

令和 元年 6 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06852

研究課題名（和文）歯周病病態における細胞内亜鉛イオンの役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of intracellular Zn<sup>2+</sup> in periodontal disease.

研究代表者

八木 寛子（Yagi, Hiroko）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20806864

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：歯根膜細胞株および歯肉上皮細胞株において、歯周病原菌であるP.gingivalis由来LPS刺激は酸化ストレスを増大することが明らかにした。酸化ストレスの増大による細胞内亜鉛イオン動態を観察するため、過酸化水素を用い検討したところ、酸化ストレスは細胞内亜鉛イオン濃度上昇を誘導した。酸化ストレスは非タンパクチオールからの亜鉛イオン遊離および細胞膜亜鉛イオン透過性亢進による細胞外からの亜鉛イオン流入を増大させることを明らかにした。更に酸化ストレスにより誘導される細胞内亜鉛イオンは酸化ストレスによるMAPKカスケード活性化およびIL-1などの炎症性サイトカインの産生に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病病態において酸化ストレスが亢進しており、酸化ストレスにより更に炎症反応が惹起される。本研究では、歯周組織構成細胞において、酸化ストレスは細胞内亜鉛イオン濃度を増加させることを明らかにした。また、酸化ストレスによる炎症性シグナル経路の活性化および炎症性サイトカインの産生は、酸化ストレスによって誘導される細胞内亜鉛イオン濃度の上昇が寄与する可能性が示唆された。このような結果は歯周病の発症および進行のメカニズムの解明の一端を担うと考えている。更に、歯周病発症メカニズムを理解することは、歯周病予防あるいは治療方法開発の足掛かりとなり、本研究は学術的および社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It was revealed that LPS from P.gingivalis stimulation increased oxidative stress in periodontal ligament cell line and gingival epithelial cell line. In this study, we elucidated using hydrogen peroxide that the relations between oxidative stress and intracellular Zn<sup>2+</sup> levels in periodontal tissue cells. These results suggested that oxidative stress elevated intracellular Zn<sup>2+</sup> concentration by promoting intracellular release of Zn<sup>2+</sup> from nonprotein thiols and membrane permeation of extracellular Zn<sup>2+</sup>. Furthermore, intracellular Zn<sup>2+</sup> increased by oxidative stress positively regulated the phosphorylation of p38 and Akt signal pathways and increased the expression of inflammatory cytokines such as IL-1b. These experimental results suggested that Zn<sup>2+</sup> may play an important role in pathological progress in periodontal disease under the oxidative stress - inflammatory signal pathway cascade.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 亜鉛イオン 酸化ストレス

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

#### 1. 研究開始当初の背景

亜鉛は生体に必須の微量元素で、細胞小胞体から遊離された亜鉛イオンがセカンド・メッセンジャーとして機能することで細胞内の恒常性を維持する (Hirano et al., 2008; Nishida and Yamasaki, 2014; Maywald and Rink, 2015)。亜鉛イオン濃度の変動は、ガン、糖尿病あるいは炎症といった様々な疾患を誘発することが報告されている (Miao et al., 2013; Nuttall and Oteiza, 2014; Takatani-Nakase et al., 2014; Nasef et al., 2017)。これまでの研究成果より、炎症状態において、組織に酸化的ストレスが生じると、細胞内の亜鉛イオン濃度が上昇し、細胞毒性が増強されること、ならびに酸化的ストレスによる細胞死を細胞内亜鉛イオンキレート剤が完全に抑制すること (Matsui et al., 2009)を明らかにしてきた (Matsui et al., 2010)。歯周病のような局所の慢性炎症状態においても、歯周組織構成細胞に酸化的ストレスが亢進することが報告されていることから (Sawamoto et al., 2005)、歯周組織構成細胞において、亜鉛イオン動態に変化が生じることで、歯周組織の破壊が誘導されることが想定できる。歯周病と亜鉛イオンの関連性については、これまでに、糖尿病既往のある慢性歯周病患者において、血清や唾液中の亜鉛イオン濃度が低下すること (Thomas B et al., 2013; Sumit Gaur and Rupali Agnihotri, 2017)、亜鉛欠乏ラットにおいて、歯周ポケットの深化が認められることが報告されている (Orbak et al., 2007; Seyedmajidi SA et al., 2014)。しかしながら、これらの報告では、歯周組織構成細胞における亜鉛イオン濃度の変化と、歯周組織の破壊の間に関連があるか否かについては明らかにされていない。以上のような背景から、歯周組織を構成する細胞、とりわけ歯肉上皮細胞および歯根膜細胞に着目し、歯周病原細菌の LPS 刺激、あるいは歯周病局所の炎症病巣で放出される炎症性サイトカインや、細胞の酸化的ストレスにより、同細胞の内亜鉛イオン動態がどのように変化するか、さらに、亜鉛イオン濃度変動により同細胞にどのような機能が誘導されるかを明らかにすることで、歯周病の病態解明に関する新たな知見が得られるのではないかとこの着想に至った。本研究において、細胞内亜鉛イオン濃度の動態変化が歯周組織の恒常性破綻にどのような影響を及ぼすかを検討することで、亜鉛イオン濃度の変化が歯周病炎症病態を誘導するメカニズムを解明する。

#### 2. 研究の目的

歯周病菌の感染により、歯周組織において免疫担当細胞が活性化し、炎症性サイトカイン産生増加あるいは酸化的ストレスの亢進が起こり、歯周病が発症・進行する。私はこれまでに、酸化的ストレスは細胞内亜鉛イオン濃度を増加させ、その細胞毒性を増強することを報告している。また、細胞内亜鉛イオン濃度上昇を抑制すると、酸化的ストレスによる細胞毒性が低下することも明らかにしている。よって、歯周病の炎症局所において、歯周組織構成細胞の細胞内亜鉛イオン動態は変動することが予測され、この亜鉛イオン動態の変動が歯周病の進行に関与する可能性が考えられる。しかし、現在のところ歯周病と亜鉛イオンの関連性は明らかにされていない。そこで、本申請研究では、歯周病の病態形成に、細胞内亜鉛イオンがどのように関連するかを検討し、歯周病の進行に関わる亜鉛イオン依存性メカニズムを明らかにすることを目指す。

#### 3. 研究の方法

歯周組織構成細胞である歯肉上皮細胞および歯根膜細胞において LPS 刺激は酸化ストレスを増加させることを、スーパーオキシドアニオン検出蛍光プローブである BES-So AM および細胞内過酸化水素を検出する蛍光プローブ BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ac を用いてフローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡にて測定・観察を行った。また、酸化ストレスを再現するため過酸化水素刺激を行い、酸化ストレスによる細胞内亜鉛イオン濃度の変化を、細胞内亜鉛イオンを検出する蛍光プローブ FluoZin-3 AM を用いてフローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡で測定・観察を行った。更に、酸化ストレスによって増加する亜鉛イオンの由来を細胞内亜鉛イオンキレート剤 TPEN および細胞外亜鉛イオンキレート剤 DTPA などを用いた時の細胞内亜鉛イオン増加を評価することで検討した。酸化ストレスによって誘導される細胞内亜鉛イオン増加による影響を、ウェスタンブロッティング法および real-time PCR 法を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

まずヒト歯根膜細胞株 (HPDL)、マウス歯根膜細胞株 (MPDL22) およびヒト歯肉上皮細胞株 (epi4) において、歯周病原細菌の感染により、細胞内の酸化的ストレスが亢進するか確認するため、各細胞に P.g - LPS 刺激を加え、細胞内にスーパーオキシドアニオンならびに過酸化水

素などの酸化ストレスが増大するか、蛍光プローブ BES-So AM および BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ac を用いて評価した。この結果、LPS 刺激により BES-So AM ならびに BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ac の蛍光増強を認めた。このことから、LPS 誘導性スーパーオキシドアニオンならびに過酸化水素の増加を確認し、歯周病原菌感染により酸化ストレスが亢進することが示唆された。更に、酸化ストレス（過酸化水素：10～1000 μM）により細胞質内亜鉛イオンが変動するか検討するために、細胞内亜鉛イオンを検出する蛍光プローブ FluoZin-3 AM を用いて検討した。この結果、酸化ストレスにより FluoZin-3 AM の蛍光増強を認めた。これは酸化ストレスにより細胞内亜鉛イオン濃度が上昇することが示唆された。また、酸化ストレス誘導性 FluoZin-3 AM 蛍光増強は、細胞内亜鉛イオンキレート剤 TPEN により減弱するが、細胞外亜鉛イオンキレート剤 DTPA では減弱しなかったことから、酸化ストレスにより、細胞内亜鉛イオン貯蔵部位からの亜鉛イオン遊離が示唆された。次に、細胞内亜鉛イオン貯蔵部位を検討するために、細胞内非タンパクチオールをモニターする蛍光プローブ CellTracker Green CMFDA を用いて検討した。この結果、酸化ストレス誘導性に細胞内亜鉛イオン濃度が上昇する条件下では、CellTracker Green CMFDA の蛍光強度は減弱した。このことから、過酸化水素は非タンパクチオールからの亜鉛イオン遊離を促進することが示唆された。更に、過酸化水素 300 μM および塩化亜鉛 30 μM の共刺激を行い、蛍光顕微鏡にて観察したところ、過酸化水素単独刺激よりも FluoZin-3 AM 蛍光強度が増強した。この結果から、酸化ストレスは細胞膜の亜鉛イオン透過性を亢進し、細胞内亜鉛イオン濃度上昇に寄与することが示唆された。以上から、酸化ストレスは細胞内亜鉛イオン貯蔵部位からの亜鉛イオンの遊離および細胞膜の亜鉛イオン透過性を亢進することによる細胞外からの亜鉛イオンの流入を促進することにより、細胞内亜鉛イオン濃度を上昇させることが示唆された。次に酸化ストレスによって誘導される細胞内亜鉛イオンの作用について、ウエスタンブロッティング法および real-time PCR 法を用いて評価した。歯根膜細胞株および歯肉上皮細胞株において、過酸化水素（300 μM）は MAPK カスケードおよび Akt シグナルの亢進を認め、細胞内亜鉛イオンキレート剤 TPEN（5～10 μM）はこれらを抑制した。また、歯肉上皮細胞において、過酸化水素は IL-1 などの炎症性サイトカインの産生を促進するが、TPEN はこれらを抑制した。以上から、酸化ストレスによって誘導される炎症性シグナルの活性化に、酸化ストレス誘導性細胞内亜鉛イオンが関与している可能性が示唆された。

## 5．主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Interaction of LEF1 with TAZ is necessary for the osteoblastogenic activity of Wnt3a  
Jumpei Kiada, Kenji Hata, Eriko Nakamura, Hiroko Yagi, Yoshifumi Takahata, Tomohiko Murakami, Yoshinobu Maeda and Riko Nishimura  
Scientific Reports 8, Article number: 10375 (2018)

### 〔学会発表〕(計 3 件)

2017 年 骨代謝学会

「Wnt アンタゴニスト FRZB の発現制御機構の解明」(口頭発表)

2017 年 秋季 歯周病学会

「Osterix-Msx2 転写因子複合体は Wnt アンタゴニスト FRZB の発現を制御する」  
(ポスター発表)

2018 年 秋季 歯周病学会

「酸化ストレスによる細胞内亜鉛イオン動態の解明」(ポスター発表)

### 〔図書〕(計 1 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 1 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 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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (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。