

論文の内容の要旨

氏名：関 啓 介

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Stress- and cell death-related signals in nerve growth factor-treated PC12 cells are differentially affected by varying butyric acid amounts

(酪酸が NGF 処理 PC12 細胞のストレスおよび細胞死関連シグナルに及ぼす影響)

本邦において成人の約 8 割が罹患している歯周病は、内因性の混合感染症であり慢性的な歯周組織破壊と歯槽骨吸収を特徴とする疾患である。歯を喪失する最も大きな要因であるのみならず、近年では糖尿病、誤嚥性肺炎をはじめとする呼吸器疾患および低体重児出産など様々な全身疾患の誘因としても注目されている。しかし、歯周病は無痛性に進行するため、患者の自覚症状に乏しく発見と治療が遅れることが問題である。実際に、患者が歯周病であることの自覚をもって歯科医院を来院する割合は全体の 2~3 割にすぎないと報告されている。

歯周病の発症と進展には、バイオフィルムに生息する口腔細菌が複合的に関与しているが、グラム陰性嫌気性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* は最も重要な歯周病原菌であり、病原因子や生理学的特性に関する解析が進んでいる。病原因子として LPS, 線毛および莢膜を有するとともに、代謝産物として短鎖脂肪酸のひとつである酪酸を大量に産生する。酪酸は、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害することにより種々の遺伝子発現を誘導するほか、免疫系細胞や歯肉線維芽細胞のアポトーシスを誘導するなど多くの生物活性を有する。無痛性と神経細胞の障害との関連性が示されているが、興味深いことに酪酸が神経細胞の変性と神経突起の収縮を引き起こすことにより歯周病の無痛性進行に関与している可能性が指摘されている。しかし、そのメカニズムは不明である。

神経細胞の障害には、酸化ストレスやアポトーシスが関与していることが知られている。ストレスを受けた神経細胞では、活性酸素である H_2O_2 などが産生されるとともに、抗酸化物質であるグルタチオンリダクターゼ (GR) 量が増加もしくは減少する。また、細胞内カルシウム濃度が増加し小胞体ストレスが亢進すると、そのマーカー遺伝子である Growth arrest and DNA damage-inducible gene (GADD) 153 の発現が亢進しアポトーシスが誘導される。プログラムされた細胞死であるアポトーシスは、TWEAK, TRAIL, TNF- α および FasL といったサイトカインがデスリガンドとなり、細胞表面のデスレセプターに結合することで生じる。その結果、デスレセプター下流に存在するアポトーシス誘導タンパク質：BH3 interacting-domain death agonist (Bid) を介して、ミトコンドリアから cytochrome c (CytC) が細胞内に放出されるほか、種々のカスパーゼ経路や転写因子 NF- κ B が活性化される。特にカスパーゼ 8, 9 および 10 はさらに下流のカスパーゼを活性化するイニシエーターカスパーゼとして、カスパーゼ 3 は細胞死を実行するエフェクターカスパーゼとして重要な役割を担っている。したがって、酪酸による神経細胞の変性と神経突起収縮作用機序において、酸化ストレス応答やアポトーシスが関与していることが考えられるが、シグナル経路を含めこのような観点から検討を行った研究はこれまでに無い。そこで本研究では、株化神経細胞を使用し、ストレス応答関連シグナルとして H_2O_2 , GR, 細胞内カルシウムおよび GADD153 を、細胞死関連シグナルとして神経突起伸展作用を有する TWEAK および細胞死誘導因子である TNF- α と FasL 量、またその下流シグナルのカスパーゼ活性と NF- κ B に対する酪酸の影響を検討した。

実験は、ラット副腎褐色細胞腫由来の細胞である PC12 細胞に神経突起を伸長させるため Nerve growth factor (NGF) 100 ng mL^{-1} を加えた細胞に、種々の濃度の酪酸ナトリウム (0.5 mM, 1 mM および

5 mM) を添加し 24 時間培養した後、培養上清と細胞抽出液を回収した。培養上清および細胞抽出液中の TWEAK, TRAIL, TNF- α , FasL, GADD153 および NF- κ B 量は ELISA 法にて、カルシウム量は、*o*-クレゾールフタレインとカルシウムイオンの発色反応を用いた比色分析法にて定量した。細胞抽出液中の GR は、イールマン試薬とグルタチオン還元酵素を用いたグルタチオンリサイクリング法にて、また、H₂O₂ は非蛍光ペルオキシダーゼを、カスパー活性はカスパーに特異的な *p*-ニトロアニリドを基質とした比色分析法にて測定した。CytC と Bid の発現は各々の抗体を用いた Western blotting 法にて検出した。アポトーシスは NGF 処理 PC12 細胞に死細胞染色試薬を 10 分間作用させた後、細胞の形態変化を共焦点蛍光顕微鏡にて観察することにより解析した。

はじめに、種々のストレス応答関連シグナルに対する酪酸の効果を検討した結果、酪酸処理により H₂O₂ 量は増加した一方、抗酸化作用を有する GR 量は減少したことから、細胞内の酸化ストレスが亢進していることが考えられた。また、酪酸処理により細胞内カルシウムと GADD153 量が増加するとともにアポトーシスが誘導されたことから、小胞体ストレスも生じていることがわかった。以上の結果から、酪酸誘導性の酸化ストレスは、細胞内カルシウム集積と小胞体ストレスの亢進を介して、神経細胞の変性を引き起こすことが示された。つぎに、酪酸の細胞死関連シグナルに対する作用について検討を加えた。その結果、神経突起伸長作用のある TWEAK 量は酪酸の濃度依存的に減少することが認められた一方、TRAIL 量と TNF- α 量は酪酸処理によって増加した。また、レセプター下流の細胞内シグナル分子に対する酪酸の影響を検討した結果、カスパー 8 の活性化は認められたが、カスパー 10 活性と NF- κ B 量には変化が認められなかった。したがって、酪酸による NGF 処理 PC12 細胞の細胞死には TRAIL と TNF- α 量の増加によるカスパー 8 の活性化が関与していることが示唆された。さらに、FasL と Fas の下流シグナルに対する酪酸の作用を検討した結果、高濃度の酪酸処理により FasL 量の増加とカスパー 3 および 9 の活性化が認められた。一方、Bid 量に変化は認められず、細胞内 CytC 量はわずかに減少したことから、酪酸は FasL の増加を介して主に細胞死実行カスパーであるカスパー 3 を活性化することにより PC12 細胞のアポトーシスを誘導していることが示唆された。

今回の研究から、酪酸は NGF 処理 PC12 細胞に種々のストレスとアポトーシスを誘導することにより、神経細胞の変性と神経突起の収縮に関与することが示された。とくに、酪酸による酸化ストレスと小胞体ストレスの誘導に加え、神経突起伸長因子である TWEAK 量の減少、TRAIL 量と TNF- α 量の増加によるカスパー 8 の活性化、および FasL の増加によるカスパー 3 の活性化が重要な役割を演じていることが推察された。

歯周病の進行に従い患者の歯周ポケット内には、*P. gingivalis* をはじめとする酪酸産生菌が増加すること、それに伴い酪酸濃度が上昇することが報告されている。したがって、実際の歯周病患者の歯周組織において、酪酸が神経細胞に作用し今回明らかとなったシグナルを活性化することで、知覚神経の障害を引き起こし歯周病の無痛性進行に関与している可能性が考えられた。