

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17049

研究課題名（和文）酸化ストレスが歯肉上皮タイトジャンクションに与える影響：歯周病発症予防を目指して

研究課題名（英文）Oxydative stress affects tight junction in gingival epithelium: Preventing the onset of periodontal disease

研究代表者

高知 信介 (Kochi, Shinsuke)

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：70803138

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病は細菌感染による炎症性疾患であるが、その発症のメカニズム未だには不明な点が多い。そこで本研究は、種々の疾患との関連がある酸化ストレスが、歯肉上皮細胞のバリア機能に影響を与えていると仮説をたて、その影響を調べた。その結果、歯肉上皮において、酸化ストレス刺激によるバリア機能を担うタイトジャンクションのタンパク質発現が減少し、バリア機能が低下することが分かった。また抗酸化剤の存在化では、酸化ストレスでもこれらの影響は軽減された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は、一度発症すると治療が難しいため、発症を予防することが非常に重要である。また、歯周病は世界中で最も多くの罹患者がいる疾患であり、近年では種々の全身疾患と関連するという報告がある。本研究は、歯周病の発症メカニズムを明らかにすることで、歯周病の発症予防法の確立を目指す。これを達成することで、歯周病を撲滅するだけでなく、全身の健康にも寄与することができる。

研究成果の概要（英文）：Periodontal disease is an inflammatory disease caused by bacterial infection, but the mechanism of its onset is unknown. Therefore, it was hypothesized that oxidative stress, which is associated with systemic diseases, affects the barrier function of gingival epithelial cells. As a result, it was found that the expression of tight junction proteins, which are responsible for the barrier function, is reduced by oxidative stress stimulation, and the barrier function is reduced. In addition, the presence of antioxidants reduced these effects even with oxidative stress.

研究分野：歯周病学

キーワード：酸化ストレス タイトジャンクション 歯肉上皮

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病原細菌の感染によって引き起こされる炎症性疾患である。歯肉上皮細胞は、細胞同士、および歯面と直接接着することによって、細菌が深部組織に侵入することを防ぐための最初のバリアである。しかし、細菌感染後の炎症によりこれらの接着が破壊されてしまうと、細菌が歯周組織深部まで侵入し、歯槽骨を含む歯周組織の破壊が進行する。すなわち、歯肉上皮間、また歯肉上皮と歯面との間で、正常に接着した状態を維持することは、歯周病の進行を抑制する上で大変重要である。

歯肉上皮細胞の細胞間の接着は、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、デスモゾーム結合、およびギャップジャンクションから構成される。また歯面-細胞間の接着はヘミデスモゾーム結合から構成されており、それぞれ異なる接着分子が存在する。

タイトジャンクションは細胞の最も頂端部側にある細胞結合で、claudin や occludin の接着分子により細胞同士の間隙を塞いでいる。その機能として、外部からの異物の通り抜けを阻止し、また組織内の溶液が漏れ出ないようにすることで、強固なバリアの役割を果たしている。その一方で、生体にとって有用な物質は透過させるといった相反した機能を持つ。すなわち、タイトジャンクションは固定された装置ではなく可動的な装置であり、発現や局在を変化させることによって細胞間の複雑な選択的透過性をコントロールしている (Anderson et al, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009) (図1)。しかしながら、炎症性疾患や癌に罹患すると、タイトジャンクションの結合は破壊され、細胞内外からの物質の通過を阻止できなくなり、疾患の悪性を来してしまう。

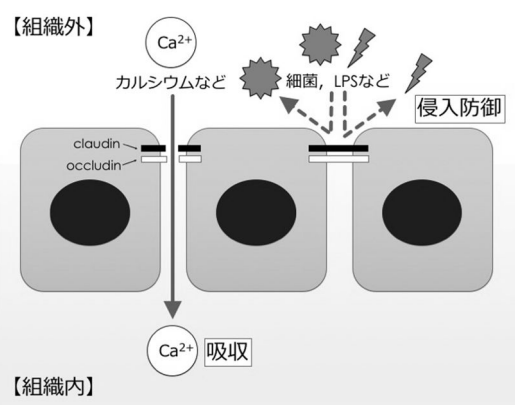


図1 タイトジャンクションにより、物質の透過性が制御されている。カルシウムなどのミネラルの一部は細胞間を容易に通過するが、有害異物はほとんど通過できない。

生命は酸素を利用することで、効率的にエネルギーを産生することが可能である。しかし、酸素の一部はその代謝過程で活性酸素に変わる。活性酸素は、生物の生命維持に重要な働きをしているが、産生が過剰になると、生体組織の酸化還元状態が乱れ、自身の細胞のDNA、脂質、酵素、さらにタンパク質といった重要な生体成分を酸化損傷する。この活性酸素が過剰に産生された状態は酸化ストレスと呼ばれ、アルツハイマー型認知症、糖尿病、さらに動脈硬化等の様々な疾患との関連が報告されている (Serra et al, *J Neurol Sci*, 2004) (図2)。また、腸管上皮細胞においては、酸化ストレスによりタイトジャンクションの制御が破綻し、細胞の接着が破壊されるとい

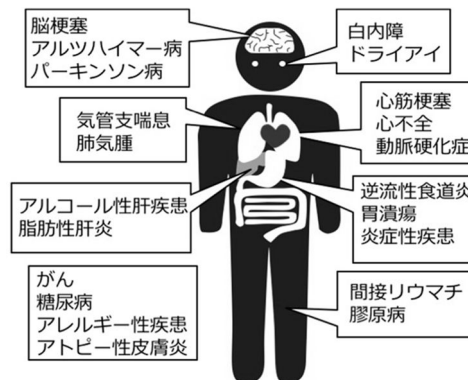


図2 酸化ストレスと関連する疾患

歯周病の重症度と活性酸素濃度の間に相関関係があること (Tamaki et al, *J Periodontol*, 2008), 歯肉に抗酸化剤を塗布することで, 歯肉の炎症が軽減したという報告 (Maruyama et al, *Arch Oral Biol*, 2011) 等, 歯周病と酸化ストレスの関係については多くの報告があり, その関連性が示唆されている。また, 歯肉上皮は歯周病原細菌に曝されることで, 免疫機能により遊走される炎症性細胞から活性酸素が産生されやすいこと (Giannopoulou et al, *Semin Immunopathol*, 2017), 嫌気性菌の代謝産物の短鎖脂肪酸により, 酸化ストレスが起こりやすいことが報告されている (落合ら, *日薬理誌*, 2014)。しかしながら, 酸化ストレスが歯肉上皮細胞のタイトジャンクションに与える影響に関する報告はない。そこで, 上述のことより, 酸化ストレスが歯肉上皮細胞のタイトジャンクションに影響を与えることで, 歯周病が進行すると仮説をたてた。(図 3)。

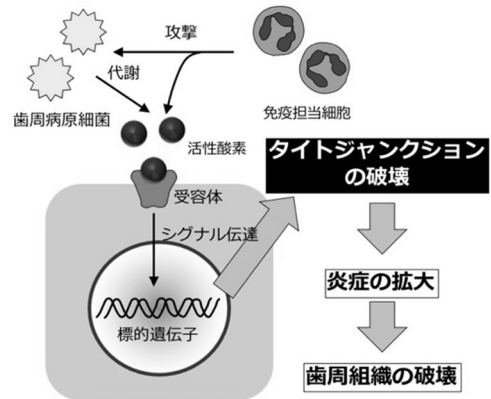


図3 本研究の仮説

2. 研究の目的

本研究の目的は, 酸化ストレスが歯肉上皮細胞のタイトジャンクションに与える影響を解明することである。この目的を達成することは, 今までに解明されなかった歯肉上皮の接着破壊の詳細のメカニズムを知ることができる。すなわち, 歯周病進行の予防, ひいては全身疾患の予防に寄与できると考えられる。

3. 研究の方法

歯肉上皮細胞の分離・培養

ヘルシンキ宣言の基本的原則に従い, 健康な歯周組織を有する者の上顎第一大臼歯の口蓋側から歯肉上皮を採取し, 細胞を分離し, 継代培養した。

酸化ストレス刺激歯肉上皮細胞の確立

培養された細胞は, ①何も処理をしないものをコントロール群, ②細胞培養培地に活性酸素の代謝産物である過酸化水素を加えて刺激したものを酸化ストレス群, ③抗酸化剤であるビタミン E を加えてから過酸化水素で刺激をしたものを抗酸化群とした。また, それぞれの条件で, 細胞の酸化度, および細胞増殖能を調べた。

酸化ストレスによるタイトジャンクションのタンパク質局在・発現の変化

上記条件で刺激による細胞上の claudin および occludin の局在, 及び発現変化を確認した。タンパク質の局在は免疫蛍光染色, 発現量はウエスタンブロッティングを用いた。

酸化ストレスによるタイトジャンクションの機能の変化

タイトジャンクションの機能解析は, 経上皮抵抗値により確認した。具体的には透過膜を装着したカップに細胞を単層培養し, 基底面と管腔面に測定機器の電極を挿入し,

電気抵抗を測定することで、細胞の物質透過性、すなわち細胞のバリア機能を評価した。

4. 研究成果

酸化ストレス刺激による歯肉上皮細胞の反応

上記の実験系において、歯肉上皮細胞の酸化ストレス刺激による酸化度、および細胞増殖能を調べた。その結果、酸化ストレス群は、コントロール群と比較して、細胞の酸化度は上昇し、細胞増殖能は低下した。その際、過酸化水素の濃度が $1.5\mu\text{M}$ の時に最も細胞に影響があった。一方で、抗酸化群ではビタミン E の存在化で過酸化水素の刺激で酸化度は上昇し、細胞増殖能は低下するものの、酸化ストレス群と比較すると、それらの影響は著名に小さかった。その際、ビタミン E の濃度が $500\mu\text{M}$ の時に最も影響が小さかった。これらの結果より、歯肉上皮細胞は酸化ストレス刺激の影響を受けて細胞の酸化度は増加し、活性化は低下した。また、抗酸化剤の存在でそれらの影響が軽減することが分かった。

酸化ストレスによるタイトジャンクションのタンパク質局在・発現の変化

酸化ストレス群で、claudin, occludin 共に免疫蛍光染色における蛍光強度は、コントロール群と比較して減弱した。一方で、抗酸化群では蛍光強度の低下は酸化ストレス群より小さかった。ウエスタンブロッティング法においては、酸化ストレス群では claudin, occludin 共にタンパク質の発現は減少し、抗酸化群ではその影響は酸化ストレス群より小さかった。これらの結果より、歯肉上皮細胞は酸化ストレス刺激の影響を受けてタイトジャンクションのタンパク質の発現や局在に大きな影響があり、抗酸化剤の存在でその影響が軽減することが分かった。

酸化ストレスによるタイトジャンクションの機能の変化

酸化ストレス群で細胞透過性は、コントロール群と比較して亢進した。一方で、抗酸化群では細胞透過性の亢進は酸化ストレス群程ではなかった。これらの結果より、酸化ストレス刺激によりタイトジャンクションのバリア機能は減弱し、抗酸化剤によりその影響が軽減することが分かった。

以上の結果より、歯肉上皮細胞のタイトジャンクションは、酸化ストレス刺激によりタンパク質の発現が減少し、バリア機能が減弱することが分かった。今後は、本研究で明らかにならなかったこれらのメカニズムを解明していきたい。それにより、歯周病発症の予防、ひいては全身疾患の予防に寄与することができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ideguchi H, Yamashiro K, Yamamoto T, Shimoe M, Hongo S, Kochi S, Yoshihara-Hirata C, Aoyagi H, Kawamura M, Takashiba S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Molecular imaging assessment of periodontitis lesions in an experimental mouse model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Oral Investig	6. 最初と最後の頁 821-827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-018-2510-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoyagi H, Yamashiro K, Hirata-Yoshihara C, Ideguchi H, Yamasaki M, Kawamura M, Yamamoto T, Kochi S, Wake H, Nishibori M, Takashiba S.	4. 巻 119
2. 論文標題 HMGB1-induced inflammatory response promotes bone healing in murine tooth extraction socket.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 5481-5490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.26710.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大久保圭祐, 高知信介, 本郷昌一, 河野隆幸, 大森一弘, 山本直史, 高柴正悟,
2. 発表標題 徹底した感染管理が垂直性骨欠損を改善する要因であった重度慢性歯周炎症例,
3. 学会等名 第62回春季歯周病学会学術大会, 2019年5月, 神奈川.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井田京佑, 大森一弘, 佐光秀文, 小林寛也, 高知信介, 河野隆幸, 山本直史, 高柴正悟,
2. 発表標題 子宮全摘出・卵巣片側摘出直後から急性化した重度慢性歯周炎症例の治療と病態考察,
3. 学会等名 第62回春季歯周病学会学術大会, 2019年5月, 神奈川.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木美奈, 山本直史, 河村麻理, 高知信介, 山城圭介, 大森一弘, 江口傑徳, 十川千春, 高柴正悟,
2. 発表標題 侵襲性歯周炎患者の血漿エクソソーム由来microRNAの発現解析,
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会, 2018年10月, 大阪.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高知信介, 久保克行, 山本直史, 高柴正悟,
2. 発表標題 侵襲性歯周炎患者の専門外来部門連携による包括的な治療と病態解析,
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会, 2018年10月, 大阪.
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------