

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19592411

研究課題名（和文）

口臭原因物質である短鎖揮発性脂肪酸が歯周炎に及ぼす影響についての基礎的研究

研究課題名（英文）

A basic research for the importance of the short chain-chain fatty acid butyrate, one of the oral malodor compounds from the periodontopathic bacteria, on the development of periodontal disease.

研究代表者

安井 利一（YASYU TOSHIKAZU）

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：2014652

研究成果の概要：

幾つかの口臭原因物質が、生物活性を有していることが示されている。実際、私供は、口臭原因物質メチルメルカプタンが、マクロファージに対して、様々な生物活性を有している可能性を示している。また、酪産（ブチル酸）を中心とした揮発性脂肪酸も強い悪臭物質で、口臭に関与することが報告され、さらに、種々の細胞に対して、アポトーシスを誘導することが示されている。しかしながら、ブチル酸のマクロファージに関する作用についての検討はほとんど無い。そこで、ブチル酸を中心とした揮発性脂肪酸が、歯周炎の病態形成に関与する病原性因子として機能するか否か検討することは意義あることと考え、昨年度、検討を行った。その結果、炎症を終焉に誘導する物質として注目されている一酸化窒素（Nitric oxide; NO）により誘導されるマクロファージ様細胞RAW264.7細胞のアポトーシスを、揮発性脂肪酸であるブチル酸が抑制した。故に、この揮発性脂肪酸が、RAW264.7細胞のアポトーシスを強く抑制するメカニズムを検討した。その結果、以下の知見を得た。

RAW264.7細胞において、酪酸はNOによって誘導される cytochrome *c* の放出と caspase の活性化を阻害したが、NO 誘導性癌抑制遺伝子 p53 とアポトーシス促進性タンパク質 Bax の発現を抑制しなかった。酪酸は、アポトーシス抑制タンパク質の Bcl-2 の発現を誘導した。この Bcl-2 の anti-sense oligonucleotide を用いた実験から、酪酸誘導性 Bcl-2 が、NO によって誘導される RAW264.7細胞のアポトーシスに重要な役割を担っている可能性が明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口臭原因物質、揮発性脂肪酸、酪産（ブチル酸）、アポトーシス、マクロファージ、炎症、歯周炎予防

## 1. 研究開始当初の背景

最近、わが国では、8020 運動をはじめとして、様々な歯科保健活動が実施され、国民に対する歯科保健意識の向上が図られている。そのため、国民の多くが、口腔の健康を保持・増進することの意識を有するようになった。したがって、う蝕と歯周病だけでなく、口臭に関しても強い関心を持つ者が増加してきた。実際、45-54 歳の約 20% が口臭を気にしているとの報告もある。このような現状をふまえ、口臭に関する研究・調査が盛んに行われるようになった。その結果、口臭症には、真性と仮性があり、また、多くの真性口臭症は、全身的な疾患によるものでなく、口腔に起因することが明らかにされている。また、幾つかの報告は、口臭と歯周炎の病態に正の相関関係の存在することを示している。

すでに、幾つかの口臭原因物質は、生物活性を有していることが明らかにされている。実際、私の属する研究グループも、口臭原因物質メチルメルカプタンが、マクロファージに対して、様々な生物活性を有している可能性を示している。また、酪産（ブチル酸）を中心とした揮発性脂肪酸は、種々の細胞に対して、アポトーシスを誘導することが示されている。しかしながら、ブチル酸のマクロファージに関する作用についての検討はほとんど無い。そこで、ブチル酸を中心とした揮発性脂肪酸が、歯周炎の病態形成に關与する病原性因子として機能するか否か検討することは意義あることと考えた。故に、口臭原因物質である揮発性脂肪酸が、マクロファージの活性化誘導作用と本細胞のアポトーシスの抑制作用を有するか否かについて詳細に検討することを企画した。

## 2. 研究の目的

歯周炎は、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を中心とする歯周病原性細菌による感染により誘導される歯肉の炎症と骨吸収を特徴とする疾患である。近年の歯周炎研究の結果から、本疾患は、歯周病原性細菌が有するリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) や線毛が、マクロファージに作用し、本細胞を活性化させ、活性化された本細胞は、炎症性サイトカイン (IL-1 や TNF- $\alpha$ ) を産生し、強い炎症が惹起されることが示されている。また、これらの炎症性サイトカインは、骨吸収活性を有することから、歯槽骨に破骨細胞が誘導され、歯槽骨が破壊されることも明らかにされている。また、LPS や線毛は、マクロファージを活性化させるだけでなく、その細胞の細胞死 (アポトーシス) を阻害する

ことにより、炎症反応の終焉を阻止し、その反応を継続させることにより病態を慢性化させる作用を有していることが示されている。実際、リウマチ性関節炎などの慢性炎症性疾患の病態局所においても、マクロファージの活性化とアポトーシスの抑制が同時に発生していることが示されている<sup>6, 7)</sup>。一方、最近の研究から、口臭原因物質として、様々な物質が明らかにされ、また、その原因物質の多くは、歯周病原性細菌由来である可能性が示されている。従って、これらの原因物質が、歯周病原性細菌由来の病原因子として、積極的に病態形成に關与する可能性を考察した。

幾つかの口臭原因物質は、生物活性を有していることが明らかにされている。口臭原因物質である酪産（ブチル酸）を中心とした揮発性脂肪酸は、種々の細胞に対して、アポトーシスを誘導することが示されている。しかしながら、ブチル酸のマクロファージに関する作用についての検討はほとんど無い。そこで、ブチル酸を中心とした揮発性脂肪酸が、歯周炎の病態形成に關与する病原性因子として機能するか否か検討することは意義あることと考えた。故に、口臭原因物質である揮発性脂肪酸が、マクロファージの活性化誘導作用と本細胞のアポトーシスの抑制作用を有するか否かについて詳細に検討することを企画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を使用した。細胞は penicillin G 100 U/ml (Gibco; Invitrogen, Auckland, NZ, USA) と streptomycin sulfate 100  $\mu$ g/ml (Gibco) を含む 10% 牛胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS; Hyclone, Logan, UT, USA) 添加 RPMI 1640 medium (Gibco) 中で、37、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養し、3 日毎に継代維持した。

### (2) NO 発生剤 (NO donor)

NO donor として sodium nitroprusside dihydrate (SNP; 和光純薬、大阪) と S-nitrosoglutathione (GSNO; 和光純薬) を使用した。

### (3) 揮発性脂肪酸

酪酸 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH; MW 88.1) は、Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入し使用した。また、イソ酪酸 (Sigma) とプロピオン酸 (Sigma) などの短鎖揮発性脂肪酸を実験に供した。

#### (4) 色素染色性による細胞死判定方法

RAW264.7 細胞の細胞死を判定するために、細胞のcrystal violet色素染色性を検討した。細胞 ( $2 \times 10^4$ 個) を 96 穴マイクロプレート (Becton Dickinson, Oxford, CA, USA) の各wellに播種し、10% FBSを含むRPMI 1640 mediumにて、37、5% CO<sub>2</sub>環境下で培養した。24 時間後、細胞を、Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> 不含 phosphate-buffered saline [PBS (-)] (日水製薬、東京) で3回洗浄し、各濃度の酪酸および5% FBSを含むRPMI 1640 mediumを添加し12 時間培養した。その後、PBS(-)で洗浄し、各濃度の SNP を各wellに添加し、所定時間培養した。PBS (-) で3回洗浄後、細胞を染色するために0.5%crystal violet 溶液 (Merck, Darmstadt, Germany) を各wellに50  $\mu$ l 添加し、室温にて5分間インキュベートした。細胞を洗浄後、細胞溶解液 (10% Nonidet P-40, 0.2% SDS) で細胞を溶解した。その後、吸光度計 Multiscan (Labsystem, Helsinki, Finland) を使用して620 nmにおける各wellの吸光度、すなわち相対的な生細胞数を測定した。

#### (5) アガロースゲル電気泳動法による DNA 断片化像の検出

3 cmシャーレに培養したRAW264.7 細胞を、細胞死判定方法と同様の条件下で培養後、細胞溶解液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 0.5% TritonX-100] を用いて溶解した。既報<sup>28)</sup>に従って、その溶解液をRNase と Proteinase K で消化後、DNAを抽出した。DNAをTE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA] に溶解後、2% アガロースゲル (Nusieve, Rockland, ME, USA) で電気泳動を行った。DNAの断片化像は、エチジウムブロミド色素 (Sigma) で染色を行い、DNAの断片化を観察した。

#### (6) Caspase 特異的阻害剤

Caspase-3, caspase-8、並びに、caspase-9 の特異的阻害剤として、それぞれ Z-Asp- Glu- Val-Asp-fluoromethyl ketone (Z-DEVD-FMK)、Z-Ile-Glu-Thr-Asp-fluoromethyl ketone (Z-IETD-FMK)、並びに、Z-Leu-Glu-His-Asp-fluoromethyl ketone (Z-LEHD-FMK) を Biovision (Palo Alto, CA, USA) から購入した。また、Z-Phe-Ala-fluoromethyl ketone (Z-FA-FMK) を、caspase 阻害剤の negative control として Kamiyama Biomedic Company (Seattle, WA, USA) から購入した。

#### (7) Cytochrome *c* の測定

Leist らの方法に部分的な変更を加えた方法で検討を行った。細胞死判定方法と同様の条件下で培養した RAW264.7 細胞を、streptolysin *O* (1 unit/ml)、1 m M

phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、並びに1% bovine serum albumin (BSA) を含む PBS (-) 中にて37 で30分反応させた後、1400g で遠心し、上清を回収した。その後、蛋白質を抽出し、電気泳動後、マウス抗ハト cytochrome *c* 抗体 (7H8.2C12; BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) を作用させ Western blot assay にて検出した。

#### (8) Western blot assay

RAW264.7 細胞を、細胞死判定方法と同様の条件下で培養後、細胞溶解液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, 0.25 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml Aprotinin] で溶解し、タンパク質を抽出した。抽出液中のタンパク質濃度を、Bradfordらの方法により測定した。10~50  $\mu$ g のタンパク質を Tris-glycine 緩衝液 [25 mM Tris-HCl (pH 8.8), 192 mM glycine, 0.1% SDS] を用いた、15% polyacrylamide gel (Bax, Bcl-2、並びに、cytochrome *c* 検出用 gel) あるいは10% polyacrylamide gel (p53 検出用 gel) による SDS-PAGE により分離した。泳動終了後、タンパク質をセミドライ式転写装置で、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (MILLIPORE Co., Bedford, MA, USA) に転写した。転写終了後、そのPVDF膜に5% skim milk を含む0.1% Tween-20 /Tris buffer saline [TBS; 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl] を用い4、12 時間ブロッキング処理を行った。その後、その膜を、0.1% Tween-20 を含む TBS buffer で2回洗浄した。それぞれの膜に、マウス抗ヒト heat-shock protein (Hsp70) 抗体 (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada) ウサギ抗ヒト p53 抗体 (FL-393; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)、ウサギ抗ヒト Bax 抗体 (N-20; Santa Cruz Biotechnology Inc.)、ウサギ抗ヒト Bcl-2 抗体 (N-19; Santa Cruz Biotechnology Inc.)、並びに、マウス抗ハト cytochrome *c* 抗体を、4 条件下で、12 時間反応させた。その後、その膜を、0.1% Tween-20 を含む TBS buffer で2回洗浄した。さらに、二次抗体として、それぞれ horseradish peroxidase 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)、又は、horseradish peroxidase 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体を使用した。二次抗体反応後、そのPVDF膜に、West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, Meridian Road, Rockford, IL, USA) を作用させ、それぞれのタンパク質の発現を検討した。

#### (9) RNA 調製法および Northern blot assay

RAW264.7 細胞を 6 M guanidine isothiocyanate 溶液 5.3 ml で溶解し、その溶解液を 5 M cesium chloride 溶液 2 ml に重層し、18 時間、 $100.000 \times g$  で密度勾配遠心分離を行った後、総 RNA を回収し、3 M sodium acetate を添加した後、ethanol で沈殿し RNA を得た。遺伝子発現は、Northern blot assay で解析した。すなわち、総 RNA をグリオキサル存在下で変性後、1% agarose gel で電気泳動を行い、RNA をナイロン膜 (MSI Magnagraph, Westboro, MA, USA) に転写し固定した。このナイロン膜を 50% formamide, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), 1% SDS,  $5 \times$  SSC ( $1 \times$  SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0),  $1 \times$  Denhardt's solution [0.02% Ficoll, 0.02% bovine serum albumin (BSA), 0.02% polyvinylpyrrolidone]、並びに 1 mg/ml denatured salmon sperm DNA を含む prehybridization buffer で 42、18 時間、プレハイブリダイゼーションを行った。その後、あらかじめ [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (Amersham Biosciences) と Megaprime DNA labeling system (Amersham Biosciences) を用いてアイソトープ標識した Bcl-2、並びに、 $\beta$ -actin (ONCOR, Gaithersburg, MD, USA) の各 cDNA をプローブとし、10% dextran sulfate を含む prehybridization buffer 中で 42 で 18 時間ハイブリダイゼーションさせた。反応後、ナイロン膜を洗浄液 ( $5 \times$  SSC, 1% SDS) で処理後、Kodak X-OMAT film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) を用いて -80 で 24 時間オートラジオグラフィーを行った。

#### (10) Anti-sense oligonucleotide による 蛋白質発現の抑制

すでに、Bcl-2 の遺伝子配列が検討され、効果的な anti-sense oligodeoxynucleotide の塩基配列 (5'-TCTCCAGCGTGCCCAT-3') が明らかになっている。そこで、その塩基配列を持つ Bcl-2 anti-sense phosphorothioate oligodeoxynucleotide (Bcl-2 anti-sense ODN) をファスマック (厚木、神奈川) に作製を依頼した。また、Bcl-2 sense oligonucleotide (5'-TACCGCGTGCGA-CCCTCT-3'; Bcl-2 sense ODN) (ファスマック) を作製し、コントロールとして用いた。RAW264.7 細胞への Bcl-2 anti-sense ODN と Bcl-2 sense ODN の取り込みは、Fugene 6 transfection reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA) を用いて行った。

#### (11) Bcl-2 阻害剤

Bcl-2 ファミリータンパク質で、かつ、アポトーシス促進活性を有する Bax subfamily と BH<sub>3</sub>-only protein に共通して保存されて

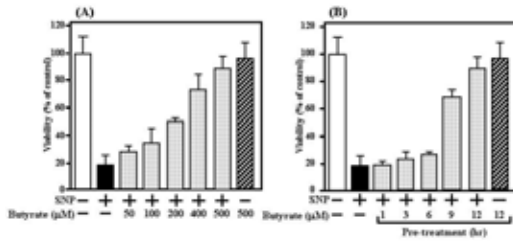
いる Bcl-2 結合領域 BH<sub>3</sub> の death domain のアミノ酸配列から作製された細胞膜透過性 Bcl-2 binding peptide [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CONH-Lys-Asn-Leu-Trp-Ala-Ala-Gln-Arg-Tyr-Gly-Arg-Glu-Leu-Arg-Arg-Met-Ser-Asp-Glu-Gly-Ser-Phe-Lys-Gly-Leu-OH}$ ; Calbiochem, La Jolla, CA, USA] を実験に供した。また、コントロールとして細胞膜透過性 Bcl-2 binding peptide negative control [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CONH-Lys-Asn-Leu-Trp-Ala-Ala-Gln-Arg-Tyr-Gly-Arg-Glu-Ala-Arg-Arg-Met-Ser-Asp-Glu-Gly--Ser-Phe-Lys-Gly-Leu-OH}$ ; (N 末端から 13 番目のロイシンをアラニンに置換)、Calbiochem] を使用した。また、Bcl-2 の BH<sub>3</sub> への結合を抑制する ethoxy-11,12-dihydrodibenzo[c,g][1,2]-diazocine 5,6-dioxide を、Calbiochem から購入し実験に供した。

## 4. 研究成果

### (1) NO 誘導性細胞死に対する酪酸の作用

NO donor である SNP 500  $\mu\text{M}$  で 12 時間処理したマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 の培養上清における NO 量を、Griess 法で測定し、NO<sub>2</sub> 量として  $22.0 \pm 2.52 \mu\text{M}$  (Control;  $0.12 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) であることを確認している (データは示さない)。また、NO donor は、SNP だけでなく、GSNO が、本細胞の細胞死を強く誘導することを確認している<sup>50)</sup>。そこで、RAW264.7 細胞において、SNP を用い、NO 誘導性細胞死に関する酪酸の作用を、crystal violet 色素染色法で検討した。その結果、図 1(A) に示すように本細胞へ NO によって誘導される細胞死は、酪酸の濃度に依存して著明に抑制された。図 1(B) に示すように酪酸の処理時間は 9 時間以上が必要であることが示された。また、この酪酸による NO 誘導性細胞死に関する抑制作用が、pH の低下によるものではないことを確認するために、酢酸を添加し検討を行ったところ、その様な抑制作用は、認められなかった (データは示さない)。また、結果は示さないが、イソ酪酸とプロピオン酸は本細胞の NO 誘導性細胞死に対して有意な阻害作用を示さなかった。一方、酪酸ナトリウム塩 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COONa}$ ; MW 110.1) (500  $\mu\text{M}$ ) は、本細胞において、NO 誘導性細胞死を強く抑制した (データは示さない)。これらの結果から、RAW264.7 細胞において、酪酸は NO 誘導性アポトーシスを、酪酸は pH の低下によってではなく、それ自体の生物学的活性の一つとして強く抑制することが示された。

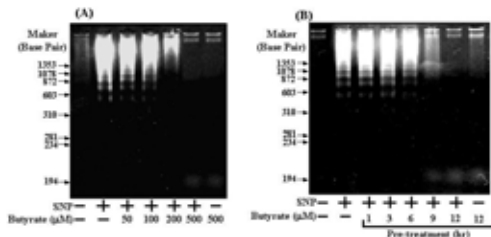
図1



(2) NO誘導性DNA断片化に対する酪酸の抑制作用

NOによるRAW264.7細胞のアポトーシスを酪酸が抑制する可能性について、詳細に検討する目的で、アガロースゲル電気泳動法を用いてDNAの断片化の誘導を調べた。その結果、NOによって強く誘導される本細胞のDNAの断片化は、酪酸によって強く抑制されることが明らかになった [図 2(A)]。図 2(A) から明らかなようにこの抑制作用は酪酸の濃度に依存した。さらに、NO誘導性DNA断片化に対する酪酸の抑制作用は、この揮発性脂肪酸の処理が6時間以上必要であること、12時間処理で著しく抑制されることが明らかとなった [図 2(B)]。また、酪酸も本細胞において、NO誘導性DNA断片化を強く阻害することを確認している。これらの知見から、NOによって誘導されるRAW264.7細胞のアポトーシスは、酪酸により強く抑制されることが明らかとなった。

図2

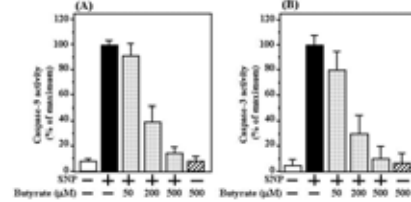


(3) NO誘導性のミトコンドリア caspase 情報伝達経路の活性化に対する酪酸の抑制作用

RAW264.7細胞のNOによるアポトーシス情報伝達においてミトコンドリアからのcytochrome *c* 放出の重要性が示されている。そこで、本細胞においてNO誘導性アポトーシスに関する酪酸の抑制作用がそのcytochrome *c*の放出を阻害するものによるのか否か検討した。その結果、酪酸はNO誘導性cytochrome *c*の放出をその濃度依存的に阻害した。また、RAW264.7細胞においてNOによるcytochrome *c*の放出はcaspase-9とcaspase-3を活性化し、それらの活性化

caspaseが、アポトーシスに密接に関連する。実際、本細胞においてNO誘導性アポトーシスは、caspase-9阻害剤(Z-LEHD-FMK)とcaspase-3阻害剤(Z-DEVD-FMK)によって強く抑制された(データは示さない)。また、そのNO誘導性アポトーシスは、caspase-8阻害剤(Z-IETD-FMK)とnegative control(Z-FA-FMK)前処理で全く影響をおよぼさなかった(データは示さない)。そこで、本細胞においてNOによるcaspase-9とcaspase-3の活性化に関する酪酸の作用を検討した。その結果、図3(A)と(B)に示すように、NO誘導性のcaspase-9およびcaspase-3の活性化は、酪酸の濃度に依存して抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、RAW264.7細胞において、酪酸は、NO誘導性cytochrome *c*の放出を強く阻害することにより、caspase-9/caspase-3の情報伝達路を遮り、NO誘導性アポトーシスを強く抑制することが示された。

図3



(4) NO誘導性p53とBaxの発現に対する酪酸の作用

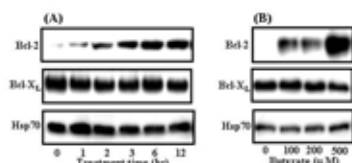
NOによるRAW264.7細胞のアポトーシスにおいて、NOによって細胞内に蓄積されたp53がBaxを誘導し、そのBaxがcytochrome *c*の放出を促すことが示されている。そこで、酪酸のNO誘導性アポトーシスに対する抑制作用は、この揮発性脂肪酸が、p53やBaxの発現を抑制することによるものである可能性を推察した。その点について、Western blot assayを行い検討を加えた。その結果、NOによって、細胞内に蓄積したp53は、酪酸の前処理によって、何ら変化しなかった(データは示さない)。また、NO誘導性Baxの発現も、酪酸の作用によって、有意な変化を示さなかった。

(5) 酪酸によるアポトーシス抑制分子Bcl-2の発現の誘導

NOによるRAW264.7細胞のアポトーシスの誘導をBcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>、およびHsp70が抑制することが報告されている。そこで、本細胞において、酪酸が、これらのアポトーシス抑制分子を誘導することによって、NO誘導性アポトーシスを阻害する可能性を検討した。その

結果、図 4(A) と(B)に示すように、酪酸は Bcl-2 の発現をその処理時間と濃度に依存して誘導することが明らかとなった。一方、酪酸は Bcl-X<sub>L</sub> と Hsp70 の発現に何ら影響を与えなかった [図 4(A) と(B)]。この酪酸誘導性 Bcl-2 発現を、遺伝子レベルで検討するため、Northern blot assay を行った。その結果、RAW264.7 細胞において、酪酸は、Bcl-2 遺伝子発現を促進していることが明らかとなった。従って、本細胞において、NO 誘導性アポトーシスに対する酪酸の抑制作用には、アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現の促進が関与している可能性が示された。

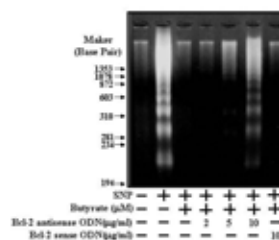
図4



(6) NO による誘導性アポトーシスに対する酪酸の抑制作用における Bcl-2 の機能的役割

RAW264.7 細胞において、NO 誘導性アポトーシスに対する酪酸の抑制作用が、アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現を促進することによって担われている可能性を検討する目的で、Bcl-2 anti-sense ODN を用い検討した。すなわち、本細胞に取り込まれた Bcl-2 anti-sense ODN が、酪酸誘導性 Bcl-2 タンパク質を特異的に阻害することによって、NO 誘導性アポトーシスに対する酪酸の抑制作用が阻害されるか否か検討を加えた。その結果、Bcl-2 anti-sense ODN で処理した本細胞において、NO 誘導性アポトーシスに対する酪酸の抑制作用は、著しく減弱することが明らかとなった(図 5)。一方、図 5 に示すように、Bcl-2 sense ODN は、何ら影響を与えなかった。さらに、この Bcl-2 の阻害剤である細胞膜透過性 Bcl-2 binding peptide を細胞に処理したところ、NO 誘導性アポトーシスに対する酪酸の抑制作用は、著明に阻害された(データは示さない)。これらの結果から、RAW264.7 細胞において、NO 誘導性アポトーシスに対する酪酸の抑制作用が、アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現を促進することによって担われていることが強く示された。

図5



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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

竹下 玲、安井利一：マクロファージアポトーシスの検討とその歯周炎の病態における意義。第 56 回日本口腔衛生学会・総会、江戸川区、2007 年 10 月。(自由集会)

竹下 玲、末續真弓、高野安紀子、広瀬公治、永井明子、鐘ヶ江晴秀、安井利一：レチノイン酸は骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞の分化誘導を誘導し血清誘導性転写因子 activator protein-1 を抑制する。第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会、札幌市、2007 年 8 月。

末續真弓、竹下 玲、清水良昭、松本 勝、深井智子、福浦えり子、須田陽子、宮澤 慶、安井利一：マクロファージ様細胞の NO 誘導性アポトーシスに関する TGF-β の増強作用の情報伝達経路についての検討。第 56 回日本口腔衛生学会・総会、江戸川区、2007 年 10 月。

竹下 玲、末續真弓、高野安紀子、広瀬公治、永井明子、仲田幸代、半澤玲子、鐘ヶ江晴秀、安井利一：レチノイン酸は骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞の分化とレチノイン酸レセプター RAR の活性化を誘導する。第 56 回日本口腔衛生学会・総会、江戸川区、2007 年 10 月。

末續真弓、竹下 玲、高野安紀子、広瀬公治、清水良昭、遠藤浩正、永井明子、宮澤慶、鐘ヶ江晴秀、安井利一：骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞においてレチノイン酸は転写因子 AP-1 の発現を強く抑制する。第 57 回日本口腔衛生学会・総会、さいたま市、2008 年 10 月

田谷かほる、広瀬公治、大橋明石、竹下 玲、安井利一、浜田節男：トレハ

ロースはI $\kappa$ B- $\alpha$ の分解を抑制してマクロファージからのLPS誘導性IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ の産生を抑制する。第57回日本口腔衛生学会・総会、さいたま市、2008年10月

〔図書〕(計 2件)

安井利一：第1章スポーツ歯科医学概論；スポーツ歯科臨床マニュアル、日本スポーツ歯科医学会編集（編集責任者；大山喬史、河野一郎、安井利一）医学情報社、東京、7-11、2007年9月  
安井利一：スポーツ歯科入門ハンドブック（編集責任者；安井利一）医学情報社、東京、2009年3月（編集中）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安井利一（YASYU TOSHIKAZU）  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号：2014652

### (2) 研究分担者

竹下 玲（TAKESHITA AKIRA）  
明海大学・歯学部・准教授  
研究者番号：70236454  
清水良昭（SIMIZU YOSIAKI）  
明海大学・歯学部・准教授  
研究者番号：90206219  
松本 勝（MASTUMOTO MASARU）  
明海大学・歯学部・准教授  
研究者番号：00209652  
高野安紀子（TAKANO AKIKO）  
明海大学・歯学部・助教  
研究者番号：20337504

### (3) 連携研究者