

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19034

研究課題名（和文）歯肉接合上皮細胞におけるレドックス制御因子Nrf2の細胞接着装置への影響の解析

研究課題名（英文）The effect of Nrf2 on the intercellular adhesion in gingival junctional epithelial cells

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト歯肉上皮細胞株（Ca9-22 cell）および当研究室で樹立したマウス接合上皮細胞株（JE-1 cell）を用いて、酸化ストレス制御因子Nrf2が歯肉上皮細胞の細胞間接着装置に及ぼす影響を評価した。また、Nrf2誘導剤であるスルフォラファンが及ぼす影響についても検討した。

その結果、Ca9-22 cellにおいて、スルフォラファンはH2O2による酸化刺激後のNrf2核内移行量を促進し抗酸化作用を示す可能性が示唆された。また、スルフォラファンは歯肉上皮細胞の細胞接着装置の一部の発現に影響を及ぼすことで上皮のバリア機能を維持する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病の罹患率は高齢化に伴って年々増加し、今や国民病とも言われている。歯周病はバイオフィルムによる慢性炎症性疾患であり、症状のないまま緩慢に進行するため歯科受診時にはすでに中等度以上進行している場合も多い。歯周病原細菌の生体内への侵入プロセスには、細菌側の病原因子だけでなく、生体側、特に歯肉上皮の防御機構の破綻が生じる。

本研究結果により、感染防御の最前線である歯肉上皮細胞の物理的バリア機能を司る細胞間接着機構についての解明が進むことは、その維持や修復を目的とした新しい予防・治療法の発見につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, using a human gingival epithelial cell line (Ca9-22 cell) and a mouse junctional epithelial cell line (JE-1 cell) established in our laboratory, we studied that the oxidative stress regulator Nrf2 affects intercellular adhesion of gingival epithelial cells. We also investigated the effect of sulforaphane, an Nrf2 inducer.

As a result, it was suggested that sulforaphane may promote Nrf2 nuclear translocation and exhibit antioxidant effects after oxidative stimulation by H2O2 in Ca9-22 cells. It was also suggested that sulforaphane may maintain the epithelial barrier function by affecting the expression of a part of the intercellular adhesive molecule of gingival epithelial cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：酸化ストレス 歯肉上皮 抗酸化 細胞接着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は歯周病原細菌による慢性炎症性疾患であり、歯周炎で認められる歯周ポケットは、歯肉上皮細胞の細胞間接着機構の破綻による細胞間断裂の結果、内縁上皮の潰瘍形成と深化拡大、さらに好中球の動員増に伴う炎症カスケードの進行によって組織破壊が起こることで形成される。自然免疫において重要な役割を果たしている好中球は、病原体を排除するために活性化すると感染防御のために種々の活性酸素種を供給するが、過剰な活性酸素は宿主障害をもたらす酸化ストレスとなる。実際、歯周炎で歯肉や唾液、血液中の活性酸素が増加することが示されている。

(2) 転写因子 Nrf2 (NF-E2 related factor 2) 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。非ストレス下の細胞では Nrf2 は細胞質で分解されて核内に移行できないが、細胞が酸化ストレスなどに曝されると Nrf2 の分解が阻害されて核内に移行し、各種炎症性サイトカイン産生を抑制する分子を発現して抗炎症および抗酸化効果に寄与する。このように、Nrf2 が酸化ストレスを統一的に制御し抗炎症作用をもたらすことは過去の様々な研究で報告されているが、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。

2. 研究の目的

酸化ストレス制御因子 Nrf2 が歯肉上皮細胞の細胞間接着装置に及ぼす影響を評価することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯肉上皮細胞株 (Ca9-22 cell) および当研究室で樹立したマウス接合上皮細胞株 (JE cell) を種々の濃度の過酸化水素 (H_2O_2) で刺激し、酸化ストレスを誘導した。酸化ストレス誘導前後の核内 Nrf2 の移行量、各種細胞接着分子の発現量を評価した。

(2) ブロッコリースプラウトに多く含まれるファイトケミカルの一種で Nrf2 を活性化することが知られているスルフォラファン (Sulforaphane; SFN) が歯肉上皮細胞にどのような影響を及ぼすのかについても検討するため、酸化ストレス誘導前後の核内 Nrf2 の移行量、各種細胞接着分子の発現量および FITC-dextran の透過率を評価し、酸化ストレスによる細胞間接着への影響をスルフォラファンの前処置の有無によって比較評価した。

(3) Nrf2 が歯肉上皮細胞に及ぼす影響を網羅的に解析するため、 $10\mu M$ のスルフォラファンで前処理した Ca9-22 cell 及び前処理しない Ca9-22 cell に対して $200\mu M H_2O_2$ による酸化ストレス刺激を行い、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。

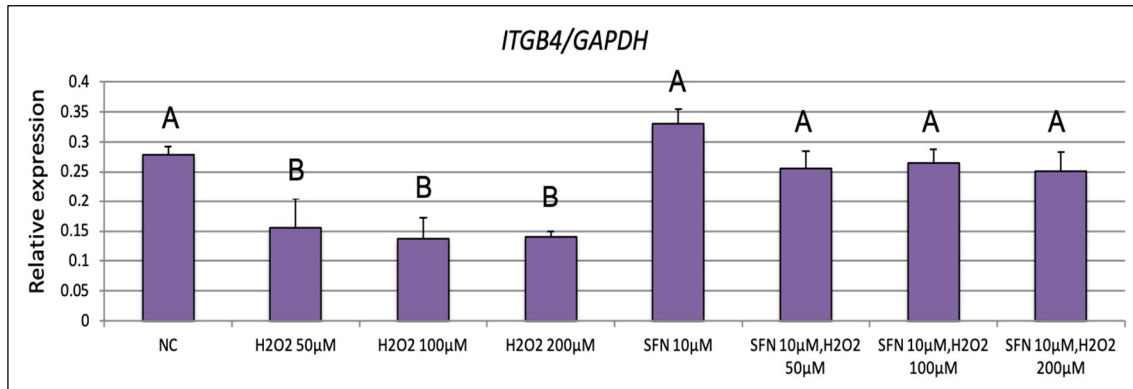
(4) JE cell の酸化ストレス耐性を評価するため、種々の濃度の H_2O_2 で刺激して酸化ストレスを誘導し、細胞障害性を LDH assay にて、細胞生存率を CCK-8 assay にて評価した。

4. 研究成果

(1) Ca9-22 cell を $50, 100, 200\mu M$ の H_2O_2 濃度で刺激し酸化ストレスを誘導したが、Nrf2 の核内移行量は変化しなかったが、 H_2O_2 濃度依存的に *ITGB4*、*DSG3*、*CLDN1* の発現が減少した。

(2) CCK-8 assay による細胞生存率と LDH assay による細胞障害性から、Ca9-22 cell におけるスルフォラファンの最適濃度を $10\mu M$ と設定した。

スルフォラファン未処理群は H_2O_2 濃度によらず Nrf2 の核内移行量は変化しなかったが、スルフォラファン前処置後は H_2O_2 濃度依存的に Nrf2 の核内移行量が増加したことから、スルフォラファンは歯肉上皮細胞において酸化ストレスによる Nrf2 の核内移行を促進する可能性が示唆された。また、FITC-dextran の透過係数は H_2O_2 濃度依存的に増加したが、スルフォラファンの前



処置により減少した。さらに、下図に示すように、 H_2O_2 濃度依存的に減少した *ITGB4* の発現がスルフォラフアンの前処置により回復したことから、スルフォラフアンは歯肉上皮細胞の細胞接装置を構成する分子の一部の発現に影響を及ぼすことで上皮のバリア機能を維持する可能性が示唆された。

(3) H_2O_2 による酸化ストレス刺激によって2倍以上の発現上昇が見られた遺伝子が371、発現低下した遺伝子が271、スルフォラフアン刺激によって2倍以上発現上昇した遺伝子が97、発現低下した遺伝子が15だった。

(4) H_2O_2 濃度依存的にJE cellの細胞生存率が低下したが、細胞障害性についてはデータが安定せず、 H_2O_2 による酸化ストレス刺激の適正化には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅野真莉加、田中準一、美島健二、山本松男
2. 発表標題 歯肉上皮細胞のバリア機能に及ぼすスルフォラファンの効果
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------