

令和元年5月29日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17357

研究課題名(和文) 歯肉上皮のバリア機能に酸化ストレス制御因子Nrf2が及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) The influence of Nrf2 on gingival epithelium barrier function

研究代表者

菅野 真莉加 (SUGANO, MARIKA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：40721220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Nrf2は細胞の酸化ストレス耐性に関わることが知られている。細胞が酸化ストレスに曝されると活性化したNrf2が核内に移行して炎症性サイトカイン産生を抑制する分子を発現し、抗炎症および抗酸化効果に寄与する。一方、歯肉上皮は歯面と緊密に接着して口腔細菌の侵入を物理的に防ぐとともに、感染部位に遊走してきた好中球由来の各種活性酸素が殺菌効果を示す。しかし、過剰な活性酸素は細胞障害を惹き起こす酸化ストレスとなるが、歯肉上皮におけるNrf2の機能については十分に解明されていない。本研究では、歯肉上皮細胞を用い、酸化ストレスとして過酸化水素で刺激した時のNrf2の挙動解析と標的遺伝子について調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、H₂O₂誘導性の酸化ストレスはin vitro条件下で歯肉上皮細胞Ca9-22における効果的なNrf2の活性化と抗酸化反応を惹き起こすことが示唆された。歯肉上皮における酸化ストレスの制御メカニズムが明らかにされることは、歯周病の発症および進行プロセスを解明することにもつながる。また、近年はNrf2誘導剤となるファイトケミカルの効果が注目されており、毎日の食事を通じた歯周病予防・治療戦略の構築が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is known that the transcription factor Nrf2 is involved antioxidant control. When cells are exposed to oxidative stress, activated Nrf2 is transferred to the nucleus and induced expression of some molecules that suppress the production of inflammatory cytokines and contributes to anti-inflammatory and anti-oxidative effects. On one hand, the gingival epithelium adheres closely to the tooth surface to physically prevent oral bacteria from invading host tissues. Moreover, activated neutrophils that have migrated to the infected region produce various reactive oxygen species, exhibiting a bactericidal effect. However, it is unclear the details of Nrf2 function in gingival epithelium, in spite of the fact that excessive reactive oxygen is an oxidative stress that causes cell damage. In this study, we examined Nrf2 behavior and targeted genes using a gingival epithelium cell line in condition of stimulation by hydrogen peroxide as oxidative stress.

研究分野：歯周病学

キーワード：酸化ストレス 歯肉上皮細胞 抗酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯肉の外縁上皮は錯角化重層扁平上皮で構成され、細胞間接着のデスモゾームが発達し、病原体などの異物の侵入に対する物理的なバリアとして機能する。一方、内縁上皮は歯肉溝上皮と接合上皮に区別され、特に接合上皮はエナメル質やセメント質表面とヘミデスモゾーム結合で上皮性付着を形成している。口腔感染症の代表である歯周病は、これら細胞接着が破壊されて細菌が体内へ侵入することで発症する。そのため、接合上皮の広い細胞間隙からは好中球などの炎症細胞が常に浸潤し、感染防御の第一線を担っている。好中球はまた、病原体を排除するために活性化するとスーパーオキシド (O_2^-) を産生する。 O_2^- は極めて不安定で、短時間で様々な他の活性酸素種に変換されるが、これら二次的に誘導される活性酸素種が殺菌作用を示すことで感染防御に関与している。しかし、過剰な活性酸素は宿主にも障害をもたらすため、好中球の活性酸素産生系は多因子によって制御されている。

(2) Nrf2 (NF-E2 related factor 2) は細胞の酸化ストレス耐性に関わる転写因子で、細胞が酸化ストレスなどに曝されると核内に移行して各種炎症性サイトカイン産生を抑制する分子の発現を介して抗炎症および抗酸化効果に寄与する。しかし、歯周組織において生体防御を最前線で担う歯肉上皮における Nrf2 の機能については十分に解明されていない。

(3) スルフォラファンはブロッコリースプラウトに含まれるファイトケミカルの1種で、近年、Nrf2 を活性化することが報告され (Zang, D.D. et al., *Mol. Cell. Biol.* 2004) 物質の経口投与による Nrf2 の活性化が可能であることが裏付けられた。また、スルフォラファンはマウス腹腔マクロファージにおける LPS 応答性の TNF- α 、IL-1 β 、iNOS (inducible NO synthase) などの発現誘導を Nrf2 依存性に抑制することが報告され (Lin W. et al., *Biochem. Pharmacol.* 2008) Nrf2 誘導剤としてのスルフォラファンの効果が注目されている。しかし、これまでにスルフォラファンのような Nrf2 誘導剤を歯周病に対して予防的に応用している研究や Nrf2 と上皮の物理的バリア機能との関連に着目した研究はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯肉上皮における Nrf2 の酸化ストレス応答を解明し、感染防御の最前線である歯肉上皮の物理的バリア機能に及ぼす影響を調べることで、歯周病の病態形成に関わる Nrf2 の役割を明らかとすることである。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) を酸化ストレスとして各種濃度の過酸化水素 (H_2O_2) で刺激し、非刺激時と比較した時の核内 Nrf2 量の変化を評価した。Nrf2 は活性化すると核内に移行する転写因子であるので、 H_2O_2 刺激後の Ca9-22 を回収して核抽出核分と細胞質核分を分離調製後、核抽出核分中の転写因子 Nrf2 の DNA 結合活性を比色法で検出した。また、過酸化水素刺激による Nrf2 の核内移行を肉眼的に観察するために抗 Nrf2 抗体を用いて蛍光顕微鏡で Nrf2 の細胞内局在を観察した。

(2) 過酸化水素濃度の最適化を行うために、100~400nM の H_2O_2 刺激後の Cell viability assay および Cytotoxicity assay にて細胞毒性を評価した。

(3) Nrf2 標的遺伝子を探索するため、400nM H_2O_2 刺激群と非刺激群の Total RNA を抽出し、マイクロアレイで発現変動遺伝子を網羅的に抽出した。その後、GO 解析およびパスウェイ解析を行った。

(4) Nrf2 の活性化が細胞接着分子に及ぼす影響について評価するため、細胞接着装置の構成分子である E-cadherin を標的とした免疫蛍光化学染色を行った。

4. 研究成果

(1) 歯肉上皮細胞株 Ca9-22 において、 H_2O_2 刺激群では非刺激群と比較して Nrf2 の核内移行量が増加した。ただし、抗 Nrf2 抗体にて免疫蛍光細胞解析を行ったところ、定常状態での核内発現が予想より多く、酸化ストレス刺激による Nrf2 の核内移行量の増加を明確に観察することはできなかった。

(2) 適切な酸化ストレスを細胞に与えるため、過去の報告を参考に 100~400nM の H_2O_2 における細胞毒性を評価したところ、濃度依存的に細胞障害率が増加した。しかし、細胞生存率はいずれの濃度においても非刺激時と変化は認めなかった。

(3) 400nM H_2O_2 刺激後と非刺激時の Ca9-22 をマイクロアレイ解析したところ、非刺激時に比べて変動比 2 倍以上上昇した遺伝子が 976、反対に減少した遺伝子が 989 あった。これらを GO 解析にかけたところ、変動比 3 倍以上で発現上昇した遺伝子が 37、発現減少した遺伝子が 131 であった。

(4) 抗 E-cadherin 抗体を用いた免疫蛍光細胞化学にて H₂O₂ 刺激時の Ca9-22 を観察したが、H₂O₂ 刺激の有無にかかわらず Ca9-22 における E-cadherin の発現は観察されなかった。この原因として、使用した抗体の反応性および抗体濃度の設定に起因する単純な手技的問題が考えられたため、異なる条件で再検討することにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hiromura Munenori, Nohtomi Kyoko, Mori Yusaku, Kataoka Hideo, Sugano Marika, Ohnuma Kei, Kuwata Hiroataka, Hirano Tsutomu. Caveolin-1, a binding protein of CD26, is essential for the anti-inflammatory effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on human and mouse macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有、2017
DOI:10.1016/j.bbrc.2017.11.016

〔学会発表〕(計 2 件)

菅野 真莉加、山本 松男、重度の薬物性歯肉増殖症患者から学ぶ医科歯科連携の重要性、日本歯周病学会 60 周年記念京都大会、2017

菅野真莉加、森崎弘史、桑田啓貴、山本松男、カチオン性ナノバブルと口腔細菌およびバイオフィルムとの静電的相互作用に関する研究、第 6 回日本マイクロ・ナノバブル学会学術総会、2017

小田中 響、小濱 孝士、菅野 真莉加、板部 洋之、山本 松男、ペリクル・歯肉溝浸出液 (GCF) ・唾液のタンパク質パターンを検討、第 64 回昭和大学学士会総会、2017

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。