

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463221

研究課題名(和文)酸化ストレス防御因子・SOD2の歯周組織における機能解析

研究課題名(英文)The functional analysis of SOD2, antioxidantdefense in periodontal tissue

研究代表者

臼井 通彦 (USUI, MICHHIKO)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10453630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：SODは酸化ストレス防御因子として働いている。我々はDMP1 Cre TgマウスとSOD2 floxマウスを交配し、組織特異的SOD2欠損マウスを作製した。作製されたマウスの歯周組織においてセメント質肥大が生じていた。また、セメント芽細胞にSOD2を過剰発現させると、増殖には影響を与えなかったが、セメント芽細胞の分化マーカーであるDMP1、CP23の遺伝子発現を有意に減少させた。一方、SOD2ノックダウンでは、細胞増殖が有意に亢進し、DMP1、CP23遺伝子発現は有意に上昇していた。以上の結果より、酸化ストレス防御因子SOD2はセメント芽細胞の増殖・分化を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：SOD (Superoxide dismutase) is an enzyme that alternately catalyzes the dismutation of the superoxide (O₂⁻) radical into either ordinary molecular oxygen (O₂) or hydrogen peroxide (H₂O₂). Thus, SOD is an important antioxidantdefense in nearly all living cells exposed to oxygen. We generated DMP1 cre SOD2 KO mice and conditionally inactivated SOD2 in osteocytes and odontoblasts. We found that loss of SOD2 enhanced thickness of cementum in teeth. In the other hands, periodontal ligament and alveolar bone in DMP1 cre SOD2 KO mice were normal compared with wild type mice. Overexpression of SOD2 in cementoblasts decreased the expression of DMP1 and CP23, which were differentiation markers of cementum. On the contrary, knockdown of SOD2 using siRNA increased both proliferation and differentiation in cementoblasts. These data suggested that SOD2 suppressed proliferation and differentiation in cementoblasts.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：酸化ストレス セメント質 SOD2

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病と酸化ストレス防御因子

歯周病患者の血中では酸化ストレス関連マーカーが上昇し、歯周病治療とともに低下する (Tamaki et al., Clin Oral investing 2011) ことが知られている。また、肥満ラットモデルにおいて歯周炎を惹起すると、肥満による酸化ストレスが歯周病を増悪させる (Tomofuji T et al., J Periodontol 2009) ことから、肥満や糖尿病により生じる酸化ストレスが歯周病に影響を及ぼすことが示唆されている。歯周病の病態に酸化ストレスは大きく関与するが、生体内に存在する酸化ストレス防御因子の役割については不明な点が多い。

(2) 歯周病とセメント質

セメント質は歯根象牙質を覆う石灰化組織で、歯根膜線維の一端はセメント質に、他端は歯槽壁に埋め込まれている。セメント質の最も重要な働きは、この構造により歯を歯槽内に固定、支持することであるが、歯周病の進行により、その働きは失われる。歯周組織の再生をゴールとする歯周治療では、歯根膜と歯槽骨をつなぐセメント質を再生させることが必須であるが、その効果的な治療法は未だ開発されていない。さらに、歯牙萌出時のセメント質形成についても不明な点が多い。

(3) SOD (superoxide dismutase) 2

細胞内で発生する活性酸素種 ROS の増加は蛋白質、核酸、脂質といった生体物質を酸化する (酸化ストレス) 事で機能不全を引き起こし、糖尿病や動脈硬化などの疾患に関与することが知られている (Labunskyy VM et al., Antioxid Redox Signal 2012)。SOD は ROS の起点物質であるスーパーオキシド (O_2^-) を過酸化水素と酸素に変換する酵素であり、酸化ストレスに対して防御的に働く。SOD1(CuZn-SOD) は細胞質内で発生する O_2^- を変換するのに対し、SOD2(Mn-SOD) はミトコンドリアマトリックス内で発生する O_2^- を生体処理システムの最上流で処理し、無毒

化している。

SOD の生物学的意義・病理学的意義を明らかにするために、SOD 遺伝子欠損マウスが作成され、その表現型が解析されてきた。全身性の SOD1 遺伝子欠損マウスは骨組織において骨形成・骨吸収の低下した低骨代謝回転型骨粗鬆症を呈した (Nojiri H et al., J Bone Miner Res. 2011)。一方、全身性の SOD2 遺伝子欠損マウスは生後間もなく死亡するため、その表現型の解析は困難であった (Li Y et al., Nat Genet, 1995)。

我々は、歯周組織の硬組織における SOD2 の役割を解析するために、DMP1 cre トランスジェニックマウス (Tg) (Lu Y et al., J Dent Res 2007) と SOD2 flox マウスを交配することにより、骨細胞・象牙芽細胞特異的 SOD2 欠損 (DMP1-SOD2 欠損) マウスを作製した。DMP1-SOD2 欠損マウスは、正常に分娩され、生育した。生後 3 週 DMP1-SOD2 欠損マウスの歯周組織の組織切片を解析した。その結果、DMP1-SOD2 欠損マウスでは野生型マウスに比較してセメント質の過形成が観察された。すなわち、SOD2 欠損がセメント質形成に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

歯周組織における酸化ストレス防御因子・SOD2 の役割を分子生物学的手法を用いて、in vivo, invitro の両面から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) DMP1-SOD2 欠損マウスの歯周組織の組織学的解析

DMP1-SOD2 欠損マウスの作製

DMP1 Cre Tg マウスと SOD2 flox マウスを交配し、DMP1-SOD2 欠損マウスを作製する。DMP1 cre トランスジェニックマウスと ROSA26R マウスを交配することにより、DMP1 cre が特異的に発現する部位を X-gal 染色により再確認する。Lu Y (Lu Y et al., J Dent

Res 2007)らによれば、その発現は骨細胞・象牙芽細胞に局限しているとのことだが、他の細胞(特に DMP1 の発現を認めるセメント芽細胞)にも発現している可能性があるため、本実験を改めて行う。

DMP1-SOD2 欠損マウスの歯周組織の解析

ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、形態学的検討を行う。

(2) セメント芽細胞における SOD2 の機能解析

セメント芽細胞としてヒトセメント芽細胞株である HCEM を使用する。

セメント芽細胞に SOD2 を過剰発現させ、その増殖・分化に対する影響を検討する。セメント芽細胞に SOD2 siRNA を導入することにより、ノックダウンし、その増殖・分化に対する影響を検討する。増殖は MTT assay, 分化はセメント芽細胞分化マーカー DMP1, PHEX 遺伝子発現を real-time PCR 法にて検証する。

4. 研究成果

(1) DMP1-SOD2 欠損マウスの表現型解析

DMP1 Cre Tg マウスと SOD2 flox マウスを交配し、DMP1-SOD2 欠損マウスを作製することができた。作製された DMP1-SOD2 欠損マウスの歯周組織における表現型を 3次元 μ CT、並びに組織切片(HE染色)にて解析した。

3次元 μ CT による硬組織解析では 1、2 週齢の DMP1-SOD2 欠損マウスにおいては、セメント質・歯槽骨にその形態や歯槽骨量に野生型と比較して、有意な差を認めることができなかった。しかし、4、8 週齢の DMP1-SOD2 欠損マウスにおいては、野生型マウスと比較して、セメント質に異常を認めた。DMP1-SOD2 欠損マウスの根尖部付近のセメント質が肥厚していることを見出した。

HE 染色により、セメント質、歯根膜、歯槽骨における形態の変化を精査した。1、2

週齢の DMP1-SOD2 欠損マウスにおいては、歯周組織の構造に有意な差を認めなかった。

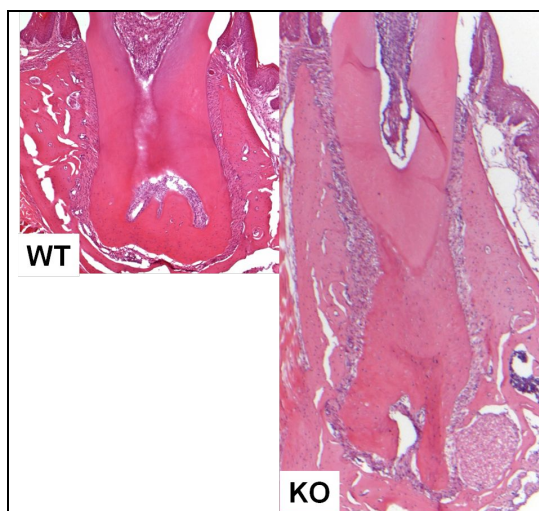


図 1 . DMP1-SOD2 欠損マウス (KO : 4 週齢) におけるセメント質の肥大 (肥厚)

4、8 週齢の DMP1-SOD2 欠損マウスでは、歯根膜、歯槽骨に構造の変化が認められなかったものの歯根尖部付近のセメント質が肥大しており、切片上でその厚みを計測した結果、野生型マウスと比較して、有意に増加していた。以上の結果より、SOD2 はセメント質形成に関わる分子であることが示唆された。

(2) セメント芽細胞における SOD2 の機能解析

セメント芽細胞における SOD2 過剰発現

セメント芽細胞の増殖・分化における SOD2 の役割を明らかにするために、ヒトセメント芽細胞株である HCEM に SOD2 の overexpression(過剰発現)を行い、MTT assay とセメント芽細胞分化マーカーである DMP1, CP23, PHEX 遺伝子発現を real time PCR 法にて検討した。

SOD2 の過剰発現はセメント芽細胞の細胞増殖には影響を与えなかったが、DMP1, CP23 の遺伝子発現を有意に減少させた。

セメント芽細胞における SOD2 ノックダウン

SOD2 siRNA を用いて、HCEM における SOD2 発現をノックダウンした。MTT assay におい

て、SOD2 ノックダウン群ではコントロール群に比較して、HCEM 細胞の細胞増殖が有意に亢進していた。さらに、SOD2 の過剰発現において発現の減少が観察された DMP1, CP23 遺伝子発現はコントロール群に比較して、有意に上昇していた。また、PHEX 遺伝子発現に関しては、SOD2 の過剰発現・ノックダウンにおいても変化は見られなかった。

以上の結果より、酸化ストレス防御因子・SOD2 はセメント芽細胞において、増殖・分化を抑制している可能性が示唆された。

DMP1-SOD2 遺伝子欠損マウスにおいて、セメント質が過形成することより、SOD2 が歯周組織において何らかの機能をもつことが推察される。SOD2 がセメント質形成の阻害因子として働く可能性や破骨細胞形成の促進因子として働く可能性などが考えられる。現在、歯牙萌出時におけるセメント質形成を制御する因子は未だ知られておらず、これを明らかにする事は効果的な歯周組織の再生療法を考案する上で、非常に意義深いと考えられる。また、Paget 病の患者では、このマウスと同様なセメント質過形成をおこすことが報告されている。本マウスの解析は Paget 病の発症機序の一端を担う可能性がある。

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 13 件)

1. Fujihara R, Usui M, Yamamoto G, Nishii K, Tsukamoto Y, Okamatsu Y, Sato T, Asou Y, Nakashima K, Yamamoto M. Tumor necrosis factor- enhances RANKL expression in gingival epithelial cells via protein kinase A signaling. *Journal of Periodontal Research*. 2014 Aug;49(4):508-17. 査読有
2. Sugano M, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Hamano N, Usui M, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Yamamoto M. Gene delivery to

periodontal tissue using Bubble liposomes and ultrasound. *Journal of Periodontal Research*. 2014

Jun;49(3):398-404. 査読有

3. Nakamura-Kiyama M, Ono K, Masuda W, Hitomi S, Matsuo K, Usui M, Nakashima K, Yokota M, Inenaga K. Changes of salivary functions in experimental periodontitis model rats. *Archives Oral Biology*. 2014 Feb;59(2):125-32. 査読有
4. Diala I, Sato S, Usui M, Nakashima K, Nishihara T, Takenaka S. Development of a membrane-based microwave-mediated electrochemical ELISA method for TNF-detection in patients with periodontitis. *Anal Sci*. 2013;29(9):927-30. 査読有
5. Enoki Y, Sato T, Tanaka S, Iwata T, Usui M, Takeda S, Kokabu S, Matsumoto M, Okubo M, Nakashima K, Yamato M, Okano T, Fukuda T, Chida D, Imai Y, Yasuda H, Nishihara T, Akita M, Oda H, Okazaki Y, Suda T, Yoda T. Netrin-4 derived from murine vascular endothelial cells inhibits osteoclast differentiation in vitro and prevents bone loss in vivo. *FEBS Lett*. 2014 Jun 27;588(14):2262-9. 査読有
6. Sato T, Usui M, Enoki Y, Kokabu S, Yoda T. Possible neuroimmunomodulation therapy in T-cell-mediated oral diseases. *Dental Hypotheses*. 6(2), 49-52, 2015 査読有
7. Sato T, Sano Y, Nishimura M, Kokabu S, Usui M, Yoda T. Adrenocorticotrophic hormone at pathophysiological concentration modulates the proliferation and differentiation of bone cells. *Journal of Dental Sciences*. 10(4), 456-461. 2015 査読有

8. Sato T, Enoki Y, Sakamoto Y, Yokota K, Okubo M, Matsumoto M, Hayashi N, **Usui M**, Kokabu S, Miura T, Nakazato Y, Araki N, Fukuda T, Okazaki Y, Suda T, Takeda S, Yoda T. Donepezil prevents RANK-induced bone loss via inhibition of osteoclast differentiation by downregulating acetylcholinesterase. *Heliyon*. 1, e00013, 2015 査読有
9. **白井通彦**、花谷智哉、森谷友貴、佐野孝太郎、有吉渉、西原達次、中島啓介. 歯周病における骨破壊メカニズム 破骨細胞を形成・活性化する因子 日本歯周病学会誌 57巻 120-125頁 2015年 査読無
10. **白井通彦**、中島啓介. 歯周病診断のための検査法. *医学のあゆみ* 253(13), 1254-1255頁 2015年 査読無
11. **Usui M**, Sato T, Yamamoto G, Okamoto Y, Hanatani T, Moritani Y, Sano K, Yamamoto M, Nakashima K. Gingival epithelial cells support osteoclastogenesis by producing receptor activator of nuclear factor kappa B ligand via protein kinase A signaling. *J Periodontal Res*. 2015 Oct 3. doi: 10.1111/jre.12323. 査読有
12. **Usui M**, Okamoto Y, Sato T, Hanatani T, Moritani Y, Sano K, Yamamoto M, Nakashima K. Thymus-expressed chemokine enhances *Porphyromonas gingivalis* LPS-induced osteoclast formation via NFATc1 activation. *Archives Oral Biology*. 2016 Jun;66:77-85. 査読有
13. Fujii S, Sato S, Fukuda K, Okinaga T, Ariyoshi W, **Usui M**, Nakashima K, Nishihara T, Takenaka S. Diagnosis of Periodontal Disease from Saliva Samples Using Fourier Transform Infrared Microscopy Coupled with Partial Least

Squares Discriminant Analysis. *Anal Sci*. 2016;32(2):225-31. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

1. 稗田祐理子、中島 啓介、**白井通彦**、村岡宏祐、中村太志、花谷智哉、林晃一郎、古賀由貴子 歯周基本治療による GCF 中のサイトカイン量変化 第 58 回日本歯周病学会春季学術大会 千葉 2015 年 5 月 15 日
2. **Michihiko Usui**, Gingival epithelial cells support osteoclastogenesis by producing RANKL via PKA signaling, The 1st International Symposium for Women Researchers on Advanced Science and Technology conjugated with Seminar for Young Researchers, kitakyushu, 7月13日~14日
3. 稗田祐理子、**白井通彦**、井上真紀、森谷友貴、古賀由貴子、林晃一郎、中村茉莉子、小原成将、花谷智哉、守下昌輝、中村太志、村岡宏祐、中島 啓介 スケーリング・ルートプレーニング前後での歯肉溝滲出液中サイトカイン量の変化 日本歯周病学会九州五大学 日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会 福岡 2015 年 11 月 8 日

〔図書〕(計 3件)

1. **白井通彦**、中島啓介. 歯周病と全身疾患のかかわり 口腔ケア Q & A 総合医学社 90-91 2015
2. **白井通彦**、中島啓介. 歯周病と口腔ケア 口腔ケア Q & A 総合医学社 12-13 2015
3. **白井通彦**、中島啓介. アタッチメントロス 歯の病的動揺 歯槽骨の吸収 根分岐部病変 口臭 歯科衛生士講座歯周病学 55-62 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 通彦 (MICHHIKO USUI)
九州歯科大学・歯学部・歯学科・准教授
研究者番号：10453630

(2) 研究分担者

清水 孝彦 (TAKAHIKO SHIMIZU)
千葉大学・医学科研究院・准教授
研究者番号：40301791