

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792123

研究課題名（和文） 口腔粘膜における口気中揮発性硫化物に対する生体防御機構の解明

研究課題名（英文） Study on host defensive system of oral mucosa to volatile sulfide compounds in oral cavity.

研究代表者

峰岡哲郎 (Mineoka Tetsuro)

九州歯科大学・歯学部・特別研修員

研究者番号：50571402

研究成果の概要（和文）：本研究では歯肉粘膜や歯肉細胞に有害な影響を及ぼす口腔細菌由来の揮発性硫化物(VSC) に対する口腔粘膜の防御機構の存在を検証するため、VSC 分解に関与していると考えられる Thiomethyltransferase (TMT), チオ硫酸イオウ転移酵素 Thiosulfate Sulfurtransferase (以下ロダネーゼ：RHOD) の特異的プライマーを作成するため、口腔ケラチノサイト細胞を用いて、両酵素の存在について RT-PCR 等により検証を行ったが、現在までのところ、期待していた結果は得られていない。従って、本研究では口腔粘膜における VSC 分解酵素の存在を実証できなかった。

研究成果の概要（英文）：This study verified the existence of the two enzymes [Thiomethyltransferase(TMT) and Thiosulfate sulfurtransferase(RHOD)], which decomposed volatile sulfide compounds (VSC) generated from oral bacteria, in oral mucosa. However, we have not succeeded to obtain the specific primers for RT-PCR to detect the gene expression of TMT and RHOD in oral keratinocyte until now, therefore, this study has not demonstrated the existence of the enzyme decomposing VSC in oral mucosa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：揮発性硫化物・口腔粘膜上皮・生体防御機構・チオールメチルトランスフェラーゼ・無毒化

1. 研究開始当初の背景

口腔内細菌が産生する硫化水素 (H_2S) やメチルメルカプタン (CH_3SH) といった VSC は口臭の主要な原因物質で、口腔の VSC レベルは口

腔乾燥や歯周病、口腔衛生状態の悪化などの様々な複合的要因により決定されていると考えられている。VSC は青酸ガスに類似する細胞エネルギー産生阻害や生体の重要なタ

ンパクであるコラーゲンの合成阻害や分解を行う細胞毒性を有しており、口腔由来の VSC は致死量には達しないものの、VSC が歯肉粘膜や歯肉細胞に有害な影響を及ぼしている可能性が報告されている。

一方、 H_2S や CH_3SH は口腔以外の様々な器官・組織において産生され、血管内皮細胞の収縮・弛緩などの生体の恒常性の維持に関与していることが明らかになってきているが、結腸などの腸管内においては、口腔と同様、細菌由来の高濃度の H_2S や CH_3SH が産生されるため、これら VSC が腸管組織に悪影響を与えるのを防ぐため、腸管組織内に VSC の無毒化を促す防御機構が存在すると考えられている。従って、口腔内においても細菌由来の高濃度 VSC に対して、口腔粘膜組織内の防御機構が作用している可能性があると考えられる。もしこれら防御機構が作用しているのであれば、個人毎に VSC に対する感受性や抵抗力の違いを有していることも考えられ、これら違いが、口腔における VSC レベルの違いに影響を与え、VSC レベルの違いによる口腔組織に対する影響は口腔癌や歯周病などの口腔疾患の病態に関与している可能性もある。従って、口腔粘膜における抗 VSC 防御機構を解明することは、口臭発生のメカニズムのみならず、口腔疾患の病態の解明につながる可能性を有している。

口腔粘膜における抗 VSC 防御機構には、腸管などの研究により関連が報告されているミトコンドリア酵素の rhodanese (RHOD) や、メチレーション (メチル化) を触媒する酵素で様々な組織に存在している thiol methyltransferase (TMT) の二つが関与している可能性が考えられる。しかしながら、実際に口腔粘膜におけるこれらの酵素に関する知見も含め、抗 VSC 防御機構に関する報告は現在までのところない。

2. 研究の目的

本研究では、口腔粘膜が有する VSC 防御機構の解明のため、RHOD にまず焦点をあて、口腔粘膜組織・細胞における RHOD の発現状況の検証を行う。また口腔粘膜細胞を使って、 H_2S ならびに CH_3SH を作用させることが可能な *in vivo* モデルを作成し、RHOD の口腔粘膜細胞における役割を解明する。

3. 研究の方法

1) 口腔粘膜上皮細胞

本研究では、口腔粘膜上皮細胞として舌ならびに歯肉由来のヒト口腔ケラチノサイト (hOKC1 と hOKC2) と口腔扁平上皮癌細胞 (SCC25) が用いられた。

2) 口腔粘膜上皮組織の採取

本研究で、口腔粘膜上皮組織が、本学附属病院の口臭外来に来院し同意を得た患者の口腔頬粘膜を綿棒で 30 回こすり採取された。また採取を行った患者の口腔内の臨床所見 (口臭レベルを含む) を診療録から記録した。

3) cDNA の作成

培養細胞と採取された組織から RNeasy kit ならびに the SUPERSCRIPTM first strand synthesis system を用いて RT-PCR のための cDNA が作成された。

4) Thiosulfate Sulfurtransferase 酵素の RT-PCR のための特異的プライマーの作成

口腔粘膜上皮における VSC 分解酵素である RHOD が発現し、口腔細菌由来 VSC に対する生体防御の一つとして作用しているという仮説を立証するため、口腔粘膜上皮細胞ならびに組織における RHOD であるチオ硫酸イオウ転移酵素 Thiosulfate Sulfurtransferase

酵素 (TST) の遺伝子レベルでの発現を検証するため、RT-PCR に用いる TST の特異的 primer の設計・作成を human liver rhodanese cDNA をベースに行った (表 1)。

表 1. Human Thiosulfate Sulfurtransferase (TST) Specific primers

Designation	Sequence
TST Primer F	5' -CTCCCTGCTCAAGACCTACG-3'
TST Primer R	5' -GCGAGAGATCCACCTTCTTG-3'
Product size: 248 bp	

5) RT-PCR

本研究では、細胞ならびに組織から採取された cDNA における TST 遺伝子発現を検証するため、作成された TST primer を用いて RT-PCR を行った。また RT-PCR を実施するにあたり、設計・作成したプライマーの検証ならびに最適なプロファイルを決定するため予備実験を行った。

4. 研究成果

1) RT-PCR

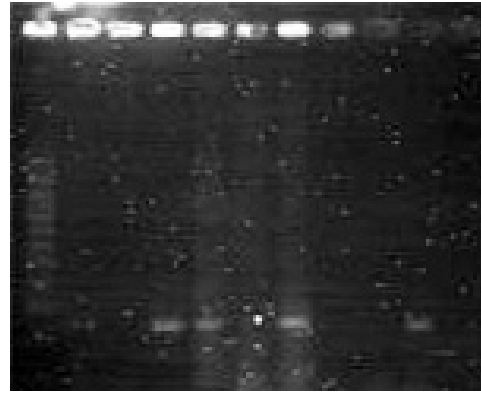
患者から採取した一部の口腔粘膜上皮粘膜組織において TST 遺伝子と考えられる発現バンドは確認されたが (図 1)、培養細胞中からは明らかな TST 遺伝子の発現は確認できず、引き続き使用する primer の再検討を行っている。

2) 臨床所見と TST 遺伝子発現との関係

TST 遺伝子の発現が認められた患者の臨床的所見と発現の違いとの関連は本研究では認められなかった。

3) RHOD 活性に関して

本研究では、当初、RHOD 活性の測定も Lewis JL らの研究報告 (Toxicology and Applied



患者 S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9

図 1. 口腔粘膜上皮粘膜組織の TST 遺伝子の発現

Pharmacology 108, 114-129, 1991) を参考に実施する予定であったが、予備実験の段階で測定方法の確立ができず、測定方法の検討も継続して行っている。

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)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

峰岡哲郎、栗野秀慈、吉田明弘、邵 仁浩、濱寄朋子、安細敏弘：若年層の女性を対象とした口臭に関する意識調査 口臭への一般認識と対人行動についてのパイロット研究. 口腔衛生会誌 61: 282-287, 2011.

〔学会発表〕 (計 5 件)

① Kinoshita, N., Awano, S., Yoshida, A., Soh, I., Mineoka, T., and Ansai, T.: Neutral Endopeptidase and Endothelin-converting Enzyme in Human Buccal Mucosal Epithelium. 58th Japanese Association for Dental Research, Kitakyushu, Nov 20-21, 2010.

② 中田元希、栗野秀慈、木下直昌、峰岡哲郎、吉田明弘、邵 仁浩、安細敏弘：培養口腔ケラチノサイトにおける neutral endopeptidase と substance P との関係について. 第 71 回九州歯科学会総会, 北九州, 2011 年 5 月 28, 29 日, 九州歯科学会雑誌 65: 33, 2011.

③ 木下直昌、栗野秀慈、中田元希、吉田明弘、邵 仁浩、峰岡哲郎、安細敏弘：頬粘膜上皮で発現するメタロプロテアーゼ遺伝子に関するパイロット研究. 第 71 回九州歯科学会総会，北九州，2011 年 5 月 28，29 日，九州歯科学会雑誌 65：34，2011.

()

研究者番号：

④ 木下直昌、栗野秀慈、中田元希、吉田明弘、邵 仁浩、峰岡哲郎、安細敏弘：粘膜上皮におけるメタロプロテアーゼの遺伝子発現レベルと歯周健康状態との関係. 第 60 回日本口腔衛生学会総会，松戸，2011 年 10 月 8-10 日，口腔衛生会誌 61：472，2011.

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

⑤ 中田元希、栗野秀慈、木下直昌、峰岡哲郎、吉田明弘、邵 仁浩、安細敏弘：培養口腔ケラチノサイトにおける neutral endopeptidase の作用について. 第 60 回日本口腔衛生学会総会，松戸，2011 年 10 月 8-10 日，口腔衛生会誌 61：479，2011.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峰岡哲郎 (Mineoka Tetsuro)

九州歯科大学・歯学部・特別研修生

研究者番号：50571402

(2) 研究分担者