

平成 26 年 4 月 21 日現在

機関番号：27102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659937

研究課題名(和文)新規細胞内ガス性シグナル伝達因子硫化水素が口腔領域の炎症応答に果たす役割の解明

研究課題名(英文)The role of novel gasotransmitter hydrogen sulfide on inflammatory response in oral area

研究代表者

秋房 住郎(Akifusa, Sumio)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40295861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：マウス血管内皮細胞株UV-2細胞を用いて、ストレスチャンバー上に播種し伸展刺激を加えたところ、4時間後に硫化水素産生酵素(CBS)のmRNAの発現量が3倍に上昇した。また、活性酸素種産生酵素のNox2の発現は1.8倍上昇した。一方、一酸化窒素産生酵素eNOSの発現量は変化がなかった。また、同様の実験を、ヒト軟骨芽細胞様細胞株ATDC5細胞についても行ったところ、伸展刺激2～4時間後からCBSのmRNAの発現量が上昇した。これらのことから、細胞に伸展刺激を加えると内因性硫化水素の産生が誘導される可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Multiple lines of recent evidences strongly suggested that nitric monoxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide (H₂S) have come to known as the gasotransmitters worked for various cellular functions. Persistent extension stress induce the mRNA expression of cystathionine-b-synthase (CBS) and Nox2 by 3 times and 1.8 times, respectively, after 4 hours in mouse vascular endothelial cell line, UV-2 cell cultured on stress chamber. On the contrary, the extension stress did not induced mRNA expression of eNOS. We examined the effect of the extension stress on the mRNA expression of various redox-related genes in human chondroblastic cell line, ATDC5 cell. The extension stress also induced Nox2, iNOS, eNOS, and CBS mRNA expression after 2 to 4 hours, but not cystathionine-v-lyase. These evidences suggested that persistent extension stress induced production of endogenous H₂S.

研究分野：社会系歯学

科研費の分科・細目：予防歯科学

キーワード：硫化水素 gasotransmitter 歯周炎 顎関節炎

1. 研究開始当初の背景

硫化水素 (H₂S) は水溶性が比較的高いため生体に容易に取り込まれるが、鉄を奪うことで呼吸鎖関連酵素の活性を阻害して窒息性の中毒症状を誘発したり、口臭の原因物質であったりするため、その毒性と異臭により一般的には有害性から論じられることが多い。この 10 年間の先駆的研究から、内因性の H₂S は一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に次ぐ、第三のガス性シグナル伝達物質として注目され始めている。内因性 H₂S は平滑筋の弛緩作用を持つことから、硫化水素泉の効用を一部説明できる。口腔環境では、細菌由来および食物由来の外因性 H₂S が比較的豊富にあることから、環境中の H₂S が破骨細胞の分化を促進したとする *in vitro* の報告はあるものの、歯周疾患における内因性 H₂S の役割に関する研究は、実験研究やヒト由来の臨床的・疫学研究を通じて未だ報告がない。

2. 研究の目的

今回の研究では、歯周病態における H₂S の役割を解析することを目的として、H₂S 合成酵素のうち cystathionine-β-synthase (CBS) および cystathionine-γ-lyase (CSE) について、血管内皮細胞に伸展刺激を加えた際の遺伝子発現を解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞

マウス血管内皮様細胞株 UV₂ 細胞 (RIKEN Cell Bank No. RBRC-RCB1994) を用いた。熱非働化 10% ウシ胎児血清 (FBS)、penicillin G (100 U/mL)、streptomycin (100 μg/mL) 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium で 37 °C、5%CO₂ 環境下で培養した。マウス AT805 由来の前駆軟骨芽細胞株 ATDC5 を DMEM/Ham's F-12 に熱非働化 5%FBS を加えた培地で培養した。細胞数を 1.5 × 10⁵/ml に調整し、Insulin-Transferrin-Selenite (ITS) を加えて 2 週間培養して分化させた軟骨芽細胞を用いた。

(2) 細胞伸展

細胞の伸展は、37 °C、5%CO₂ 環境下で、自動伸展装置 STB-140 (ストレッチ株式会社) にて、伸展率 20% の条件で 1 分間 10 往復の連続往復動作を行い伸展した。伸展に際しては、細胞をストレッチチャンバー (3.2 × 3.2 × 1.0cm) (ストレッチ株式会社) に 100 μg/ml フィブロネクチンで 2 時間コート後、細胞を 3 × 10⁵ 個播種して付着させた。

(3) リアルタイム RT-PCR

RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) にて調製した RNA を q-Script cDNA Supermix reagents (Quanta BioSciences) 30 分、42 °C で逆転写した後、StepOne™ Real-Time System (Applied Biosystems) にて FAST SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いてリアルタ

イム RT-PCR を行った。使用したプライマーは表 1 に示す。mRNA 量は GAPDH を基準として CT により算出した。

表 1 使用したプライマー

プライマー	配列	上段: forward 下段: reverse
GAPDH	GACGGCGCATCTTCTTGA	
	CACACCGACCTTCACCATTTT	
CBS	GATGGGGTGGCTCGTT	
	GGTAGCCAGGATAAACAACCTT	
Nox1	CGCTCCAGCAGAAGGTCTGTGATTACCAAG	
	GGAGTGAACCCCAATCCCTGCCCAACCA	
Nox2	GTCACACCTTCGCATCCATTTCTCAAGTCAGT	
	CTGAGACTCATCCAGCCAGTGTGAGGTAG	
CSE	GATGGGGTGGCTCGTT	
	GGTAGCCAGGATAAACAACCTT	
Nox4	CTGGAGGAGCTGGCTCGCAACGAAG	
	GTCATCATGAGGAATAGCACCACCACCATGCAG	
p22 ^{phox}	AACGAGCAGCGCTGGCGTCCG	
	CACAGTGGIATTTCCGGCC	
p47 ^{phox}	CCAGCACTATGTGTACATGT	
	AAGGAGATGTTCCCAATGA	
p67 ^{phox}	GCCTTCGGTAAAGCACATA	
	GAGGCTTCAGCGAGGTGCA	
nNOS	CATCAGCACCCCAAGTT	
	CAGCAGCATGTGGACACA	
eNOS	CCAGTGCCTGCTTCATC	
	GCAGGGCAAGTTAGGATCAG	
iNOS	CAACCAAGTATATGGCTCT	
	GTCAGCAGCCCGTCTTTCCA	

(4) フリーラジカルアナライザー

細胞が産生する H₂O₂、H₂S、NO を同時に検出するために、フリーラジカルアナライザー Apollo 1000 (LSM inc.) を用い、伸展刺激した UV₂ 細胞及び ITS 刺激により軟骨芽細胞に分化させた ATDC5 細胞の培地中の H₂O₂、H₂S、NO を測定した。

(5) 統計解析

Student の t 検定を行い、P<0.05 を有意な差とした。

4. 研究成果

(1) 細胞内ガス性シグナル因子関連遺伝子の発現

UV₂ 細胞

UV₂ 細胞に伸展刺激を加えたところ、2 時間後には変化が確認できなかったが、4 時間後から CBS が 3.0 ± 0.7 倍、Nox2 が 0.8 ± 0.5 倍 mRNA の発現が上昇していた。一方、Nox1 に変化は認められなかった (図 1)。

ATDC5 細胞

ITS を添加して 2 週間培養することで軟骨芽細胞様細胞に分化させた ATDC5 細胞に伸展刺激を加えたところ、2 時間後には大きな変化が確認できなかったが、4 時間後からそれぞれ CBS が 3.0 ± 0.3 倍、Nox2 が 2.75 ± 0.5 倍、p67^{phox} が 3.48 ± 0.5 倍、p22^{phox} が 3.98 ± 0.4 倍、NOS が 4.0 ± 0.6 倍、iNOS が 3.5 ± 0.4 倍 mRNA の発現が上昇していた。一方、CSE や Nox1 に変化は認められなかった (図 2)。

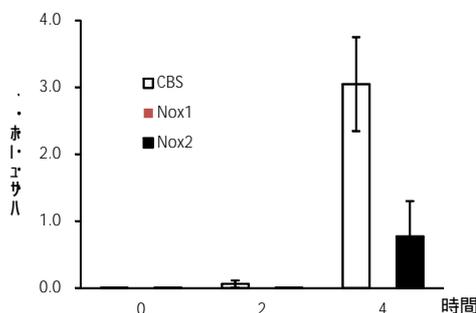


図1 UV 2細胞に対する伸展刺激による硫化水素産生酵素の遺伝子発現

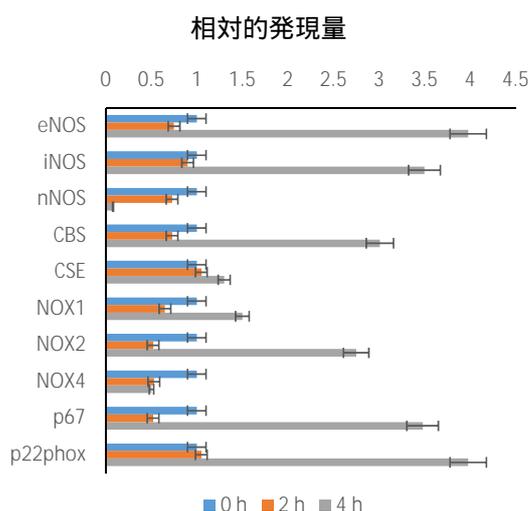


図2 ATDC5細胞に対する伸展刺激による硫化水素産生酵素の遺伝子発現

今回の実験で、マウス血管内皮様細胞株 UV 2 細胞およびマウス軟骨芽細胞様細胞 ATDC5 細胞に伸展刺激を加えると CBS の mRNA の発現が上昇することがわかった。リポ多糖 (LPS) が誘導する炎症や浮腫では、血漿中の H₂S が上昇することに加えて、細胞内 H₂S 合成酵素で CBS の下流で作用する cystathionine-γ-lyase (CSE) を阻害すると LPS 誘発性炎症応答は軽減することが報告されていることから、炎症応答との関連も指摘されている。また、糖尿病モデルでの研究では、高グルコース環境で発生する酸化ストレスを内因性 H₂S が抑制する可能性が示唆されている。

Nox は、細胞質の NADPH から電子を受け取り、細胞外の酸素分子に電子を与えることにより、活性酸素種を生成する酵素である。Nox2 は食細胞で発現していることが知られているが、血管内皮細胞内では、NO の不活化や細胞増殖に関与していることが報告されている。H₂S と活性酸素種はそれぞれの生成過程や親電子リガンドを通じて作用機序が複雑に関連していることが予想されており、伸展刺激においても、それぞれの遺伝子発現が上昇していたこ

とから、機械的刺激によりガス性シグナル物質が発生する可能性が示唆された。

今回の実験で、短時間では Nox2 の発現量よりも CBS の発現量の方が強かったことから、活性酸素種の血管組織に対する為害性を緩和する役割を担っている可能性があり、その解明は今後の研究課題である。

(2) 伸展刺激によるガス性シグナル伝達物質の測定

ITS を添加して 2 週間培養することで軟骨芽細胞様細胞に分化させた ATDC5 細胞に伸展刺激を加えたところ、8 時間後から H₂S は未刺激状態に比べて 6 倍程度増加し、それ以降産生量を一定に保った。一方、H₂O₂ と NO の産生量には大きな変化が確認できなかったが、それぞれ 8 時間、16 時間に一過性に増加した (図 3)。

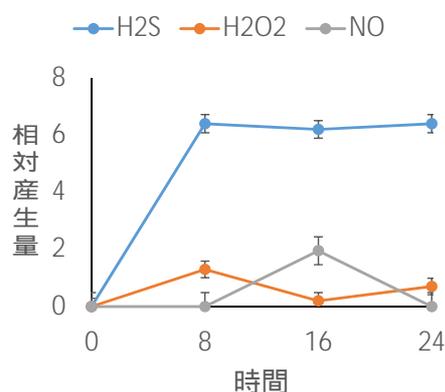


図3 ATDC5細胞に対する伸展刺激による各種レドックス関連ガス性因子の産生量の時間的推移

(3) 生体内酸化ストレス指標と歯周疾患の関連

九州大学歯学部山下喜久教授と連携して、歯周疾患検診受診者の血液サンプルを使用して、細胞内の酸化ストレス指標である 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 測定したが、歯周疾患との明確な関連性は認められなかった。

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 10 件)

1. Furuta M, Shimazaki Y, Takeshita T, Shibata Y, Akifusa S, Eshima N, Kiyohara Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Mukai N, Nagata M, Yamashita Y.: Gender differences in the association between metabolic syndrome and periodontal disease: the Hisayama Study. J Clin Periodontol. 40(8): 2013, 743-752. 査読あり doi: 10.1111/jcpe.12119.
2. Takata Y, Ansai T, Soh I, Awano S, Nakamichi

- I, Akifusa S, Goto K, Yoshida A, Fujii H, Fujisawa R, Sonoki K.: High-level activities of daily living and disease-specific mortality during a 12-year follow-up of an octogenarian population. *Clin Interv Aging*. 8: 2013, 721-728. 査読あり
doi: 10.2147/CIA.S43480.
3. Takata Y, Ansai T, Soh I, Awano S, Nakamichi I, Akifusa S, Goto K, Yoshida A, Sonoki K.: Activities of daily living dependency and disease-specific mortality during 12-year follow-up in an 80-year-old population. *Aging Clin Exp Res*. 25(2): 2013, 193-201. 査読あり
doi: 10.1007/s40520-013-0029-6.
4. Takata Y, Ansai T, Soh I, Awano S, Nakamichi I, Akifusa S, Goto K, Yoshida A, Fujii H, Fujisawa R, Sonoki K.: Body mass index and disease-specific mortality in an 80-year-old population at the 12-year follow-up. *Arch Gerontol Geriatr*. 57(1): 2013, 46-53. 査読あり
doi: 10.1016/j.archger.2013.02.006.
5. Kikutani T, Yoshida M, Enoki H, Yamashita Y, Akifusa S, Shimazaki Y, Hirano H, Tamura F.: Relationship between nutrition status and dental occlusion in community-dwelling frail elderly people. *Geriatr Gerontol Int*. 13(1): 2013, 50-54. 査読あり
doi: 10.1111/j.1447-0594.2012.00855.x.
6. Okinaga T, Ariyoshi W, Akifusa S, Nishihara T.: Essential role of JAK/STAT pathway in the induction of cell cycle arrest in macrophages infected with periodontopathic bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Med Microbiol Immunol*. 202(2): 2013, 167-174. 査読あり
doi: 10.1007/s00430-012-0282-x.
7. Furuta M, Komiyama M, Akifusa S, Shimazaki Y, Adachi M, Kinoshita T, Kikutani T, Yamashita Y. Interrelationship of oral health status, swallowing function, nutritional status, and cognitive ability with activities of daily living in Japanese elderly people receiving home care services due to physical disabilities.: *Community Dent Oral Epidemiol*. 41(2): 2013, 173-181. 査読あり
doi: 10.1111/cdoe.12000.
8. Shimazaki Y, Akifusa S, Takeshita T, Shibata Y, Doi Y, Hata J, Ninomiya T, Hirakawa Y, Kiyohara Y, Yamashita Y.: Effectiveness of the Salivary Occult Blood Test as a Screening Method for Periodontal Status. *J Periodontol*. 82(4) 2011, 581-587. 査読あり
doi: 10.1902/jop.2010.100304.
9. Kamio N, Akifusa S, Yamashita Y.: Diacylglycerol kinase alpha regulates globular adiponectin-induced reactive oxygen species. *Free Radic Res*. 45(3) 2011, 336-341. 査読あり
doi: 10.3109/10715762.2010.532495.
10. Fujimoto A, Akifusa S, Hirofujii T, Yamashita Y.: Involvement of suppressor of cytokine signaling-1 in globular adiponectin-induced

granulocyte colony-stimulating factor in RAW 264 cell. *Mol Immunol*. 48(15-16): 2011, 2052-2858. 査読あり
doi: 10.1016/j.molimm.2011.06.440.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋房 住郎 (Sumio Akifusa)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 40295861

(2)研究分担者

西原 達次 (Tatsuji Nishihara)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80192251