

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18990

研究課題名(和文)機能性メタボライトの抗酸化作用による歯周炎抑制効果の検討

研究課題名(英文)Development of Periodontal treatment by antioxidant effect using a functional metabolite

研究代表者

松川 由実(松田由実)(Matsukawa, Yumi)

新潟大学・歯学部総合病院・医員

研究者番号：30804554

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):乳酸菌が脂質の代謝過程で産生するオキソ脂肪酸であるKetoCは肝臓において抗酸化作用を有することが報告されている。本研究では、KetoCの歯肉上皮における抗酸化作用と、歯周炎病態形成への関与について明らかにすることを目的とした。結果から、KetoCは、歯肉上皮細胞において抗酸化作用を有し、そのメカニズムとして、脂肪酸受容体GPR120を介したERKのリン酸化、Nrf2-ARE経路の活性化が関与することが明らかとなった。さらに、実験的歯周炎モデルマウスに対するKetoC投与が、口腔内のP. gingivalis数を減少させ、歯槽骨吸収を抑制することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、機能性メタボライトKetoCの歯肉上皮における抗酸化作用が明らかとなった。脂肪酸由来の機能性メタボライトによる多彩な生体防御作用を、様々な全身疾患の予防・治療に応用しようとする報告は年々増加しているが、口腔内における臨床応用に関する報告はまだ多くない。また、過度の酸化ストレスは、糖尿病や動脈硬化症などの多くの全身疾患の発症・進行にも関与することが知られており、本研究の成果は歯周炎治療のみならず、酸化ストレス関連疾患の予防・治療やアンチエイジングの創薬開発に将来的につながる可能性があるという点において、学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文):10-oxo-trans-11-octadecenoic acid (KetoC), known as a bioactive metabolite generated by intestinal microorganisms, has been reported to have an anti-oxidative property in human liver cell line via the Nrf2-ARE signaling pathway. However, the anti-oxidative function of KetoC in gingival epithelial cells (GECs) and its upstreaming signaling pathway still remain to be elucidated. Therefore, we investigated the antioxidant effect of KetoC on GECs and a mouse model of periodontitis in this present study.

We found that KetoC exerts a protective function against the oxidative stress in GECs through GPR120-dependent ERK-Nrf2-ARE signaling. Further, KetoC attenuated alveolar bone destruction and suppressed P. gingivalis in a mouse model of periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 歯周炎 メタボライト 抗酸化 機能性脂肪酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命活動によるエネルギー産生に伴い産生される活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)・フリーラジカルによる酸化ストレスは、糖尿病、動脈硬化症、高血圧症などの生活習慣病の発症・進行に関与することが知られている。生活習慣病のひとつである歯周炎も例外ではなく、歯周炎罹患者は非罹患者と比較して、唾液・血清・歯肉溝滲出液に含まれる酸化ストレス関連タンパク量が有意に高いこと、抗酸化ストレス因子を欠損させたマウスは野生型マウスと比較して、実験的歯周炎モデルにおける歯槽骨破壊が亢進することが報告されており、酸化ストレス/抗酸化ストレス応答のバランスが歯周炎の病態形成に関係していることが強く示唆されている。その一方で、これまでの歯周炎予防・治療法の主体は歯周病原細菌をいかに減らすかをターゲットとしたものであり、炎症誘発因子である細菌性プラークの除去を目的とした歯磨きやスクレーピング等の機械的方法あるいは抗菌薬を用いた化学的方法によるプラークコントロール以外に決定的予防・治療法がないのが現状である。しかしながら、超高齢化社会を迎えた本邦では自ら口腔管理できない歯周炎患者が増加しているだけでなく、現代の医療現場における薬剤耐性菌の問題は深刻であり抗菌薬使用の厳格化が求められていることから、細菌側ではなく宿主側をターゲットとした新たな歯周炎予防・治療法の開発が社会的に重要な課題である。

近年の解析技術の飛躍的な進歩によって、網羅的にメタボライトプロファイルを明らかにするメタボローム解析が一般的となり、宿主に対して生理活性を有する多種多様な機能性メタボライトが発見されている。その中でも、腸内に常在する乳酸菌 *Lactobacillus* は脂肪酸であるリノール酸をオレイン酸に代謝する過程で様々なメタボライトを産生することが知られており、オキソ脂肪酸である KetoC (10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid) が肝臓において抗酸化作用を有すること、水酸化脂肪酸である HYA (10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid) が腸上皮バリア機能保護、腸管免疫制御作用を有することが報告されている。

この脂肪酸代謝経路に関与する酵素は、腸内の乳酸菌のみならず口腔常在細菌である *Lactobacillus salivarius* も保有していることから、申請者はこれらの機能性メタボライトが歯周炎の病態形成にも関与すると考え、これまで研究を進めてきた。その中で、歯肉上皮細胞において脂肪酸受容体として知られる G タンパク共役受容体 (GPR) が発現していること、HYA が歯肉上皮バリア機能保護作用を有することを明らかにした。外界とのインターフェイスである歯肉上皮は外来性の酸化ストレス誘導因子に常に晒されていることから、歯肉上皮細胞における酸化ストレスを抑制することは臨床的に高い意義を持つと考えられるが、KetoC の歯肉上皮における抗酸化作用と、歯周炎病態形成への関与は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機能性メタボライト KetoC の歯肉上皮細胞における抗酸化作用を明らかにすることで、歯周炎に対する抑制効果を検討することである。

3. 研究の方法

【In vitro 実験】

(1) KetoC による歯肉上皮細胞における抗酸化作用の解明

株化したヒト歯肉上皮細胞 (Epi 4) をコンフルエントになるまで培養し、強力な酸化剤である TBHP を培養液中に添加することで ROS 産生による酸化ストレスを誘導した。酸化ストレスの評価は、ROS 産生に反応して蛍光を発するプローブを用いて、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーによって定性的・定量的評価を行った。KetoC の前処置における ROS 産生の抑制効果を比較検討した。

(2) KetoC による抗酸化作用の分子メカニズムの解明

抗酸化ストレス応答は、転写因子 Nrf2 が ARE プロモーター領域に結合し、抗酸化ストレス関連酵素の遺伝子発現を誘導することで生じる。そこで、Epi 4 を KetoC で刺激後、全 RNA を抽出し、主要な抗酸化ストレス関連酵素である HMOX-1, NQO1 の遺伝子発現を real-time PCR 法にて解析した。同時に経時的に核タンパクを抽出後、ウェスタンブロッティング法にて Nrf2 の核内移行を観察した。また、ARE プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイによって評価した。さらに、GPR 受容体タンパク活性から転写因子 Nrf2 の核内移行を制御する細胞内シグナリング経路を明らかにする目的で、MAP キナーゼカスケードに注目し、ERK, JNK, p38 の発現変動をウェスタンブロッティング法にて解析した。最後に、脂肪酸受容体 GPR の関与についてルシフェラーゼアッセイにて検証した。これらの検討においては、抗酸化作用を有することが既に知られているスルフォラファンをポジティブコントロールとして用いた。

【In vivo 実験】

(3) KetoC による歯周炎抑制効果の解明

次に、実際の歯周炎病態形成における KetoC の作用を明らかとする目的で、結紮誘導歯周炎モデルを用いた検討を行った。8 週齢の C57BL/6 マウスに KetoC を飲水投与し、7 日目に上顎第

二臼歯を 5-0 絹糸にて結紮, 同日から歯周病原細菌 *P. gingivalis* を 3 日毎に経口投与することで歯周炎を発症させ, 14 日目に安楽死させてサンプリング後, 各種解析を行った。歯周炎の重症度は, 実体顕微鏡を用いた歯槽骨破壊レベルと歯周組織 H-E 染色による軟組織の破壊程度によって評価した。また酸化ストレスの評価は, 酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の組織上での発現量と, 歯肉組織サンプル中の抗酸化ストレス関連酵素の遺伝子発現およびタンパク発現を real-time PCR 法およびウェスタンブロッティング法にて比較検討した。

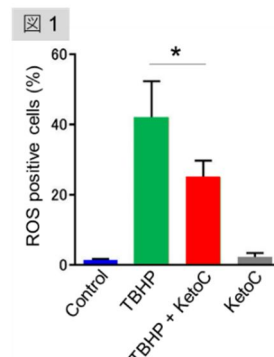
4. 研究成果

【In vitro 実験】

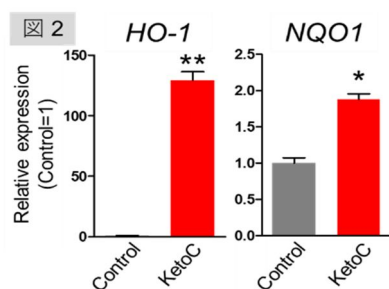
(1) KetoC による歯肉上皮細胞における抗酸化作用の解明

強力な酸化剤である TBHP を epi 4 の培養液中に添加することで誘導される ROS 産生を, ROS 産生に反応して蛍光を発するプローブを用いて, 蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーによって評価した。結果から, ROS 陽性細胞率は TBHP により増加し, KetoC の前処置により有意に減少した (図 1)。

この結果より, KetoC は歯肉上皮細胞における酸化ストレス反応を抑制することが示唆された。



(2) KetoC による抗酸化作用の分子メカニズムの解明

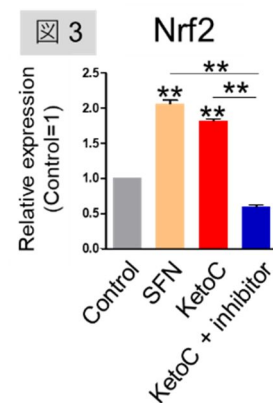


次に, メカニズムの解明のために, epi 4 を KetoC で刺激した場合の抗酸化ストレス関連酵素 HO-1 と NQO1 の遺伝子発現を real-time PCR 法にて解析したところ, KetoC 刺激による有意な発現レベルの上昇を認めた (図 2)。

続いて, これらの遺伝子発現を誘導することが知られている転写因子 Nrf2 の核内移行の有無をウェスタンブロッティング法にて検証したところ, KetoC 刺激によって, 抗酸化作用を持つことがすでに知られているスルホラファンと同程度の Nrf2 の核内移行が確認され, ルシフェラーゼアッセイによって核内移行した Nrf2 がプロモーターの ARE 領域と結合していることも分かった。

また, Nrf2-ARE を活性化する上流のシグナリングを検証する目的で, MAP キナーゼカスケードに注目しウェスタンブロッティング法にて解析したところ, KetoC 刺激による ERK のリン酸化の亢進を認めた。さらに, KetoC 刺激によって誘導される Nrf2 の核内移行が ERK 依存性であるかを検証するために, ERK 阻害剤で前処置後, KetoC 刺激を行い, 核内の Nrf2 レベルを評価したところ, KetoC 刺激によって増加した Nrf2 は ERK の阻害によって有意に抑制された。これらのことから, Nrf2 の上流には ERK が関与することが示唆された (図 3)。

最後に, KetoC の受容体として報告されている脂肪酸受容体 GPR120 の関与についてルシフェラーゼアッセイにて検証したところ KetoC が GPR120 を介して Nrf2-ARE 経路を活性化することが明らかとなった。以上の結果より, 機能性メタボライト KetoC は, 歯肉上皮細胞において, GPR120-ERK-Nrf2-ARE 経路を介して抗酸化ストレス応答を誘導することが示唆された。



【In vivo 実験】

(3) KetoC による歯周炎抑制効果の解明

KetoC の抗酸化作用が歯周炎の病態形成に与える影響について歯周炎モデルマウスを用いて検証したところ, KetoC が歯周炎組織における炎症および歯槽骨吸収を抑制することが明らかとなり, 実験的歯周炎の発症・進行に対する抑制効果を有することが示された。しかし, そのメカニズムとして KetoC の抗酸化作用が関連しているかどうかを立証することはできなかった。一方, KetoC 投与によって歯周炎モデルのマウスの口腔内における *P. gingivalis* が減少することが明らかとなり, KetoC の抗菌作用の関与が示唆された。

<引用文献>

Sulijaya B *et al.* 『Antimicrobial function of the polyunsaturated fatty acid KetoC in an experimental model of periodontitis』 *J Periodontol*, 2019.

Mai Yokoji-Takeuchi *et al.* 『A bacterial metabolite induces Nrf2-mediated anti-oxidative responses in gingival epithelial cells by activating the MAPK signaling pathway』 *Archives of Oral Biology*, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Sulijaya Benso, Yamada Hara Miki, Yokoji Takeuchi Mai, Matsuda Matsukawa Yumi, Yamazaki Kyoko, Matsugishi Aoi, Tsuzuno Takahiro, Sato Keisuke, Aoki Nonaka Yukari, Takahashi Naoki, Kishino Shigenobu, Ogawa Jun, Tabeta Koichi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 90
2. 論文標題 Antimicrobial function of the polyunsaturated fatty acid KetoC in an experimental model of periodontitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1470 ~ 1480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.19-0130	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 Yokoji-Takeuchi Mai, Tabeta Koichi, Takahashi Naoki, Arimatsu Kei, Miyazawa Haruna, Matsuda-Matsukawa Yumi, Sato Keisuke, Yamada Miki, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 5
2. 論文標題 Indirect regulation of PCSK9 gene in inflammatory response by Porphyromonas gingivalis infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01111 ~ e01111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e01111	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 Aoki Nonaka Yukari, Tabeta Koichi, Yokoji Mai, Matsugishi Aoi, Matsuda Yumi, Takahashi Naoki, Sulijaya Benso, Domon Hisanori, Terao Yutaka, Taniguchi Masayuki, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 90
2. 論文標題 A peptide derived from rice inhibits alveolar bone resorption via suppression of inflammatory cytokine production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1160 ~ 1169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.18-0630	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sato K, Matsuda Y, Yamada-Hara M, Yokoji M, Tsuzuno T, Matsugishi A, Yamazaki K, Tabeta T, Yamazaki K.
2. 発表標題 Dysbiosis of Gut microbiota aggravates experimental periodontitis.
3. 学会等名 97th General Session of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamazaki K, Nakajima M, Takeuchi M, Hara M, Tsuzuno T, Matsugishi A, Matsukawa Y, Sato K, Takahashi N, Tabeta K, Yamazaki K.
2. 発表標題 Oral pathobionts aggravate NAFLD through modulation of gut dysbiosis.
3. 学会等名 98th General Session of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎恭子、中島麻由佳、竹内麻衣、原 実生、都野隆博、松岸 葵、松川由実、佐藤圭祐、高橋直紀、多部田康一、坪井裕理、菊池 淳、加藤 完、大野博司、山崎和久
2. 発表標題 腸内細菌叢の変動を介した歯周病のNAFLDへの影響
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------