

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10150

研究課題名(和文) フッ素による歯周病態のメタボリックコントロールを目指す基礎研究

研究課題名(英文) Metabolic control of periodontal fibrotic diseases by fluorides: A basic study

研究代表者

大杉 綾花(堀綾花)(Osugi, Ayaka)

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：80828715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は抗う蝕作用を持つフッ素イオンが歯周組織の線維化を抑制するかを検証することであった。研究の結果、フッ化ナトリウム(NaF)が線維化分子cellular communication network factor (CCN)2の遺伝子発現を誘導し、抗線維化分子CCN3の発現には有意な影響を及ぼさない一方で、NaFはTGF-betaによる線維化誘導によって発現が上昇した型コラーゲン遺伝子を仮説通りに抑制することが、いずれの線維芽細胞でも確認された。以上の結果から、NaFの、CCN2を介さない未知のメカニズムによる線維化抑制作用をが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フッ素イオンは初期う蝕予防に小児歯科領域で広く応用されており、多くの歯磨材にも配合され一般に使用されている。また、歯肉の線維化は全身的薬物投与の副作用として、またニコチンなどの外的局所要因によっても誘起され、歯周炎の病態に深刻な影響を与える。本研究ではこのフッ素の歯周組織に対する作用を詳細に検証し、そのメカニズムを解明した。その結果、フッ素イオンが歯周組織の線維化を抑制する可能性を見出した。この研究成果よりすでに広く用いられているフッ素による「歯牙と歯周組織の同時ケア」という発展的新予防・治療法の確立に向けて科学的基礎を築くことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to verify whether fluorine ions, which have an anti-cariogenic effect, suppress the fibrosis of periodontal tissue. Studies have shown that sodium fluoride (NaF) induces gene expression of the fibrotic molecule, cellular communication network factor (CCN) 2, and has no significant effect on the expression of the anti-fibrotic molecule CCN3. However, NaF suppresses the type I collagen gene, whose expression was increased by the induction of fibrosis by TGF-beta, as hypothesized. Taken together, it was found that NaF confers a fibrosis-suppressing effect through an unknown mechanism, which is not mediated by CCN2.

研究分野：歯周病

キーワード：歯肉 線維化 CCN2 CCN3 フッ素イオン

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

フッ素イオンは初期う蝕予防に小児歯科領域で広く応用されており、多くの歯磨材にも配合され一般に使用されている。研究開始時に申請者らが、このフッ素イオンがう蝕だけでなく同時に歯周組織の線維化をも抑制する可能性を見出した。歯肉の線維化は全身的薬物投与の副作用として、またニコチンなどの外的局所要因によっても誘起され、歯周炎の病態に深刻な影響を与える。本研究ではこのフッ素の歯周組織に対する作用を詳細に検証し、そのメカニズムを解明する。そしてすでに広く用いられているフッ素による「歯牙と歯周組織の同時ケア」という発展的新予防・治療法の確立に向けて科学的基礎を築く。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フッ素が線維化のメディエーター、CCN2に多面的に拮抗することで歯周組織の線維化を抑制することを実証し、その臨床応用を目指すことである。このためまず低濃度フッ素が軟骨細胞様細胞株だけでなく線維芽細胞株に対しても、CCN2発現低下とCCN3発現上昇を引き起こすかを、確認する。次に成長因子やニコチン添加で誘導した線維化形質が、フッ素処理によって減弱するか否かを検証する。続いてここまでで得られた成果が、ヒト歯肉正常線維芽細胞、および歯根膜線維芽細胞を用いて再現されるかを検討する。そして最終的には歯肉増殖モデルマウスを用いて、フッ化物の局所間欠適用が歯肉増殖症の病態に与える影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) マウス線維芽細胞株を用いたフッ素のCCN3誘導能力の確認：ヒト軟骨細胞様HCS-2/8細胞株で実証されている効果を代表的なマウス胎児由来線維芽細胞株、NIH-3T3を用いて確認する。NIH-3T3を通法により培養し、フッ化ナトリウム (NaF) を 1mM及び 5mMの濃度で添加する。添加後12時間、24時間後に細胞を回収、RNAを抽出して定量リアルタイム PCR法CCN2/3mRNAを未添加群とともに比較定量する。

(2) In vitro線維化モデルを用いたフッ素の抗線維化作用の検証：NIH-3T3細胞にTGF- β を作用させ、線維化形質を誘導し、type I collagenならびにalpha-smooth muscle actin (SMA)遺伝子発現量を指標に確認する。確認後同じ実験系で、線維化誘導と同時に（予防的に）、及び誘導後24時間の時点で（治療的に）NaFを（1）と同様に添加し、12、24時間後に細胞を回収して同様にmRNAを定量する。

(3) ヒト正常歯肉および歯根膜線維芽細胞を用いたフッ素の効果確認：正常歯肉および歯根膜線維芽細胞を用いて1、2と同様の検証を行う。ヒト正常細胞は、岡山大学医療系部局生命倫理審査委員会研究倫理審査専門委員会の承認を得た実験計画に基づき、提供者のインフォームド・コンセントの元に分離、培養系に持ち込む。具体的には正常第3大臼歯、もしくは歯科矯正治療に伴う便宜抜歯に伴い得られる歯肉および歯根膜細胞から、培養系にoutgrowthしてくる線維芽細胞を用いて実験に供する。実験方法は1および2の実験に準ずる。

(4) マウス歯肉増殖症モデルに対するフッ素局所間欠投与の効果検証：3の実験でNaFが線維化を抑制する効果が確認された場合、マウスを用いたin vitro検証に進む。具体的にはC57BL/6jマウス第2大臼歯を絹糸で結紮し歯肉炎を誘発する。そして一週間後から、シクロスポリンAを腹腔内に毎日投与して歯肉増殖症を誘発・維持する。NaFは無香料ハイドロゲルに500ppm, 1000ppm,1500ppmを配合し、歯肉増殖症部位および周辺に塗布することで投与する。これを4週間継続し、肉眼的観察の後毎週組織切片とRNAを各群から採取・調製する。調製した組織切片

に対して化学的・免疫組織学的染色を行い線維化の程度と、関連タンパク質の組織内局在を明らかにする。また関連タンパク質mRNAの定量を同時に採取したRNAを用いて行い、組織学的所見の裏付けを得る。

(5) 橋渡し研究に向けての展開：4で実験したNaF用量は、現在市販されている歯磨材への配合量を基準にしている。この効果が期待された場合、当該歯磨材メーカーと連携の元、臨床研究の計画に着手する。 _

4. 研究成果

本研究の目的は抗う蝕作用を持つフッ素イオンが歯周組織の線維化を抑制するかを検証することである。

研究の結果、フッ化ナトリウム (NaF) が線維化分子 **cellular communication network factor (CCN)2** の遺伝子発現を誘導し、抗線維化分子 **CCN3** の発現には有意な影響を及ぼさないこと、一方驚いたことにNaFはTGF- β による線維化誘導によって発現が上昇したI型コラーゲン遺伝子を仮説通りに抑制することが、いずれの線維芽細胞でも確認された。このことよりNaFの、CCN2を介さない未知のメカニズムによる線維化抑制作用を示唆することがわかった。

また、以上の mRNA レベルに加えて、さらにNaFによる線維化、つまりI型コラーゲン産生抑制作用をタンパク質レベルで確認するとともに、不死化ヒト歯肉線維芽細胞の性状解析に取り組んだ。前者はヒト歯肉線維芽細胞培養上清に放出されたI型コラーゲンをELISA法により測定することで、後者は長期培養で細胞増殖と、不死化に用いたSV40 large T antigen と human papilloma virus 16 E6/E7 遺伝子の発現量を経時的にモニターすることで評価した。ELISA法による予備実験で、ヒト歯肉線維芽細胞が確かにI型コラーゲンを培養上清中に産生していることは確認できた。今後は本実験にてNaFの効果の評価が求められる。最終的には歯肉増殖モデルマウスを用いて、フッ化物の局所間欠適用が歯肉増殖症の病態に与える影響を評価する。

これらを解明することで目的としていたすでに広く用いられているフッ素による「歯牙と歯周組織の同時ケア」という発展的新予防・治療法の確立に向けて科学的基礎を築く。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizukawa Tomomi, Nishida Takashi, Akashi Sho, Kawata Kazumi, Kikuchi Sumire, Kawaki Harumi, Takigawa Masaharu, Kamioka Hiroshi, Kubota Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 RFX1 mediated CCN3 induction that may support chondrocyte survival under starved conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30348	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 Elseoudi Abdellatif, Nishida Takashi, Mizukawa Tomomi, Hattori Takako, Kawata Kazumi, Taha Eman A., Takigawa Masaharu, Kubota Satoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Bipartite regulation of cellular communication network factor 2 and fibroblast growth factor 1 genes by fibroblast growth factor 1 through histone deacetylase 1 and fork head box protein A1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 81 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-020-00600-4	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 Kuwahara Miho, Kadoya Koichi, Kondo Sei, Fu Shanqi, Miyake Yoshiko, Ogo Ayako, Ono Mitsuaki, Furumatsu Takayuki, Nakata Eiji, Sasaki Takako, Minagi Shogo, Takigawa Masaharu, Kubota Satoshi, Hattori Takako	4. 巻 21
2. 論文標題 CCN3 (NOV) Drives Degradative Changes in Aging Articular Cartilage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7556 ~ 7556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207556	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 Nishida Takashi, Kubota Satoshi	4. 巻 56
2. 論文標題 Roles of CCN2 as a mechano-sensing regulator of chondrocyte differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 119 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2020.07.001	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 Akashi Sho, Nishida Takashi, Mizukawa Tomomi, Kawata Kazumi, Takigawa Masaharu, Iida Seiji, Kubota Satoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Regulation of cellular communication network factor 2 (CCN2) in breast cancer cells via the cell-type dependent interplay between CCN2 and glycolysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 280 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.07.001	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 Ohkawara Bisei, Kobayakawa Akinori, Kanbara Shunsuke, Hattori Takako, Kubota Satoshi, Ito Mikako, Masuda Akio, Takigawa Masaharu, Lyons Karen M, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 21
2. 論文標題 CTGF/CCN2 facilitates LRP4 mediated formation of the embryonic neuromuscular junction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48462 ~ e48462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201948462	査読の有無 無
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 Hoshijima Mitsuhiro, Hattori Takako, Aoyama Eriko, Nishida Takashi, Kubota Satoshi, Kamioka Hiroshi, Takigawa Masaharu	4. 巻 21
2. 論文標題 Roles of Interaction between CCN2 and Rab14 in Aggrecan Production by Chondrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2769 ~ 2769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082769	査読の有無 無
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 Nishida T, Nagao Y, Hashitani S, Yamanaka N, Takigawa M, Kubota S	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppression of adipocyte differentiation by low-intensity pulsed ultrasound via inhibition of insulin signaling and promotion of CCN family protein 2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.29680	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 Ito Y, Ito T, Yamashiro K, Mineshiba F, Hirai K, Omori K, Yamamoto T, Takashiba S	4. 巻 108
2. 論文標題 Antimicrobial and antibiofilm effects of abietic acid on cariogenic <i>Streptococcus mutans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 57-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-019-00456-0	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 Nishida T, Kubota S, Yokoi H, Mukoyama M, Takigawa M	4. 巻 9
2. 論文標題 Roles of matricellular CCN2 deposited by osteocytes in osteoclastogenesis and osteoblast differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47285-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono S, Nakayama M, Tachibana M, Shahriar ASM, Helling W, Takashiba S, Ohara N	4. 巻 73
2. 論文標題 Construction and characterization of a PGN_0297 mutant of <i>Porphyromonas gingivalis</i> : Evidence of the contribution of PGN_0297 to gingipain activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama	6. 最初と最後の頁 315-323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18926/AMO/56933	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20件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 水川朋美、西田 崇、明石 翔、堀 綾花、高柴正悟、上岡 寛、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞での解糖活性によるCCN3遺伝子の発現調節
3. 学会等名 第61回日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田 崇、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 CCN2の核移行による線維化の制御
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水川朋美、西田 崇、上岡 寛、久保田聡
2. 発表標題 フッ素イオンによるCCNファミリー遺伝子の制御を介した歯肉線維化抑制効果の検証
3. 学会等名 第79回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水川朋美、西田 崇、明石 翔、上岡 寛、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるエネルギー代謝不全時でのCCN3増産システムの解明
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田 崇、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 LIPUSによる脂肪細胞分化の抑制と骨芽細胞分化への影響
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤 星、服部高子、桑原実穂、Fu Shanqi、西田 崇、吉岡洋祐、森谷徳文、飯田征二、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 Non-coding RNAを介したメトホルミンの抗線維化作用の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑原実穂、近藤 星、Fu Shanqi、大野充昭、古松毅之、中田英二、皆木省吾、滝川正春、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 軟骨組織におけるCCN3の老化促進作用
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑原実穂、武内聡子、近藤 星、Fu Shanqi、大野充昭、古松毅之、中田英二、滝川正春、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 軟骨細胞老化促進因子としてのCCN3
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川朋美、西田 崇、明石 翔、上岡 寛、滝川正春、久保田 聡
2. 発表標題 軟骨細胞における解糖系によるCCN3遺伝子発現制御メカニズム
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川崇典、西田 崇、大野充昭、宝田剛志、Ha Thi Thu Nguyen, 栗原慎之介、古松毅之、村瀬友里香、滝川正春、大橋俊孝、上岡 寛、久保田聡
2. 発表標題 ヒト骨格形成細胞分化におけるurothelial cancer-associated 1(UCA1)長鎖ノンコーディングRNAの生理的役割
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizukawa Tomomi, Nishida Takashi, Akashi Sho, Kamioka Hiroshi, Takigawa Masaharu, Kubota Satoshi
2. 発表標題 Regulation of CCN3 gene expression by glycolytic activity in chondrocytes
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kubota S, Ishikawa T, Mizukawa T, Kondo S, El-Seoudi A, Nishida T, Hattori T, Kawata K, Furumatsu T, Takarada T, Ono M, Takigawa M
2. 発表標題 Long noncoding RNAs that regulate CCN2
3. 学会等名 The 10th International Workshop of CCN Family of Genes (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishida T, Kubota S, Yokoi H, Mukoyama M, Takigawa M
2. 発表標題 Role of CCN2 produced by osteocytes in bone remodeling
3. 学会等名 The 10th International Workshop of CCN Family of Genes (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河田かずみ、久保田聡、滝川正春
2. 発表標題 癌抑制遺伝子PDGFRLはCCN2、CCN3による軟骨細胞増殖と分化の制御を抑制する。
3. 学会等名 第11回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河田かずみ、久保田聡、滝川正春
2. 発表標題 癌抑制遺伝子PDGFRLはCCN2、CCN3のデコイ受容体として軟骨細胞増殖と分化を制御する。
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田崇、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 Angiotensin IIIによる軟骨変性作用とそのCCN2による制御機構
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村瀬友里香、青山絵理子、鈴木康弘、佐々木朗、久保田聡、佐藤靖史、滝川正春
2. 発表標題 軟骨細胞の分化過程におけるCCN2の発現変動の意義
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河田かずみ、久保田聡、滝川正春
2. 発表標題 CCN2、CCN3による軟骨細胞増殖と分化の制御を抑制する癌抑制遺伝子PDGFRL
3. 学会等名 第40回岡山歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水川朋美、西田崇、明石翔、堀彩花、高柴正悟、上岡寛、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 フッ素イオンによるCCNファミリー遺伝子の制御
3. 学会等名 第40回岡山歯学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水川朋美、西田崇、明石翔、堀彩花、高柴正悟、上岡寛、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞での解糖活性によるCCN3遺伝子の発現調節
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	高柴 正悟 (Takashiba Shogo) (50226768)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	久保田 聡 (Kubota Satoshi) (90221936)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

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