

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791641

研究課題名（和文） 短鎖脂肪酸に着目した歯周炎骨破壊予防法の開発

研究課題名（英文） Development of preventive methods from destruction of alveolar bone during periodontal disease using short chain fatty acid

研究代表者

津田啓方（TSUDA HIROMASA）

研究成果の概要：歯周病病原細菌が産生する短鎖脂肪酸の歯槽骨破壊増強に及ぼす影響を調べようとしたが、逆の作用を示した。そこで、短鎖脂肪酸が最初に作用する歯肉上皮に及ぼす影響を調べ、歯周病予防法を考察することとした。様々な短鎖脂肪酸が歯肉上皮細胞の細胞死を引き起こした。特に酪酸の作用が強く、歯肉上皮細胞に2種類の細胞死を引き起こすことを突き止めた。この細胞死抑制による歯周病予防法開発の可能性がある事がわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：短鎖脂肪酸、細胞死、歯周炎

1. 研究開始当初の背景

（1）日本国民の約3分の1が高度かつ不可逆的な歯槽骨破壊を伴う歯周炎患者であり、歯周病予防法が望まれている。

（2）短鎖脂肪酸は歯周病病原細菌が産生し、放出する物質であり、リンパ球などに作用すると細胞死を引き起こすなど、様々な生理活性を持つ事が報告されていたが、骨への影響

を詳細に検討した報告はほとんど無かった。

（3）まず、予備実験的に骨芽細胞、破骨細胞に短鎖脂肪酸を作用させてみたところ、骨芽細胞においては細胞外マトリックス遺伝子発現を増加させ、破骨細胞においてはアポトーシス様細胞死を引き起こした。要するに、短鎖脂肪酸が歯槽骨破壊を抑制する方向に作用している事が判明した。当初はこのよう

な結果が出た時には、短鎖脂肪酸を骨破壊予防法に直接利用できるのではないかと考えていたが、短鎖脂肪酸は悪臭を伴うため、予防法としての応用は厳しいと判断した。そこで、歯周病細菌が産生する短鎖脂肪酸が最初に作用する歯肉上皮細胞に着目した。同細胞への短鎖脂肪酸の及ぼす影響を調べ、そこから歯周病予防法を考察することとした。

2. 研究の目的

上記、「研究開始当初の背景 (3)」で説明した理由により、歯周病細菌が歯肉上皮細胞へ及ぼす影響を調べ、その情報を基に歯周病予防法を考察することとした。

3. 研究の方法

(1) 歯肉上皮由来株化 Ca9-22 細胞に様々な短鎖脂肪酸を作用させたところ、細胞が培養プレートより剥離したため、それらが細胞死によるものかどうかを、蛍光色素 SYTOX Green を用いた細胞死アッセイ (以下、SYTOX Green アッセイと記す) にて検討した。

(2) SYTOX Green アッセイを用いて短鎖脂肪酸の濃度と作用時間に対する細胞死の量を定量した。以下、一番効果の強かった酪酸を用いて実験を行った。

(3) 短鎖脂肪酸が誘導した細胞死の種類を特定するために、まず、アポトーシスを疑い、細胞膜上のフォスファチジルセリンの再配分を蛍光標識アネキシン V を用いて定量し、アポトーシス抑制因子 *bcl-2* 遺伝子の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法を用いて調べた。また、アポトーシスを起こすときに活性化されるカスパーゼ 3 の活性も併せて調べた。

(4) アポトーシスに必須なカスパーゼ活性化を抑制する α -VAD-FMK を作用させ、酪酸誘導の細胞死に及ぼす影響を SYTOX Green アッセイを用いて調べた。

(5) 近年発見されたオートファジーの関与する細胞死が酪酸により誘導されているかどうかを、LC3-I 分子の LC3-II への変換、LC3-II 分子の凝集を指標として調べた。抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法を用いて調べた。

(6) オートファジー抑制剤である 3-methyladenine を作用させ、酪酸誘導の細胞死に及ぼす影響を SYTOX Green アッセイを用いて調べた。

4. 研究成果

(1) 歯肉上皮由来株化 Ca9-22 細胞の重層膜をプラスチックプレートに作成し、そこに 10 mM の酪酸 (Butyrate) を 48 時間作用させたところ、プレート底面に付着していた細胞が培養液中に浮遊している事が確認された。コントロールではそのような細胞の浮遊

は少量しか観察されなかった。

48 時間酪酸作用後、浮遊していた細胞を PBS で洗浄することにより取り除き、観察した時の写真を図 1 に示した。

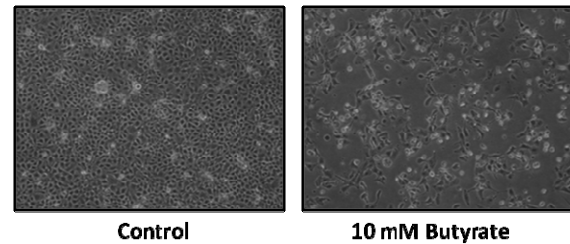


図 1 10 mM 酪酸の Ca9-22 細胞に及ぼす効果 (刺激後 48 時間)

(2) 次に、この酪酸による細胞浮遊の誘導が細胞死によるものかどうかを SYTOX Green アッセイを用いて細胞死の定量を行う事により調べた。

作用時間 48 時間においては、酪酸濃度 0.5 mM 以上で濃度依存的に Ca9-22 細胞の細胞死を誘導した (図 2)。なお、細胞死誘導を引き起こす最大濃度は 10 mM であった。また、10 mM 酪酸作用 24 時間以降においては、コントロールに比べて有意に細胞死が誘導された (図 3)。

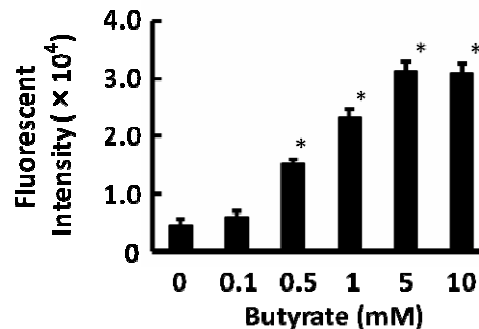


図 2 酪酸濃度依存的な細胞死誘導

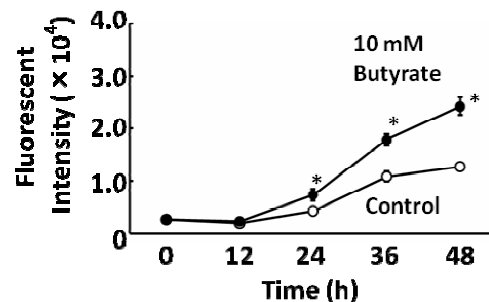


図 3 酪酸 10 mM 刺激時における細胞死の継続的変化

(3) 次に、酪酸が引き起こした細胞死がどのようなものかを調べる事とした。まずはアポトーシスを疑い、細胞膜上のホスファチジルセリンの再配分、アポトーシス抑制因子 *bcl-2* 遺伝子の発現量の定量、カスパーゼ 3

活性の測定を行った。

アポトーシス誘導により細胞膜内面のフォスファチジルセリンは細胞表面に露出する。これを蛍光色素 FITC でラベルしたアネキシン V の付着を定量した。なお、アネキシン V はフォスファチジルセリンに特異的に結合する。

10 mM 酪酸刺激では、12 時間後以降コントロールに比べてアネキシン V の細胞表面への付着が有意に増加した (図 4)。

次に、カスパーゼ 3 活性を調べたところ、10 mM 酪酸刺激 8 時間以降よりコントロールに比べカスパーゼ 3 活性が有意に高かった (図 5)。

さらに、アポトーシス抑制因子である *bcl-2* 遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR で調べた。10 mM 酪酸刺激 4 時間以降において *bcl-2* mRNA 発現は刺激後 0 時間と比較して有意に抑制された (図 6)。

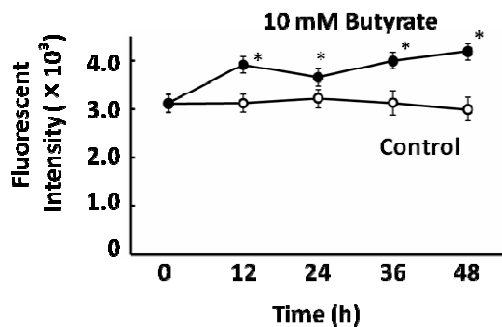


図 4 酪酸 10 mM 刺激時におけるアネキシン V の細胞表面への付着の経時的変化

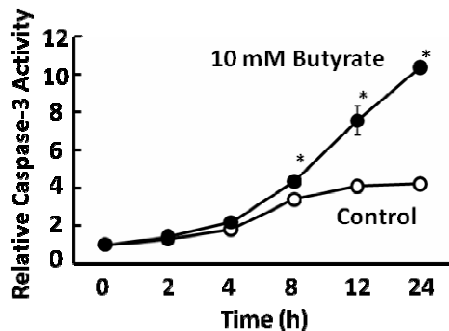


図 5 酪酸 10 mM 刺激時におけるカスパーゼ 3 活性の経時的変化

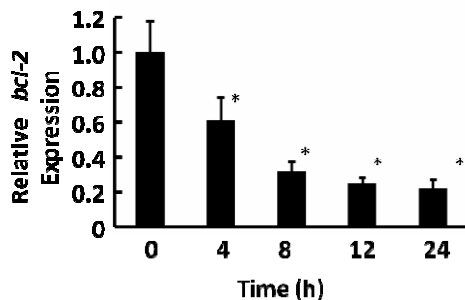


図 6 酪酸 10 mM 刺激時における *bcl-2* 遺伝子発現の経時的変化

(4) カスパーゼの活性化はアポトーシス誘導に必要である。そこで、酪酸刺激による細胞死誘導が全てアポトーシスによるものかどうかを汎カスパーゼ抑制剤を作用させることにより調べた。

カスパーゼ抑制剤 Z-VAD-FMK の存在下で酪酸刺激による細胞死を SYTOX Green アッセイを用いて定量した。酪酸によるカスパーゼ 3 活性の誘導を完全に抑制する 10 μ M Z-VAD-FMK 存在下では細胞死は 25% 程度しか抑制されなかった (図 7、図 8) これにより、酪酸誘導による細胞死においてアポトーシスの関与は非常に少ない事がわかった。

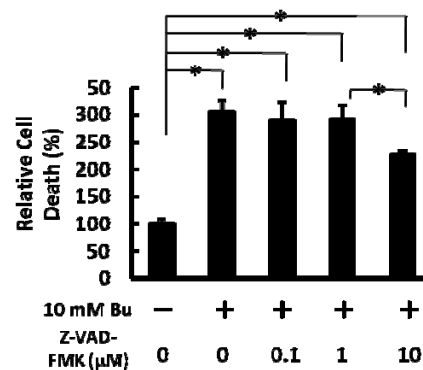


図 7 10 mM 酪酸誘導細胞死におけるカスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK の影響 (SYTOX Green アッセイ)

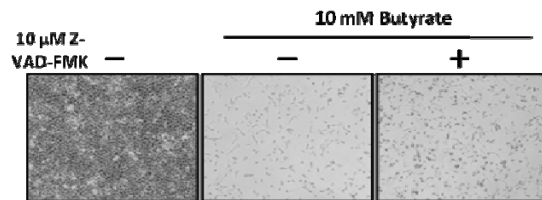


図 8 10 mM 酪酸誘導細胞死におけるカスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK の影響 (光学顕微鏡像)

(5) そこで、アポトーシス以外の細胞死がどのような種類の細胞死かを調べる事とした。近年、プログラムされた細胞死として、オートファジーを介する細胞死が報告されているので、それを調べる事とした。

オートファジーの第一の指標として、まず、抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロットで LC3-I 分子の LC3-II への変換を確認したところ、酪酸刺激 4 時間以降において LC3-II 分子の増加を確認した (図 9)。また、抗 LC3 抗体を用いた免疫染色でオートファジーのもう一つの指標である LC3-II 分子の細胞質内での凝集を調べたところ、凝集の増強を確認できた (図 10)。

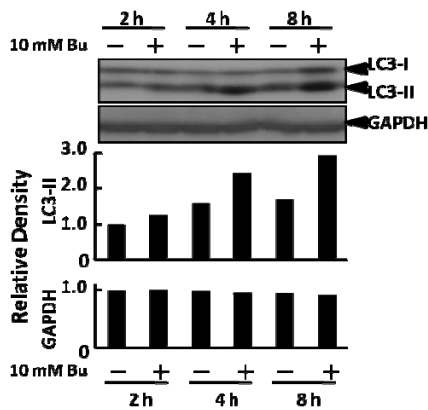


図9 10 mM 酪酸刺激後の LC3-I、LC3-II、GAPDH のタンパク発現のウエスタンブロット像と各バンド強度のデンストメトリー計測

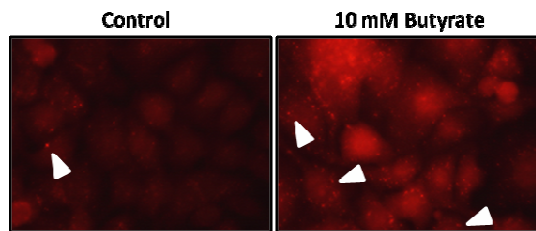


図10 10 mM 酪酸による LC3 分子細胞質内凝集への影響 (矢印は凝集像)

(6) 最後にオートファジー抑制剤である 3-methyladenine を用いて、オートファジーを抑制したときの酪酸誘導細胞死がどのようになるかを調べた。3-methyladenine (3MA) は 10 mM 酪酸誘導細胞死を 3MA 濃度依存的に抑制した (図11)。

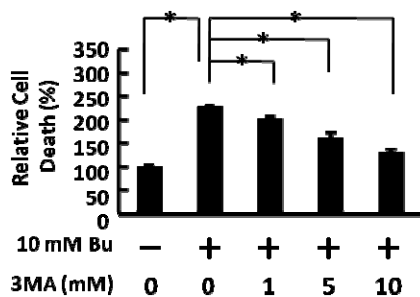


図11 3-methyladenine の 10 mM 酪酸誘導細胞死に及ぼす影響

(7) 以上の結果より、酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸は歯肉上皮細胞の細胞死を引き起こす事がわかった。特に、作用の強かった酪酸はアポトーシスとオートファジーを経由する細胞死を引き起こす事がわかった。

これにより、以下の3点が歯周病予防を考えるためのポイントであると考察された。

- ① 歯周病細菌による短鎖脂肪酸の産生抑制
歯周病細菌の短鎖脂肪酸産生に関与する因子を同定し、それを阻害する薬剤等を探索する
- ② 短鎖脂肪酸の不活化
短鎖脂肪酸の上皮細胞への作用を阻害する。
- ③ 上皮細胞における短鎖脂肪酸誘導細胞死シグナル伝達の阻害
短鎖脂肪酸刺激により入るシグナル伝達経路を阻害する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

① HIROMASA TSUDA

Butyrate, bacterial metabolite, induces apoptosis and autophagic cell death.

87th International Association for Dental Research (April, 3rd, 2009, Miami, FL, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 啓方 (TSUDA HIROMASA)

日本大学・歯学部・助手

研究者番号：60325470

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：