (OCN)、Bone sialoprotein (BSP)、また破骨細胞分化制御因子として receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)、osteoprotegerin (OPG)、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)の発現をリアルタイム PCR 法より評価した。破骨細胞の分化は、酒石酸抵抗性フォスファターゼ (TRAP) 染色および Pit Formation Assay 法 (SEM 法) より解析した。また、破骨細胞活性化はウェスタンブロッティング法よりカテプシン K、MMP2、MMP9 の発現を評価し、ゼラチンザイモ電気泳動より MMP2、MMP9 の活性化を評価した。

マウスの健康状態を観察後、抗生物質を服用させ、口腔常在菌を減少させた後、PBSで作製し、NaF粉末をイオン交換水に溶解して調整した μM レベルの低濃度Fを常時摂取させた。F投与後、1ヶ月、2ヶ月および3ヶ月で屠殺後、試料を回収した。歯槽骨吸収量の評価は、マイクロCTによる解析、およびFLOVELタブレット操作型ビデオマイクロメータを用いてセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定することで行った。また、骨芽細胞活性を評価するため1型コラーゲン、ALP(アルカリホスファターゼ)、OPN(オステオポンチン)、OCN(オステオカルシン)の発現を免疫組織学的に評価した。破骨細胞活性を評価するためTRAP(酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ)染色およびカテプシンK、MMP-9(マトリックスメタロプロテアーゼ-9)、MMP-2(マトリックスメタロプロテアーゼ-2)の発現を免疫組織学的に解析した。これらよりF摂取による骨吸収、炎症、破骨細胞活性化に及ぼす影響を明らかにした。老化細胞の制御機構を明らかにするため、マウスを用いてゲノムワイドにスクリーニングを展開し老化細胞制御遺伝子を同定、さらに転写因子による歯肉上皮、骨組織への影響を明らかにしたことで、老化細胞の生理的機能の解明のみならず、異常活性および機能不全で誘発される代謝性、自己免疫性骨疾患のメカニズムを解明した。低濃度フッ化物は、将来的には歯周組織のアンチエイジングの創薬の一助となることを示唆された。

さらに、3ヶ月齢および加齢モデルの24ヶ月齢のDifferentiated Embryo Chondrocyte (Dec) 1 Knockout (KO) マウスを使用し、トータルRNAを大腿骨組織から分離した。それらの遺伝子発現およびmiRNA発現所見は、GeneSpringおよびIngenuity Pathways Analysisと組み合わせ、DNAマイクロアレイおよびmiRNAアレイを用いて解析した。遺伝子オントロジー(GO)分析は、miRNAを標的とした遺伝子の極めて重要な転写関連プロセスと細胞内シグナル伝達を組み込んでいることを明らかにした。シグナル経路で、cAMP媒介シグナル、上皮接着結合シグナル、タイトジャンクションシグナル、ギャップジャンクションシグナル、カルシウムシグナル、およびサーチュインシグナルが骨老化に関与していることも明らかにした。RT-qPCRによりさらに解析したところ、加齢の制御転写因子が、miR-100-5p, miR-181a-5p, miR-221-3p, miR-298-5p, miR-324-5p, miR-370-3p, miR-1-3p, miR-30a-3p, miR-133a-5p, miR-192-5p, and miR-193a-3pの制御に関与していることを示した。多数の組み合わせが識別されたmRNAとmiRNAの網羅的解析は、miRNAの異常発現は骨加齢において重要であることを示唆した。そして、その機能は関連シグナル上の特定遺伝子の転写を通して誘導されることが考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Kim IS, Song W, Arakawa H. The Role of Low-Level Sodium Fluoride in Periodontal Inflammation. *Journal of Hard Tissue Biology* 2019; 28(2): 159-164 doi: <https://doi.org/10.2485/jhtb.28.159> (査読有)
2. Ujjal K. Bhawal, 吉田清美, 荒川浩久. フッ化物の新たな視点 - 歯周病予防に関する研究の進展 -. *歯界展望* 2017; 130: 1031-1034 (査読有)
3. Bhawal UK, Lee HJ, Arikawa K, Shimosaka M, Suzuki M, Toyama T, Sato T, Kawamata R, Taguchi C, Hamada N, Nasu I, Arakawa H, Shibutani K. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Bhawal UK, Fujita Y, Nasu I, Arakawa H. Insights into the mechanisms of low-level fluoride in preventing periodontal disease: current status and future expectations. 13th International Conference of the Asian Academy of Preventive Dentistry, Khon Kaen, Thailand. 2018.11.21 - 2018.11.23
2. Zhang F, Bhawal UK, Taguchi C, Arikawa K, Nasu I, Arakawa H, Shibutani K. Role of stromal cell-derived factor 1 alpha and CXCR4 in Porphyromonas gingivalis-induced periodontal inflammation. 第 67 回日本口腔衛生学会・総会、札幌市教育文化会館 2018.5.18 – 2018.5.20
3. Bhawal UK, Uchiyama T, Arikawa K, Oka S, Hiratsuka K, Arakawa H, Nasu I, Shibutani K. The effects of low-power laser irradiation in submandibular glands of diabetes-induced rats. IUPS 38th World Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 2017.8.1 – 2017.8.5
4. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Uchiyama T, Hiratsuka K, Arakawa H, Nasu I. Micromolar levels of sodium fluoride promote osteoblast differentiation through Runx2 signaling. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会、山形テルサ、2017.5.31 – 2017.6.2
5. Bhawal UK, Suzuki M, Arakawa H, Shibutani K, Nasu I, Hiratsuka K. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. 95th General Session & Exhibition of the IADR, San Francisco, California, USA, 2017.3.22 – 2017.3.25
6. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Nakayama R, Nasu I, Arakawa H, Hiratsuka K. DNA microarray and MicroRNA analysis in low-level laser therapy (LLLT)-treated diabetic rat salivary glands. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会; The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry: AAPD, 東京医科歯科大学 M&D タワー 鈴木章夫記念講堂、東京、2016.5.27 – 2016.5.29
7. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Nakayama R, Nasu I, Arakawa H, Hiratsuka K. MicroRNA expression profiling and inhibition of inflammation of Korean red ginseng extract in rats on kanamycin-induced hearing loss. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会; The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry: AAPD, 東京医科歯科大学 M&D タワー 鈴木章夫記念講堂、東京、2016.5.27 – 2016.5.29
8. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Nakayama R, Nasu I, Arakawa H, Hiratsuka K. Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) is a novel negative regulator of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21) in aging mice. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会; The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry: AAPD, 東京医科歯科大学 M&D タワー 鈴木章夫記念講堂、東京、2016.5.27 – 2016.5.29
9. Bhawal UK, Arikawa K, Hamada N, Nasu I, Hiratsuka K, Arakawa H. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. 2015 FDI Annual World Dental Congress, Bangkok, Thailand 2015.9.22 – 2015.9.25

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：パワール ウジャール

ローマ字氏名：Bhawal Ujjal

所属研究機関名：日本大学

部局名：松戸歯学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 50433339

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。