

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21005

研究課題名（和文）歯周炎病態形成における上皮TRPチャネルタンパクによるレドックス制御機構の解明

研究課題名（英文）Redox control by gingival epithelial TRP channel proteins in pathogenesis of periodontitis

研究代表者

都野 隆博 (Tsuzuno, Takahiro)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：40907383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：酸化-還元応答（レドックス）の平衡破綻は、歯周炎を含む様々な疾患の発症・進行に影響することが知られており、本研究では歯肉上皮細胞に発現するTRPチャネルタンパクを介したレドックス制御機構を明らかにすることとした。初代培養されたヒト歯肉上皮細胞にTRPV1アゴニストであるカプサイシンおよびOlvanilそれぞれにて前処置を行い、酸化剤であるTBHPにて刺激を行ったところ、TRPV1アゴニストの濃度依存的に抗酸化関連遺伝子であるNRF2およびHO-1の有意な発現増加が確認された。歯肉上皮細胞に発現するTRPV1の活性化が、レドックスバランスの恒常性維持に関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

本研究の目的は、歯肉上皮TRPチャネルタンパクによるレドックス制御機構への関与を明らかにし、歯周炎病態形成への影響を検討することである。TRPチャネルタンパクは様々な組織・細胞における発現や疾患との関与が報告されているが、歯肉上皮における機能や歯周炎の発症・進行への関与を報告しているものはほとんどない。本研究結果から、歯肉上皮細胞発現のTRPV1活性化がレドックスバランスの恒常性維持へ関与することが示唆されたことは学術的意義を有し、今後TRPチャネルタンパクをターゲットとした新規歯周炎治療としての応用を目指すことは社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：The imbalance of redox reaction affects onset and progression of various diseases including periodontitis. The aim of this study is to elucidate modulation of redox reaction via TRP channel proteins in gingival epithelial cells. The pretreatment with Capsaicin and Olvanil, TRPV1 agonists, and stimulation with TBHP to normal primary human gingival epithelial cells induced NRF2 and HO-1 gene expression significantly. This result suggests that the activation of TRPV1 in gingival epithelial cells is involved in redox control in periodontal tissues.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯肉上皮細胞 歯周炎 酸化-還元反応 レドックスバランス TRPイオンチャネル TRPV1 カプサイシン Olvanil

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内における酸化-還元応答 (レドックス) のバランスは宿主の恒常性維持に大きく関わり、その平衡破綻によって過剰に産生される活性酸素種 Reactive Oxygen Species (ROS) は酸化ストレス状態を引き起こす。長期的な酸化ストレス状態は局所組織を障害し、動脈硬化をはじめとする様々な全身疾患の発症・進行に影響を与えることが知られる (Alfadda AA et al. J Biomed Biotechnol. 2012)。歯周炎においても酸化ストレスの関与が示唆されているが (Tóthová L et al. Front Physiol. 2017、Wang H et al. Infect Immun. 2014)、歯周組織の細胞内レドックスバランスと歯周炎の関連メカニズムは明らかでない。

上皮細胞は外来病原因子に対する生体防御として働き、歯肉上皮バリアの障害は歯周炎の発症・進行に関与する (Takahashi N et al. Tissue Barriers. 2019)。近年同定された Transient Receptor Potential (TRP) イオンチャネルスーパーファミリーは上皮細胞をふくむ様々な細胞に発現し、構造の違いから現在 28 種類の TRP チャネルタンパクが同定されている (DE Clapham. Nature. 2003)。温度や化学物質など様々な刺激で活性化される膜タンパクであり、カルシウムイオンをセカンドメッセンジャーとした細胞内カルシウム情報伝達系を介して細胞増殖や分化、細胞死に関与することが知られる (Dadon D et al. Int J Biochem Cell Biol. 2011)。これまでに TRP イオンチャネルとレドックス応答制御のクロストークも報告されているが (Görlach A et al. Redox Biol. 2015)、歯肉上皮細胞に発現する TRP チャネルとレドックス応答制御の関連は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯肉上皮細胞発現の TRP チャネルタンパクによるレドックス制御機構への関与を明らかにし、歯周炎病態形成への影響を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 歯肉上皮細胞株における TRP アゴニストの至適濃度検討

ヒト歯肉扁平上皮癌由来の歯肉上皮細胞株 Ca9-22 を 96 ウェルプレートにてコンフルエントになるまで培養し、TRPV1 アゴニストであるカプサイシンおよび Olvanil を各種濃度で添加した。24 時間後、細胞生存率を MTT アッセイにて解析し、TRPV1 アゴニストの細胞為害性を評価し、刺激実験に供する至適濃度を検討した。

(2) 歯肉上皮細胞株における TRP アゴニスト前処置による抗酸化作用の検討

Ca9-22 を 24 ウェルプレートにてコンフルエントになるまで培養し、(1)から細胞為害性のない濃度のカプサイシンおよび Olvanil を培地に添加し、30 分の前処置を行った。培地交換後、酸化剤である 200 μ M の tert-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP) を添加し、30 分の刺激を行った。30 分後、RNA を回収・抽出し、real-time PCR 法にて抗酸化関連遺伝子である NRF2、HO-1 の発現変動の解析を行った。

(3) 初代ヒト歯肉上皮細胞における TRP アゴニスト前処置による抗酸化作用の検討

より生理的な条件下での検証を行うため、初代培養されたヒト歯肉上皮細胞 Primary Gingival Epithelial Cell (Primary GEC) を用いて、(2)と同様の解析を行った。

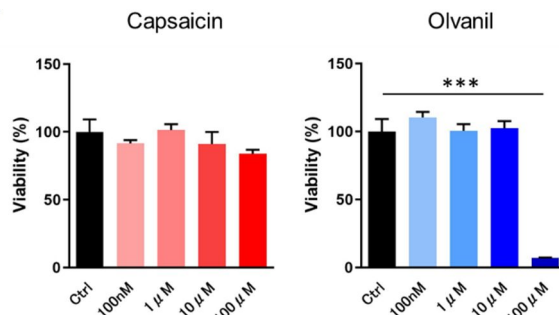
(4) TRP アゴニストと TBHP 共刺激による抗酸化作用の検討

これまでの TRP アゴニスト前処置と比較検証のため、Ca9-22 にカプサイシンと TBHP の共刺激を 30 分間行い、同様に遺伝子発現の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯肉上皮細胞株における TRP アゴニストの至適濃度検討

Ca9-22 に、TRPV1 アゴニストであるカプサイシンおよび Olvanil を 100nM から 100 μ M の各種濃度で添加したところ、カプサイシンにおいて細胞為害性は認められなかった。Olvanil においては 100 μ M にて細胞為害性が認められた。上記結果より、カプサイシンは 100nM から 100 μ M、Olvanil においては 100nM から 10 μ M の濃度にて、以降の実験を行うこととした。

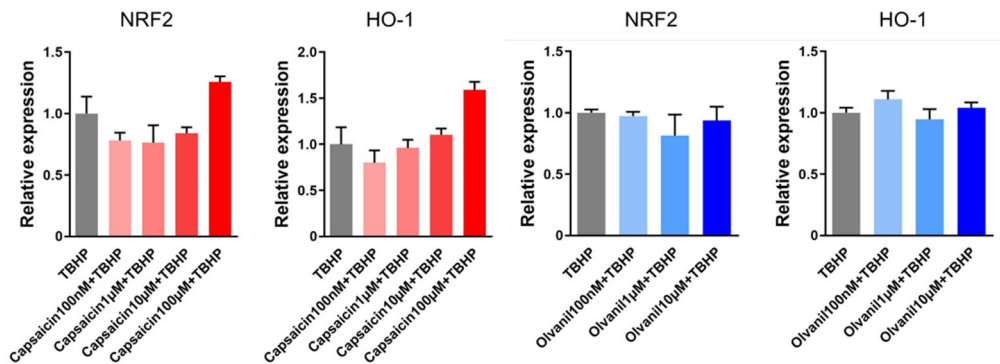


(2) 歯肉上皮細胞株における TRP アゴニスト前処置による抗酸化作用の検討

TRP アゴニストによる前処置が歯肉上皮細胞株における抗酸化関連遺伝子の発現に影響をおよぼすか検討するため、培養した Ca9-22 の培地に 100nM、1 μ M、10 μ M、100 μ M のカプサイシンおよび 100nM、1 μ M、10 μ M の Olvanil をそれぞれ添加し、その後酸化剤である TBHP に

て刺激を行い、遺伝子発現の解析を行った。

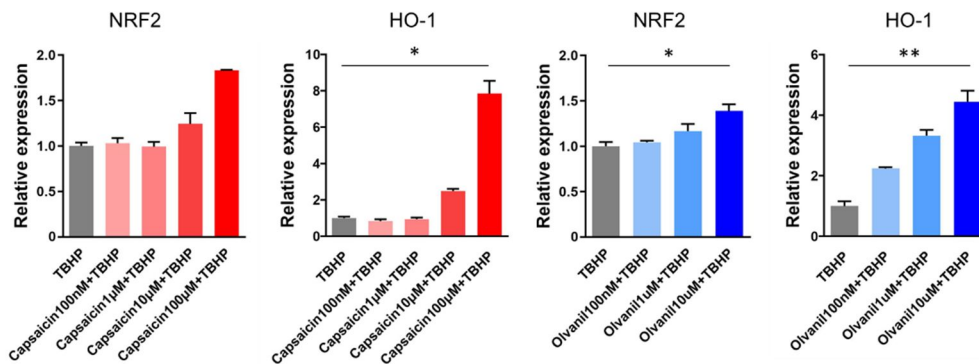
TBHP 単独刺激と比較して、カプサイシン前処置において有意な差は認めないものの、NRF2 および HO-1 遺伝子発現の増加傾向が認められた。Olvanil 前処置においては、顕著な発現変動は認められなかった。



(3) 初代ヒト歯肉上皮細胞における TRP アゴニスト前処置による抗酸化作用の検討

(2)から得られた結果をより生体に近い状態で検証するため、初代培養されたヒト歯肉上皮細胞 Primary GEC において同様の実験を行い、遺伝子発現の解析を行った。

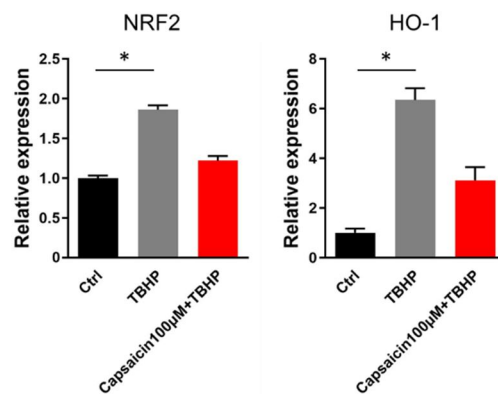
TBHP 単独刺激と比較して、カプサイシン前処置の濃度依存的に NRF2 および HO-1 の遺伝子発現の増加傾向を認め、特に 100μM のカプサイシン前処置において HO-1 の有意な遺伝子発現の増加が確認された。また、Olvanil 前処置においても同様に、Olvanil 前処置の濃度依存的に遺伝子発現の増加傾向を認め、特に 10μM の Olvanil 前処置において NRF2 および HO-1 の有意な遺伝子発現の増加が確認された。



(4) TRP アゴニストと TBHP 共刺激による抗酸化作用の検討

共刺激においても同様の遺伝子発現が認められるか比較検証するため、Ca9-22 にカプサイシン 100μM と TBHP 200μM を同時に添加して共刺激を行い、遺伝子発現の解析を行ったところ、TBHP 単独刺激において NRF2 および HO-1 の遺伝子発現増加が確認されたが、カプサイシンと TBHP 共刺激において発現変動は認められなかった。

本研究から、歯肉上皮細胞に発現する TRPV1 の活性化が、その後のレッドスバランスの恒常性維持に関与することが示唆された。今後、カルシウム情報伝達系を含めた詳細な細胞内シグナリングの解析が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------