

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592457

研究課題名(和文) 脂肪細胞の分泌因子が歯周病態に及ぼす影響の解明とその制御による歯周病予防法の開発

研究課題名(英文) Investigation of effect of soluble factors from adipose tissue on periodontitis, and development of prophylactic approach with these regulation

研究代表者

秋房 住郎 (AKIFUSA SUMIO)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：40295861

研究成果の概要(和文)：

脂肪細胞が産生する分泌因子の一つであるアディポネクチンのマクロファージに及ぼす影響について検討したところ、歯周病原性細菌由来のリポ多糖が誘導する炎症性反応を抑制した。一方、アディポネクチンを単独で作用させるとマクロファージのサイトカイン分泌を刺激した。また、長期間作用させると、活性酸素種と一酸化窒素の産生を經由してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

We examined the effect of adiponectin, one of adipokine derived from mature adipocyte, on activity of macrophage, and found that administration of adiponectin reduced the lipopolysaccharide-induced inflammatory response. On the other hand, stimulation with adiponectin alone induced cytokine secretion, generation of reactive oxygen species and nitric oxide, followed by apoptotic cell death, in macrophage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：メタボリックシンドローム、歯周疾患、肥満

1. 研究開始当初の背景

肥満は糖尿病や心血管障害の原因となることから、肥満人口が増加している先進諸国では大きな健康問題となっている。我が国でも内臓肥満症候群（メタボリックシンドローム）は健康施策の重要課題として位置づけられており、40歳から75歳未満のすべての保険加入者に対して、メタボリックシンドロ

ームを予防することを目的とした特定健康診査・特定保健指導が平成20年4月から導入されたところである。

脂肪を蓄積して肥大した脂肪組織ではインスリンの機能を低下させる各種アディポカインの分泌が亢進するため、肥満者ではインスリン抵抗性が起こり、糖や脂質の代謝異常がおこることが知られている。また、肥大

した脂肪細胞は腫瘍壊死因子 (TNF- α ; tumor necrosis factor- α) や interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインを持続的に分泌するため、近年では「肥満」それ自身が「軽度の全身的な炎症状態」として認識されるにいたっている (Nature Rev. Immun. 6:772-783, 2006)。例えば、肥満による心臓血管障害は、インスリン抵抗性により生じる連鎖的な脂質代謝異常と、前疾患的で持続的な軽度の炎症状態の合併により生じるものと考えられている。

肥満やメタボリックシンドロームと歯科疾患の関係については、我々のグループが行った疫学研究の結果から歯周病との関連を指摘したところであり (N. Engl. J. Med. 339:482-483, 1998, J. Dent. Res. 86:271-275, 2007)、他の多くの研究グループからも報告されてきている。

代表的な炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6 はインスリン機能や糖代謝を低下させるなどエネルギー代謝に影響を与え、脂肪組織からも分泌されることからアディポカインに分類されている。これらに加え、angiotensinogen, apelin, chemerin, leptin, obestatin, omentin, PAI-1 (1型 plasminogen activator inhibitor), resistin, vaspin, visfatin など様々なアディポカインが見出され、アディポカインの生理活性や、血中濃度と病態との関連について精力的に研究が行われている。一方、アディポカインの中には脂肪の蓄積に従い分泌が抑制され、体格指数 (body mass index; BMI) と逆相関を示すアディポネクチンの存在が知られており、近年の研究から代謝や免疫機能に多様な影響を与えることがわかってきている。

2. 研究の目的

アディポカインのうち抗炎症性作用を持つとされるアディポネクチンに注目し、その免疫機能に対する役割を解析するため、マクロファージの活性に与える影響に関する以下の2点について、分子生物学的手法により解析する事により、肥満が関連する歯周病の発症メカニズムの一端を解明しようとするものである。

(1) リポポリ多糖によりマクロファージに惹起される炎症反応に対するアディポネクチンの抗炎症性作用

アディポネクチンで前処理したマクロファージにおいて、歯周病原性細菌 *Aggregatibacter actinomucetemcomitans* 由来のリポポリ多糖 (LPS) の刺激により誘導される炎症性反応がどのように変化するか、分子細胞学的手法を用いて解明する。

(2) アディポネクチン単独刺激に対するマクロファージの挙動

マクロファージをアディポネクチン単独で刺激した際の遺伝子発現を解析するとともに、長時間作用させた際の生存活性に与える影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞

マウスマクロファージ様細胞株 RAW 264 細胞を用いた。培養はウシ胎児血清、ゲンタマイシン 50 $\mu\text{g/ml}$ 含有 RPMI1640 にて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 存在下で行った。また、RAW 264 細胞に bcl-2, suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) の発現ベクターを組み込んだ発現株およびベクターコントロール株 (empty vector; ev) は、選択培地として G418 50 $\mu\text{g/ml}$ を含有した培地により培養した。

(2) リコンビナントアディポネクチンの精製

球状アディポネクチン遺伝子を組み込んだ glutathione S-transferase (GST) タグ付きリコンビナントタンパク発現用ベクターは大阪大学医学部の下村教授から供与された。この発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し、大量発現したタンパクを Sepharose 4B (GE Healthcare) にて精製した。GST タグを PreScission protease (GE Healthcare) で消化した後、Affi-Prep polymyxin column (Bio-Rad Laboratories) よりエンドトキシンを除去したものを、リコンビナント球状アディポネクチン (gAd) として実験に供した。

(3) 遺伝子発現量、タンパク発現量、サイトカイン分泌量の解析

遺伝子発現量の解析はリアルタイム PCR 法 (StepOne Real-Time PCR System; Applied Biosystems) により行った。タンパク発現量の解析はウェスタンブロットの通法により行った。タンパク発現量の比較は目的タンパクとアクチンとのシグナル強度の比により算出した。シグナル強度は LAS-1000plus (FujiFilm) にて解析した。サイトカインの分泌量は、ELISA の通法により行った。

(4) ROS の測定

細胞を培養後、蛍光色素である 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) (5 μM) と MitoSOX (5 μM) で 30 分処理し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗滌後、フローサイトメーター (Beckman Coulter) にて検出した。DCFDA は励起波長 488 nm 検出波長 580 nm、MitoSOX は励起波長 510 nm、検出波長 580 nm により蛍光強度を測定した。

(5) NO の検出

Griess 法により NO を NO₂ に変換し検出試薬で発色後、540 nm の波長を分光光度計 SpectraMax 340PC384 spectrometer (Molecular Devices) で検出し、培地中の濃度を算出した。

(6) DNA の酸化障害の検出

染色体 DNA の酸化障害は fluorescein 5-isothiocyanate (FITC) タグ付き抗 8-oxoguanine 抗体を応用した OxyDNA kit (Biotrin Ltd)により検出した。2%パラホルムアルデヒドで固定した後、0.1% Triton X-100 で処理し PBS で 2 回洗滌後、FITC タグ付き抗 8-oxoguanine 抗体で 1 時間処理した。PBS で洗滌後、フローサイトメーターで励起波長 488 nm 検出波長 515 nm により蛍光強度を測定した。

(7) 初期アポトーシスの検出

蛍光色素である 100 nM のヨウ化プロピジウム(PI)と YO-PRO-1 (Molecular Probes)で細胞を 2 重染色し、PI は励起波長 510 nm、検出波長 580 nm、YO-PRO は励起波長 488 nm 検出波長 580 nm を用いてフローサイトメーターで検出した。PI は死細胞、YO-PRO はアポトーシス細胞の細胞膜を通過することから、PI 陰性・YO-PRO 陽性の細胞をアポトーシス細胞とした。

(8) ミトコンドリア膜電位の検出

細胞を培養後、蛍光色素の rhodamine 123 (0.4 μM)で 20 分処理し、PBS で洗滌後、励起波長 488 nm、検出波長 538 nm によりフローサイトメーターを用いて検出した。

(9) RNA 干渉

目的遺伝子および非特異的な small interfering RNA (Invitrogen)をそれぞれ 100 pmol の濃度で、lipofectamin 2000 (Invitrogen)により導入し、RNA 干渉実験に供した。

(10) 細胞内とミトコンドリア内 Ca²⁺濃度の測定

細胞内 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i) は以下の方法により測定した。0.04% pluronic acid F127 を含有した Fluo 4-AM(1 μg/ml)で 1 時間、37 °C で処理した後 PBS で洗滌し、励起波長 488 nm、検出波長 535 nm により分光光度計 SpectraMax Gemini spectrophotometer (Molecular Devices)にて蛍光強度を測定した。算出式は、 $[Ca^{2+}]_i = Kd(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ を用いた。このとき、カルシウム錯体解離定数 Kd は 0.36 mol/l、F は細胞の蛍光強度、F_{max}、F_{min} はそれぞれ、カルシウムイオノフ

ォアである A23187 (10 μM)と、これにカルシウムキレート剤である EGTA (25 μM)を加えた際の蛍光強度である。

ミトコンドリア内 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_m)は、Rhod 2-AM (10 μM)で氷上、10 分処理した後、PBS で洗滌し、培養液で 25 °C、30 分間清置した後、励起波長 510 nm、検出波長 580 nm でフローサイトメーターにて検出した。

(11) DNA アレイ

gAd で刺激した RAW 264 細胞から RNA を抽出し、ビオチンラベルした cRNA を作成した。チップは GeneChip Mouse Genome 430 2.0 (Affymetrix) を用い、streptavidin phycoerythrin での染色は Affymetrix GeneChip FluidicsWorkstation 450、スキャンは GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)、解析は MAS 5.0 software を用いた。

4. 研究成果

(1) リポポリ多糖によりマクロファージに惹起される炎症反応に対するアディポネクチンの抗炎症性作用

RAW 264 細胞は、歯周病原性細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 由来 LPS (100 ng/ml) により MAPK や IKK のリン酸化を起すが、2 μg/ml gAd で 16 時間前処理すると、これらを抑制した (図 1)。また、LPS 刺激による TNF-α の発現も抑制した (図 2)。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 の分泌は、gAd 前処理により増加した (図 3)。これらのことから、gAd は LPS がマクロファージに誘導する炎症性反応に抑制的に働くことが示唆された。

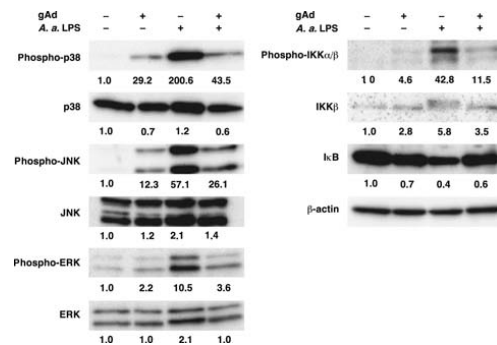


図 1 gAd は LPS 刺激が誘導する p38、JNK、ERK、IKK のリン酸化を抑制した。

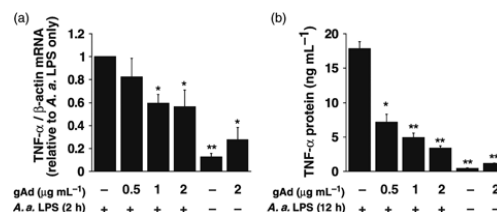


図 2 gAd は LPS 刺激が誘導する TNF-α の発現を抑制した。(A) mRNA、(B) タンパク

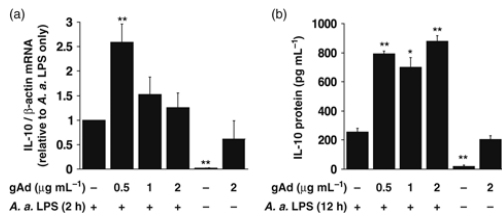


図3 gAdはLPS刺激が誘導するIL-10の発現を増加させた。(A) mRNA、(B) タンパク

(2) アディポネクチン単独刺激に対するマクロファージの挙動

①アディポネクチンによる遺伝子発現の変化の解析

RAW 264 細胞を gAd 単独で刺激すると、1 時間以内に遺伝子発現が観察された (表 1)。このうち、最も発現量の高かった G-CSF の発現について調べたところ、gAd に用量・時間依存的に発現量が増加した (図 4)。この G-CSF の発現には MEK-ERK 経路 (図 5) および NF-κB の活性化 (図 6) が関与していた。

表 1 アディポネクチンが転写誘導する遺伝子

遺伝子名	発現量	
	30 min	60 min
G-CSF	7.0	104.0
Interleukin 6	1.0	48.5
GM-CSF	6.5	26.0
Interleukin 1 alpha	0.9	22.6
Phospholipase C, zeta 1	4.3	21.1
CTRP3	1.7	19.7
Chemokine ligand 2	4.9	17.1
TNF-α	5.3	8.0
Interleukin 10	1.2	2.3

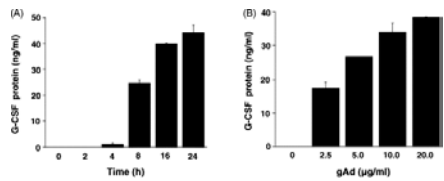


図4 gAdは用量・時間依存的にG-CSFの発現を促進した。

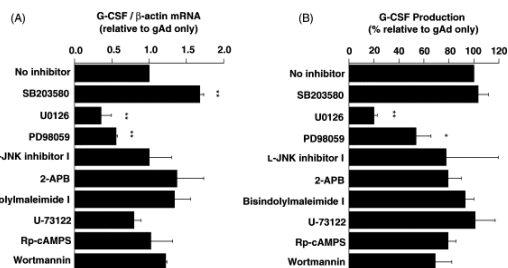


図5 gAdはMEK-ERK経路に依存してG-CSFを発現させた。

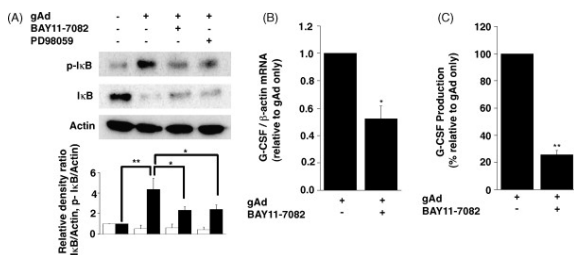


図6 gAdはNF-κBシグナルに依存してG-CSFを発現させた。

②アディポネクチンによるマクロファージのアポトーシスの誘導

RAW 264 細胞に gAd を作用させると、18 時間以降から、カスパーゼ 3、9 の活性化、膜の透過性の変化、染色体 DNA のラダー形成、ミトコンドリアの膜電位の消失、染色体 DNA の酸化障害などのアポトーシスの所見が観察された (図 7)。このアポトーシスは PKC に依存していた。NADPH oxidase 活性に依存した ROS (図 8)、iNOS 活性に依存した NO (図 9) がそれぞれ産生され、これらの産生を抑制すると、アポトーシスも抑制された (図 10)。

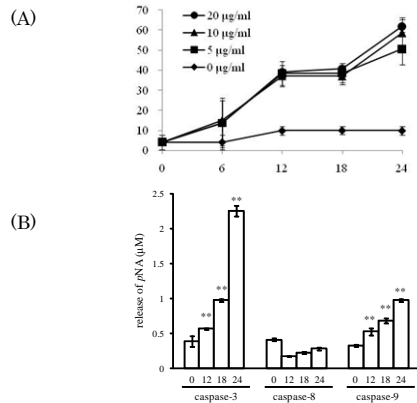


図7 gAdが誘導するアポトーシス(A)とカスパーゼ-3、-9の活性化(B)

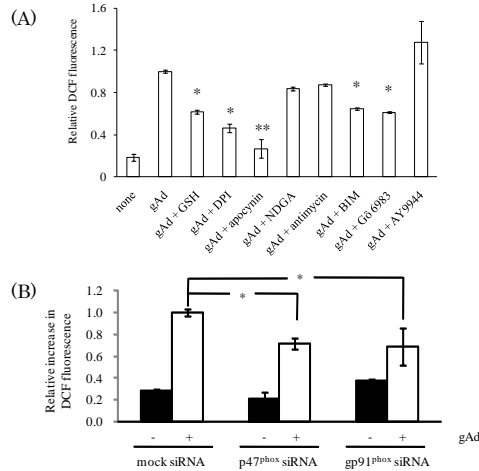


図8 gAdが誘導するROSの産生 (A) NADPH oxidaseの特異的阻害剤であるDPIとapocyninでROSの産生阻害が認められた。(B) NADPH oxidaseのサブユニットであるp47^{phox}とgp91^{phox}をノックダウンするとROSの産生が低下した。

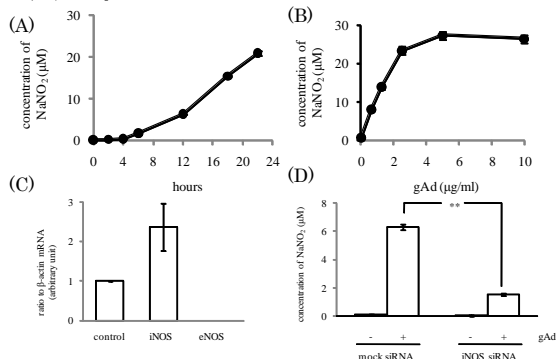


図9 gAdが誘導するNOの産生 (A) 時間依存的、(B)用量依存的にNOの産生が増加した。gAdはiNOSの遺伝子発現を誘導し、iNOSをノックダウンすると、(C)NOの産生および(D)NOS活性は顕著に抑制された。

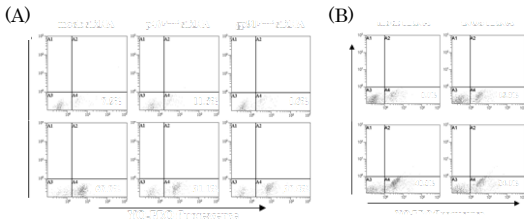


図10 ROS、NOの産生阻害によるgAdが誘導するアポトーシスの抑制効果 (A) p47^{phox}とgp91^{phox}、(B) iNOSをそれぞれノックダウンするとgAdが誘導するアポトーシスが抑制された。

gAd を作用させると、bcl-2/BAX 比及び Bcl-2 のタンパク量が減少した (図11)。bcl-2 を強発現すると gAd が誘導する ROS、NO、アポトーシスは抑制された (図12)。

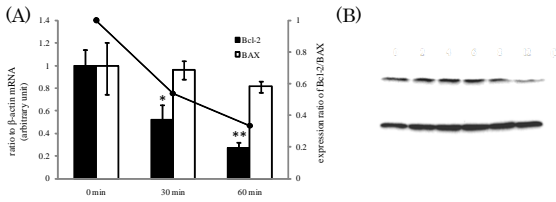


図11 gAdによるbcl-2の発現の影響 (A) bcl-2のmRNA量とBcl-2/BAX比、(B) Bcl-2のタンパク量が減少した。

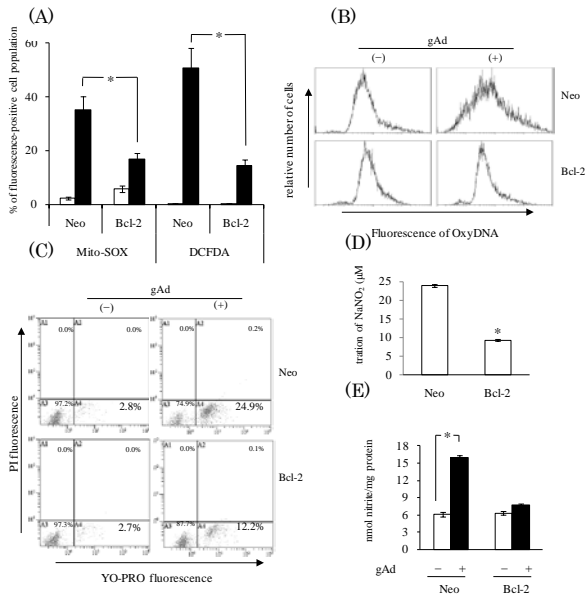


図12 gAdが誘導するROS、NO、アポトーシスに対するBcl-2強発現の影響 Bcl-2を強発現すると、(A) ミトコンドリア(MitoSOX) および細胞内(DCFDA)のROS、(B) ミトコンドリアの膜電位の消失、(C) アポトーシス、(D) NO産生、(E) NOSの活性を抑制した。

また、SOCS3を強発現すると、bcl-2と同様にgAdが誘導するROS、NOの産生、およびアポトーシスを抑制した (図13)。

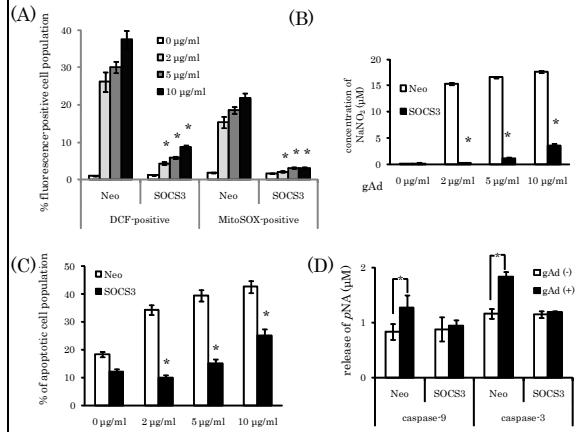


図13 gAdが誘導するROS、NO、アポトーシスに対するSOCS3強発現の影響 (A) ミトコンドリア(MitoSOX) および細胞内(DCFDA)のROS、(B) NO産生、(C) アポトーシス、(D) カスパーゼ-3、-9の活性を抑制した。

これに加えて、gAdを作用させると $[Ca^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_m$ が一時的に減少したが、NADPH oxidase 特異的阻害剤であるDPI (diphenyleneiodonium chloride) で処理すると、これらの減少が抑制された (図14)。また、細胞内カルシウム除去剤であるBAPTA-AMで処理すると、gAdが誘導するROS およびNOの産生、ミトコンドリア膜電位消失が抑制された (図15)。さらに、calmodulinの阻害剤であるcalmidazoliumで処理するとROSとNOの産生が抑制された (図16)。

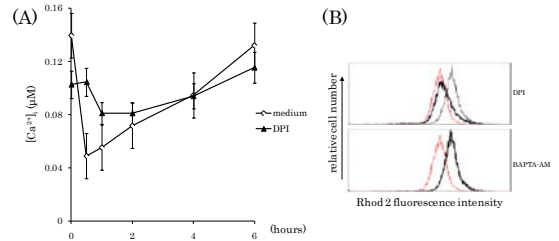


図14 gAdが誘導するカルシウムの挙動の変化に与えるDPI処理の影響 (A) $[Ca^{2+}]_i$ 、(B) $[Ca^{2+}]_m$

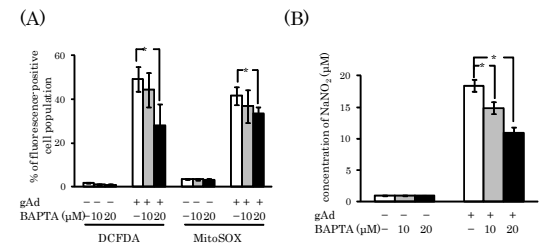


図15 BAPTA-AM処理がgAdの誘導するROSとNOの産生に与える影響 (A) 細胞内ROS (DCFDA) およびミトコンドリア内ROS (MitoSOX)、(B) NO量

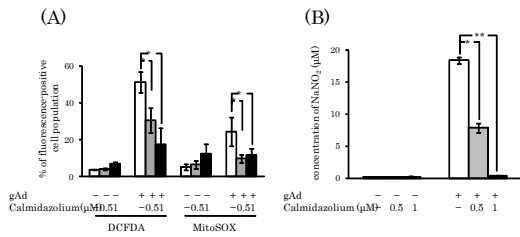


図 16 Calmidazolium 処理が gAd の誘導する ROS と NO の産生に与える影響
(A) 細胞内 ROS (DCFDA) およびミトコンドリア内 ROS (MitoSOX)、(B) NO 量

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 16 件)

- ① Kamio N, Akifusa S, Yamashita Y: Diacylglycerol kinase alpha regulates globular adiponectin-induced reactive oxygen species. *Free Radic Res.* vol. 45, 2011, 336-341.
- ② Akifusa S, Kamio N, Shimazaki Y, Yamaguchi N, Nonaka K, Yamashita Y: Involvement of the JAK-STAT pathway and SOCS3 in the regulation of adiponectin-generated reactive oxygen species in murine macrophage RAW 264 cells. *J Cell Biochem.* 査読有 vol.111, 2010, pp. 597-606
- ③ Yamaguchi N, Hamachi T, Kamio N, Akifusa S, 外 6 名: Expression levels of adiponectin receptors and periodontitis. *J Periodont Res.* 査読有 vol. 45, 2010, pp. 296-300.
- ④ Fujimoto A, Akifusa S, Kamio N, Hirofuji T, Nonaka K, Yamashita Y: Involvement of mTOR in globular adiponectin-induced generation of reactive oxygen species. *Free Rad Res.* 査読有 vol. 44, 2010, pp. 128-134.
- ⑤ Kamio N, Akifusa S, Yamaguchi N, Nonaka K, Yamashita Y: Anti-inflammatory activity of a globular adiponectin function on RAW 264 cells stimulated by lipopolysaccharide from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 査読有 vol. 56, 2009, pp. 241-247.
- ⑥ Akifusa S, Kamio N, Shimazaki Y, Yamaguchi N, Nishihara T, Yamashita Y: Globular adiponectin-induced RAW 264 apoptosis is regulated by reactive oxygen species-dependent pathway involving Bcl-2. *Free Radic Biol Med* 査読有 vol. 46, 2009, 1308-1316.

⑦ Akifusa S, Kamio N, Shimazaki Y, Yamaguchi N, Yamashita Y: Involvement of Ca^{2+} in globular adiponectin-induced reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 vol. 381, 2009, pp. 649-653.

⑧ Akifusa S, Kamio N, Shimazaki Y, Yamaguchi N, Yamashita Y: Regulation of Globular Adiponectin-Induced Apoptosis by Reactive Oxygen/Nitrogen Species in RAW264 Macrophages. *Free Radic Biol Med* 査読有 vol. 45, 2008, pp. 1326-1339.

⑨ Kamio N, Akifusa S, Yamaguchi N, Yamashita Y: Induction of granulocyte colony-stimulating factor by globular adiponectin via the MEK-ERK pathway. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有 vol. 292, 2008, pp. 20-25.

他 7 件

[学会発表] (計 9 件)

- ① 藤本暁江、秋房住郎、廣藤卓雄、山下喜久、SOCS1 は球状アディポネクチンによって誘導する G-CSF の発現を抑制する。2010 年、日本歯科基礎医学会
 - ② 秋房住郎、神尾宜昌、嶋崎義浩、山口登、山下喜久、球状アディポネクチンが誘導するマクロファージのアポトーシスにおける活性酸素種の関与について。2009 年、日本口腔衛生学会
 - ③ 神尾宜昌、秋房住郎、山口登、野中和明、山下喜久、アディポネクチンはジアシルグリセロールキナーゼを介してアポトーシスを誘導する。2009 年、日本歯科基礎医学会
 - ④ 秋房住郎、神尾宜昌、山口登、山下喜久、アディポネクチンは活性酸素種を介してマウスマクロファージにアポトーシスを誘導する。2008 年、日本歯科基礎医学
 - ⑤ 神尾宜昌、秋房住郎、山口登、野中和明、山下喜久、アディポネクチンによる LPS 誘導シグナル伝達への影響解析。2008 年、日本歯科基礎医学会
- 他 2 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋房 住郎 (AKIFUSA SUMIO)
九州大学・大学院歯学研究院・准教授
研究者番号：40295861

(2) 研究分担者

山下 喜久 (YAMASHITA YOSHIHISA)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：20192403