

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 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792089

研究課題名（和文）歯周組織における Keap-1-Nrf2 システムを中心としたレドックス制御の解明

研究課題名（英文）Investigation of redox regulation by Keap-1 and Nrf2 system in periodontal tissue

研究代表者

板東 美香（BANDO MIKA）

徳島大学・病院・医員

研究者番号：10510000

研究成果の概要（和文）：本研究は歯周組織でのレドックス制御について詳細を明らかにし、新しい歯周病の予防や治療法に酸化ストレス防御機構である Keap1-Nrf2 システムを応用することを目指した基礎研究である。歯肉線維芽細胞において *Porphyromonas gingivalis* (p.g.) LPS により酸化ストレスが引き起こされ、またその防御反応（抗酸化ストレス反応）が起こることがわかった。さらに keratinocyte growth factor (KGF) により、抗酸化反応関連転写因子（Nrf2）と抗酸化酵素（HO-1）の発現が増加した。酸化ストレス防御機構の促進に KGF が有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is investigation of redox regulation in periodontal tissue to use antioxidative stress mechanism (Keap1-Nrf2 system) as new periodontitis prevention and treatment. This study show *Porphyromonas gingivalis* (p.g.) LPS induced oxidative stress and the antioxidant response in human gingival fibroblast. keratinocyte growth factor (KGF) induced antioxidative enzyme (HO-1) and antioxidant response-transcriptional factor (Nrf2) expressions. KGF may enhance antioxidative stress mechanism in periodontal tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周組織由来細胞、酸化ストレス、Keap1-Nrf2

1. 研究開始当初の背景

生体内で酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、前者に傾いた状態を酸化ストレスとよび、癌、生活習慣病、心疾患、炎症などの多くの病態や老化に関与することが知られている。酸化ストレスの原因は、過剰に産生された活性酸素種（reactive oxygen

species: ROS）であり、生体の膜や組織を構成する脂質、核酸、タンパク質は ROS により酸化され、その結果組織障害が引き起こされ様々な疾患の発症につながる。このような酸化ストレスにตอบสนองして生体内でおこる酸化還元反応を介した制御をレドックス制御という。また、ROS は Interleukin-8 (IL-8) の

ような炎症性サイトカインの産生を誘導するという報告もあることから、ROS による直接的・間接的酸化ストレス反応がさらに炎症状態を重症化する可能性も考えられている。

慢性炎症疾患である歯周病においても酸化ストレスが関与すると言われており、これまでに歯周病患者の唾液・歯肉溝滲出液・血液中の酸化ストレスマーカーや抗酸化酵素が、非歯周病患者と比較して有意に上昇することが報告されている (Eur J Dent 3:100-106, 2009, J Periodont Res 39:287-293, 2004)。しかしながら歯周病と酸化ストレスに関する報告はほとんどが臨床研究であり、ROS が歯周組織におよぼす影響やその調節機構について調べた研究はほとんどなく、酸化ストレスが口腔内の免疫システムにおよぼす影響についても不明である。

これまでにヒト上皮細胞における生体防御に関与する自然免疫システムについて研究を行っており、そのシステムで重要な役割を果たす抗菌ペプチドの種類やその調節機構について明らかにしてきた (Immunol Cell Biol 85: 532-537, 2007)。そこで、歯周組織において ROS が直接組織を障害するだけでなく、サイトカイン産生の誘導や抗菌ペプチドの減少を介して歯周組織破壊や炎症を増悪化させ、歯周病の進行に関与するのではないかという仮説を立てた。一方、酸化ストレス防御の役割を担っているのが、転写因子 nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) とその抑制性制御因子 Kelch-like-Ech-associated protein 1 (Keap1) である。平常時には、Nrf2 は細胞質に存在する Keap1 により抑制されているが、酸化ストレスが加わると Nrf2 は安定化し、応答配列に結合し ROS 産生を抑制する酵素群を誘導制御することで酸化ストレスに対する防御を行う。

2. 研究の目的

本研究では、歯周組織でのレドックス制御 (酸化ストレス反応) について詳細を明らかにし、新しい歯周病の予防や治療法に酸化ストレス防御機構である Keap1-Nrf2 システムを応用することを目指した基礎研究である。すなわち、酸化ストレス刺激が歯肉線維芽細胞における炎症性サイトカインおよび抗菌ペプチドの発現へ及ぼす影響を調べ、歯周組織における酸化ストレスが生ずる組織障害や炎症増強の機構を明らかにする。さらに、Keap1-Nrf2 を制御すること (Keap1 の抑制や Nrf2 誘導) による歯肉線維芽細胞での酸化ストレス防御機構の促進を介した組織障害や炎症の抑制をめざす。

3. 研究の方法

(1) 歯肉線維芽細胞において P. g. LPS が酸

化ストレスに与える影響: 歯肉線維芽細胞に P. g. LPS (0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で刺激を与え 12, 24 時間後に FastPure[®] DNA Kit (TaKaRa) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は 8-OHdG Assay Preparation Reagent Set (Wako) を用いて前処理を行い、Oxiselect[™] Oxidative DNA Damage ELISA Kit (Cell Biolab) により、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の定量を行った。

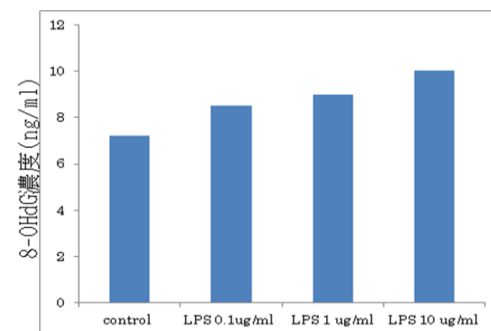
(2) 歯肉線維芽細胞において p. g. LPS がサイトカイン、抗菌ペプチド、抗酸化酵素、抗酸化反応関連転写因子発現に及ぼす影響: 歯肉線維芽細胞に P. g. LPS (0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で刺激を与え 24, 48 時間後に RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から通法に従い cDNA を作製した後、サイトカイン (IL-6, TNF α)、抗菌ペプチド (S100A9, β -defensin2)、抗酸化酵素 (HO-1, NQO-1, GCLM, GCLC)、抗酸化反応関連転写因子 (Nrf2, Keap1) のプライマーでそれぞれ PCR 反応を行った。内部標準として Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) を使用した。

(3) 歯肉線維芽細胞において p. g. LPS が Nrf2 の核移行に与える影響: 歯肉線維芽細胞に P. g. LPS (0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で刺激を与え 48 時間後に NucBuster[™] Protein Extraction Kit (Novagen) を用いて細胞質蛋白と核蛋白を抽出した。抽出した蛋白を Nrf2, Keap1 抗体を用いて Western blotting を行った。

(4) 歯肉線維芽細胞における抗酸化ストレス反応誘導因子の検討: 歯肉線維芽細胞に keratinocyte growth factor (KGF) (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で刺激を与え、48 時間後の RNA を抽出した。Nrf2 と HO-1 mRNA の発現を RT-PCR にて調べた。

4. 研究成果

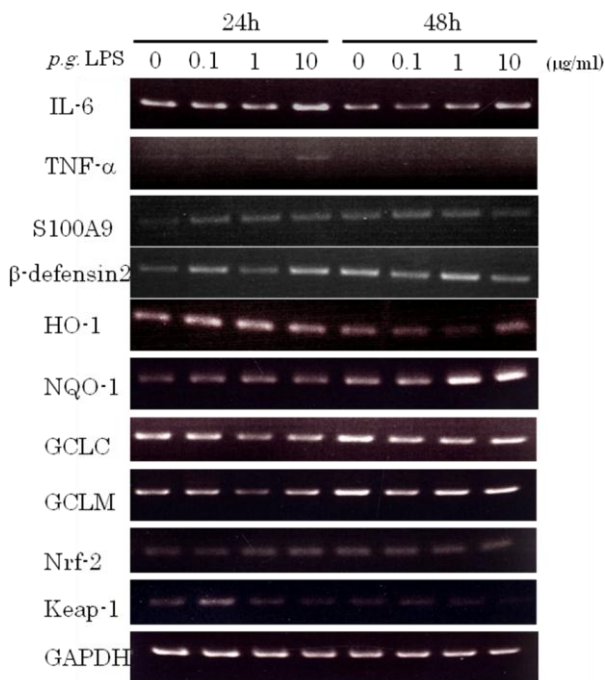
(1) 歯肉線維芽細胞において p. g. LPS 濃度依存的に酸化ストレスマーカーである 8-OHdG が増加する傾向が認められた (図 1)。



【図 1】 P. g. LPS による酸化ストレスマーカー

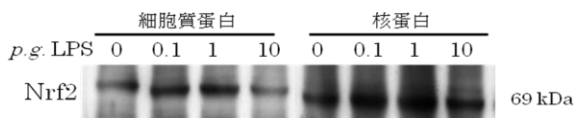
一(8-OHdG)発現への影響

(2) 歯肉線維芽細胞において P. g. LPS 添加 24, 48 時間後に IL-6 遺伝子発現は増加し、TNF- α は 24 時間後が発現増加のピークであった。S100A9 と β -defensin2 は 24 時間で LPS による発現増加が認められた。また抗酸化酵素の HO-1 は 24 時間後、NQO1 は 48 時間後に発現増加が認められたが、GCLC, GCLM には変化が認められなかった。抗酸化反応関連転写因子 Keap1 は 24 時間に発現増加したが、Nrf2 発現には変化がなかった。ピークとなる LPS 濃度は各種遺伝子による違いが認められた (図 2)。



【図 2】 P. g. LPS によるサイトカイン・抗菌ペプチド・抗酸化酵素・抗酸化関連転写因子の遺伝子発現への影響

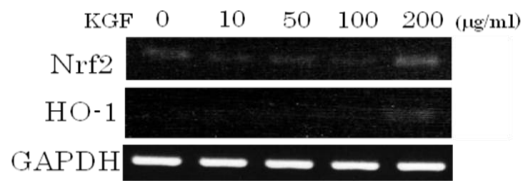
(3) 歯肉線維芽細胞において P. g. LPS により Nrf2 の核移行が促進され、そのピークは P. g. LPS 濃度が 0.1 と 1 μ g/ml であった (図 3)。



【図 3】 P. g. LPS による Nrf2 の核移行への影響

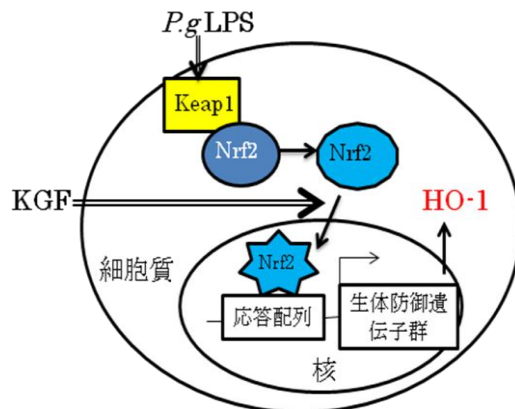
(4) 歯肉線維芽細胞において KGF により Nrf2 および HO-1 遺伝子発現が増加した。その発現増加は KGF 濃度が 200 μ g/ml で最大

となった (図 4)。



【図 4】 KGF による Nrf2 および HO-1 遺伝子発現への影響

(5) 本研究から、歯肉線維芽細胞において P. g. LPS により酸化ストレスが生じること、また、Keap1-Nrf2 を介した抗酸化酵素や抗菌ペプチドのような酸化ストレス防御機構が働くことがわかった。また、その防御機構を促進する因子として KGF が有効である可能性が示唆された (図 5)。



【図 5】 歯肉線維芽細胞における酸化ストレス防御機構 (仮説)

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 4 件)

① Kido J, Bando M, Hiroshima Y *et al.*
Analysis of proteins in human gingival crevicular fluid by mass spectrometry
J Periodont Res 査読あり
2012 *in press*
DOI:10.1111/j.1600-0765.2011.01458.x.

② Hiroshima Y, Bando M, Inagaki Y *et al.*
Resistin in gingival crevicular fluid and induction of resistin release by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human neutrophil.
J Periodont Res 査読あり
2012 *in press*
DOI:10.1111/j.1600-0765.2011.01466.x.

- ③ Hiroshima Y, Mika Bando *et al.*
Regulation of antimicrobial peptide
expression in human gingival
keratinocytes by interleukin-1 α .
Arch Oral Biol 査読あり
56. 2011. 761-767
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
21316034](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21316034)
- ④ Mika Bando, Hiroshima Y *et al.*
Modulation of calprotectin in human
keratinocytes by keratinocyte growth
factor and interleukin-1 α .
Immunology and Cell Biology 査読あり
88. 2010. 328-333
[http://www.nature.com/icb/journal/v8
8/n3/full/icb2009104a.html](http://www.nature.com/icb/journal/v88/n3/full/icb2009104a.html)

[学会発表] (計 3 件)

- ①村田裕美, 木戸淳一, 板東美香 他
最終糖化産物はマクロファージ様細胞の
炎症関連因子の発現を調節する.
第 135 回秋季日本歯科保存学会
2011/10/21 大阪国際交流センター (大阪
府)
- ②坂東由記子, 木戸淳一, 廣島佑香, 板東美
香 他
歯肉溝滲出液中の YKL-40 の分析
第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会,
2011/9/24 海峡メッセ下関 (山口県)
- ③板東美香, 木戸淳一、稲垣裕司 他
歯肉溝滲出液中のグリコアルブミン測定
法の確立.
第 54 回春季日本歯周病学会
2011/5/27 福岡国際会議場 (福岡県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板東 美香 (BANDO MIKA)
徳島大学・病院・医員
研究者番号 : 10510000

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし