

短鎖脂肪酸が誘導する歯肉上皮由来 Ca9-22 細胞の細胞死とダメージ関連分子パターンの放出には活性酸素種産生によるオートファジー亢進が関係する

三宅 希和

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導：米原 啓之 教授，津田 啓方 准教授)

概 要

歯垢中の細菌は、酪酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) を産生する。歯垢が蓄積し、歯肉上皮に接した場合、歯垢中の細菌は血管からの栄養を代謝に利用するため、歯肉上皮細胞は通常よりも低い栄養状態で SCFAs の影響を受けている。また、低血清条件下で培養したヒト歯肉上皮由来株化細胞の Ca9-22 細胞は、酪酸およびプロピオン酸によって細胞死を引き起こすが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。SCFAs 誘導性細胞死は、オートファジー亢進と活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 産生をともなうことから、本研究では低血清条件下で培養した Ca9-22 細胞を用いて、細胞死の誘導メカニズムについて検討を加えた。

低血清条件下で Ca9-22 細胞に酪酸およびプロピオン酸を 48 時間作用させた後に、SYTOX-green 色素によって死細胞を測定した。その結果、autophagy-related gene (ATG) 5 のノックダウンによるオートファジーの抑制は、酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死を阻害した。ROS 産生量を ROS-Assay Kit with photo-oxidation resistant DCFH-DA を用いて測定した結果、酪酸およびプロピオン酸はコントロールと比較して ROS 産生を増加させた。還元剤である *N*-acetylcysteine (NAC) によって ROS を不活化すると、酪酸とプロピオン酸誘導性細胞死は減少した。酪酸およびプロピオン酸誘導性オートファジーの亢進は、microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) -I の LC3B-II への変換と LC3B-I の産生誘導を指標にして調べた。NAC による ROS の不活化は、酪酸およびプロピオン酸によって誘導される LC3B-I の LC3B-II への変換と LC3B-I 産生を阻害した。酪酸とプロピオン酸による細胞死に伴い high-mobility group box 1 (HMGB1) や sin3A-associated protein 130 (SAP130) などのダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns, DAMPs) が放出されるが、それらは ROS の不活化

によって減少した。イソ酪酸およびイソ吉草酸も細胞死を誘導したが、オートファジーと ROS を不活化することによって減少した。さらに、イソ酪酸とイソ吉草酸の作用で誘導されるオートファジー亢進は NAC によって阻害された。以上の結果から、Ca9-22 細胞における SCFAs 誘導性細胞死と DAMPs の放出は ROS 産生とオートファジー亢進によって調節されていることが示唆された。

本論文は Miyake K, Mikami Y, Asayama T, Toriumi T, Shinozuka K, Tonogi M, Yonehara Y, Tsuda H (2024) Reactive oxygen species generation required for autophagy induction during butyrate or propionate-induced release of damage-associated molecular patterns from dying gingival epithelial Ca9-22 cells. *J Oral Sci*, (in press). を基幹論文としてイソ酪酸とイソ吉草酸の活性酸素種産生、オートファジー、および細胞死に与える影響についての新たな実験結果を追加して総括したものである。

緒 言

成熟した歯垢中に存在する細菌は酪酸およびプロピオン酸などの高濃度の短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) を産生する[1]。また、歯垢中の細菌は血液から供給される栄養素を代謝利用するため、歯肉溝付近の歯肉上皮は低栄養状態にあるうえに、常に細菌が産生する SCFAs の影響を受けている[1,2]。酪酸は低血清条件下で歯肉上皮由来株化細胞の Ca9-22 細胞のオートファジー亢進と細胞死を誘導する[3,4]。この酪酸によって誘導される細胞死の多くはネクローシス様の細胞膜の破壊を伴うことから[5], high-mobility group box 1 (HMGB1) や sin3A-associated protein 130 (SAP130) などのダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns, DAMPs) の放出と関連すると考えられている[5,6]。従って SCFAs 誘導性細胞死のメカニズムを明らかにすることは歯肉炎の発症機序を理解する上で重要と考える。

Ca9-22 細胞における酪酸誘導性細胞死はオートファジーと関係している[3,4]。例えば、オートファゴゾーム膜に集積する microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) のノックダウンは、オートファジーにともなう Ca9-22 細胞の酪酸誘導性細胞死を抑制する[4]。また、オートファジーを促進する AMP-dependent kinase (AMPK) 活性の上昇が Ca9-22 細胞の酪酸誘導性細胞死を引き起こすと考えられている[4]。一方、上道らは酪酸とプロピオン酸には histone deacetylase (HDAC) 活性を抑制する作用があり、ヒストン H3 のアセチル化亢進が Ca9-22 細胞の細胞死に重要であることを示した[7]。このように、Ca9-22 細胞の酪酸誘導性細胞死にはいくつかの因子が関係しているが、詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、Ca9-22 細胞における SCFAs 誘導性細胞死および DAMPs 放出の分子メカニズムを明らかにするため、ROS 産生およびオートファジー亢進との関係性について検討を加えた。

材料および方法

1. 培地, 試薬, 抗体

Minimum essential medium α (MEM α), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 酪酸ナトリウム, プロピオン酸ナトリウム, *N*-acetylcysteine (NAC) は富士フィルム和光純薬 (大阪) から, またイソ酪酸ナトリウムおよびイソ吉草酸ナトリウムは関東化学 (東京) から購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) は Biofill (Victoria, Australia), SYTOX-Green 色素は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。ウサギ抗 autophagy-related gene (ATG) 5 モノクローナル抗体は Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA), ウサギ抗 LC3B ポリクローナル抗体とウサギ抗 SAP130 ポリクローナル抗体は GeneTex (Irvine, CA, USA), マウス抗 HMGB1 モノクローナル抗体は BioLegend (San Diego, CA, USA), マウス抗 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) モノクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), さらに WestVision ペルオキシダーゼポリマー, 抗ウサギ IgG, 抗マウス IgG は Vector Laboratories (Newark, CA, USA) からそれぞれ購入した。

2. 細胞培養

ヒト歯肉上皮由来株化細胞の Ca9-22 細胞[7]は, 理研バイオリソースセンター (つくば) から分与を受けた。同細胞は 10% FBS および 1% penicillin/streptomycin (富士フィルム和光純薬) 含有 MEM α 培地で 5% CO₂, 37°Cの条件で培養した。

3. ATG5 のノックダウンと細胞死アッセイ

ATG5 ノックダウン用の siRNA のキメラ 2 本鎖 (5'-AAC AAG UUG GAA UUC

GUCCTT-3') は北海道システムサイエンス (札幌) で合成されたものを使用した。siPerfect negative control chimera duplex は RNAi (東京) から購入した。siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いた。トランスフェクションの 24 時間後、細胞は 3.0×10^3 cells/well の密度で 96 穴黒色培養プレートに播種した。その際、細胞から細胞抽出液を調整し、タンパク量として 10 μ g をウエスタンブロットにアプライして、ATG5 ノックダウンを確認した。一晚培養した細胞は、5 mM 酪酸ナトリウム、10 mM プロピオン酸ナトリウム、20 mM イソ酪酸ナトリウム、あるいは 10 mM イソ吉草酸ナトリウムを含む 1% FBS 含有 RPMI 1640 培地に交換した。48 時間の培養後、SYTOX-green 細胞死アッセイ [4,7] によって、死細胞を測定した。FBS とフェノールレッドを含まない RPMI 1640 培地中に 400 nM となるように調整した SYTOX-green 溶液を 100 μ l/well 加えて 10 分間作用させ、緑色蛍光強度 (励起光波長 485 nm, 放射光波長 535 nm) を Wallac ArvoSX1420 spectrofluorometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) によって測定した。また、SYTOX-green を含まない RPMI 1640 培地を作用させた細胞からの自家蛍光強度をバックグラウンドとした。

4. ROS 活性の測定

ROS 活性は ROS-Assay Kit with photo-oxidation resistant DCFH-DA (同仁化学, 熊本) によって測定した。すなわち、細胞を 24 穴黒色プレートに 2×10^5 cells/well となるように播種し、37°C で一晚培養し、DCFH-DA working solution 中で 37°C にて 30 分処理した。フェノールレッドを含まない RPMI 1640 で細胞を 2 回洗浄した後、細胞に 5 mM 酪酸ナトリウム、10 mM プロピオン酸ナトリウム、20 mM イソ酪酸ナトリウム、あるいは 10 mM イソ吉草酸ナトリウムを 40 分間作用さ

せた。フェノールレッドを含まない RPMI 1640 で 2 回の洗浄後、緑色蛍光イメージを Keyence BZ-X810 (キーエンス, 大阪) を用いて、同じ条件の 4 つのウェルから各 2 視野, 計 8 視野の写真をランダムに撮影した。各視野の平均蛍光強度を ImageJ ソフトウェアで計測し、それらの平均値と標準偏差をそれぞれ算出した。

5. NAC による ROS の不活化

ROS を不活化する還元剤の NAC (30 mM) [8] を添加し、細胞を 1 時間処理し、酪酸ナトリウム (5 mM), プロピオン酸ナトリウム (10 mM), イソ酪酸ナトリウム (20 mM), あるいはイソ吉草酸ナトリウム (10 mM) を 48 時間作用させ、死細胞を測定した。ROS の不活化が SCFAs によるオートファジー亢進に与える影響について調べるために、細胞を NAC (0, 20, および 30 mM) で 1 時間処理し、続けて酪酸ナトリウム (5 mM), プロピオン酸ナトリウム (10 mM), イソ酪酸ナトリウム (20 mM), あるいはイソ吉草酸ナトリウム (10 mM) を 6 時間作用させた。また、処理した細胞からタンパク量として 5 μ g を含む細胞抽出液を調整し、ウエスタンブロットによって LC3B-I の LC3B-II への変換を調べた。一次抗体としてウサギ抗 LC3B ポリクローナル抗体を使用した。

6. DAMPs の検出

細胞を 2×10^5 cells/well となるように 24 穴プレートに播種し、NAC (30 mM) を含む 10% FBS 含有 MEM α 培地で 1 時間処理し、酪酸ナトリウム (5 mM) あるいはプロピオン酸ナトリウム (10 mM) を含む 1% FBS 含有 RPMI 1640 培地で 48 時間培養した。細胞培養上清を回収し、そのうち 10 μ l をウエスタンブロットにアプライした。一次抗体としてマウス抗 HMGB1 モノクローナル抗体と

ウサギ抗 SAP130 ポリクローナル抗体を使用した。

7. ウェスタンブロット

5-20%ポリアクリルアミド濃度のグラジエントゲル（アトー，東京）の各ウェルに細胞抽出液あるいは細胞培養上清をアプライし，300 V の定電圧で sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) によってタンパクを分画した。ゲルは EzFastBlot ブロッキングバッファー（アトー）に浸漬後，エタノールで親水化処理した polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン（0.2 μm -pore size，富士フィルム和光純薬）に 24 V の定電圧でタンパクを転写した。メンブレンは純水で 5 倍に希釈した EzBlock Chemi ブロッキング溶液（アトー）で 30 分処理した。Can Get Signal immunoreaction enhancer solution 1（東洋紡，大阪）で一次抗体を 2,000~4,000 倍に希釈した溶液中にメンブレンを浸漬し，攪拌しながら一晩反応させた。メンブレンを 0.1% triton X-100 含有 tris-buffered saline (TBST, pH7.4) で 3 回洗浄後，Can Get Signal immunoreaction enhancer solution 2（東洋紡）に WestVision ペルオキシダーゼポリマー，抗ウサギ IgG あるいは抗マウス IgG を 200,000 倍となるように希釈し，1 時間攪拌しながら反応させた。TBST での 3 回の洗浄後，Clarity Western Substrate（Bio-Rad，Hercules，CA，USA）で目的のタンパクを検出し，ChemiDoc XRS（Bio-Rad）で撮影した。

8. 統計処理

全ての統計処理は EZR ソフトウェアを使用した（埼玉メディカルセンター，自治医科大学，さいたま）[9]。正規性の検定は，Shapiro-Wilk 検定を用いた。また，Welch's one-way analysis of variance (ANOVA) 検定後に Bonferroni 検定を行うことで有意差を検定した。データに正規性が確認されなかったものは，

Kruskal-Wallis 検定後に Steel 検定を実施した。 $P < 0.01$ を統計的に有意とした。

結 果

1. 酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死とオートファジー亢進

オートファジーにはオートファゴソーム形成に必要な ATG5 と ATG12 の結合を促進が必要であることから[10], ATG5 をノックダウンすることでオートファジーを抑制し, 酪酸およびプロピオン酸誘導性の Ca9-22 細胞の細胞死に与える影響について検討した。ATG5 の siRNA を導入した細胞の ATG5 発現は, ネガティブコントロールよりも低く, 酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死を抑制した (図 1AB, $n = 8$, $P < 0.01$)。

2. 酪酸およびプロピオン酸による ROS 産生と ROS 不活化による細胞死の阻害

酪酸 (5 mM) およびプロピオン酸 (10 mM) で処理した Ca9-22 細胞は, コントロールと比較して ROS 産生を増加させた (図 2AB, $n = 8$, $P < 0.01$)。また, NAC による ROS の不活化は, 酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死を阻害した (図 2C, $n = 8$, $P < 0.01$)。

3. ROS 不活化による酪酸およびプロピオン酸誘導性オートファジーの阻害

Ca9-22 細胞の酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死は, オートファジーの亢進と ROS の産生が必要なことから, NAC による ROS の不活化がオートファジーに与える影響について調べた。酪酸 (5 mM) およびプロピオン酸 (10 mM) は Ca9-22 細胞の LC3B-I の LC3B-II への変換を促進し, さらに LC3B-I の産生を増加させた (図 3)。しかし, NAC (30 mM) 処理による ROS の不活化は, 酪酸およびプロピオン酸によって誘導された LC3B-I の LC3B-II への変換と LC3B-I 産生を減少させた (図 3)。

4. ROS 不活化による酪酸およびプロピオン酸誘導性 DAMPs 放出の阻害

NAC 処理による ROS の不活化が、酪酸およびプロピオン酸によって誘導される Ca9-22 細胞からの HMGB1 と SAP130 の放出を減少させるかどうか調べた。その結果、酪酸とプロピオン酸は HMGB1 と SAP130 の放出を促進したが、NAC による ROS 活性の抑制はそれらの放出を阻害した (図 4)。

5. イソ酪酸およびイソ吉草酸による細胞死の誘導とオートファジーに与える影響

イソ酪酸およびイソ吉草酸処理が Ca9-22 細胞の細胞死に与える影響と、細胞死にオートファジーが関与しているかどうか調べた。図 5A に示すように、ATG5 をノックダウンさせた細胞の ATG5 発現はネガティブコントロール siRNA をトランスフェクションしたものよりも弱く、イソ酪酸 (20 mM) とイソ吉草酸 (10 mM) は Ca9-22 細胞の細胞死を誘導し、ATG5 のノックダウンによるオートファジーの抑制はイソ酪酸およびイソ吉草酸誘導性細胞死を阻害した (図 5B, $n = 8$, $P < 0.01$)。

6. イソ酪酸およびイソ吉草酸による ROS 産生の誘導と ROS 不活化にともなう細胞死の阻害

イソ酪酸およびイソ吉草酸の作用による細胞死に ROS 産生が関与しているかどうか調べた。イソ酪酸 (20 mM) とイソ吉草酸 (10 mM) を作用させた Ca9-22 細胞は、コントロールと比較して ROS 産生を増加させた (図 6AB, $n = 8$, $P < 0.01$)。また、NAC による ROS 活性の抑制はイソ酪酸とイソ吉草酸誘導の細胞死を阻害した (図 6C, $n = 8$, $P < 0.01$)。

7. ROS 不活化によるイソ酪酸およびイソ吉草酸誘導性オートファジーの阻害

イソ酪酸およびイソ吉草酸誘導性細胞死はオートファジーの亢進と ROS 産生を増加させたことから、NAC による ROS の不活化がオートファジーに与える影響について調べた。イソ酪酸 (20 mM) とイソ吉草酸 (10 mM) は LC3B-I の LC3B-II への変換を促進し、LC3B-I の産生を増加させた (図 7)。また、NAC による ROS 不活化はイソ酪酸とイソ吉草酸誘導性の LC3B-I から LC3B-II への変換と LC3B-I 産生を阻害した (図 7)。

考 察

本研究によって、ヒト歯肉上皮 Ca9-22 細胞の SCFAs 処理によって誘導される細胞死にはオートファジーが関係し、このオートファジーの亢進には ROS 産生が必要であることが明らかになった (図 1-3, 5-7)。また、DAMPs の放出には ROS が関与していることから (図 4)、SCFAs が Ca9-22 細胞へ作用することによって ROS 産生が誘導され、オートファジーが亢進し、細胞死と DAMPs 放出が起きると考えられた。

歯肉上皮細胞が蓄積した歯垢と接した場合、歯肉上皮細胞は歯垢中の細菌と栄養を取り合うことで、歯肉上皮細胞は通常より低栄養状態にある。そのため Ca9-22 細胞を使用した SCFAs 誘導性細胞死の研究では、FBS 濃度を 1% と低くすることで実験が行われている [3,4,7]。また、低 FBS 濃度条件下ではオートファジーを促進する AMPK が活性化されることで、酪酸によるオートファジー依存性の細胞死を誘導すると考えられている [4]。ROS が AMPK を活性化すると報告されていることから [11,12]、酪酸による AMPK 活性の促進は ROS の影響であることが考えられた。つまり、ROS が増加することでオートファジーが亢進し、Ca9-22 細胞の細胞死が誘導されたと考える。実際、低血清条件下における酪酸処理によって誘導される細胞死は AMPK の阻害剤である compound C (dorsomorphin) の存在下で顕著に抑制される [4]。本研究では、酪酸およびプロピオン酸だけでなく、イソ酪酸やイソ吉草酸によってもオートファジー亢進とそれに続く細胞死が誘導されることが明らかになった (図 1, 2, 5, 6)。つまり、イソ酪酸とイソ吉草酸の作用によっても ROS が産生誘導されることで AMPK が活性化され、それにともないオートファジーの亢進がみられたと考える。

上道らは酪酸およびプロピオン酸には HDAC 阻害作用があり、それによってヒストン H3 のアセチル化が亢進することを明らかにしている [7]。また、

histone acetyltransferase (HAT) の阻害は酪酸とプロピオン酸の作用によって誘導されるヒストン H3 のアセチル化と細胞死を抑制する[7]。ヒストンアセチル化レベルの上昇は様々な遺伝子発現をコントロールする。ヒストンのリジン残基は細胞内で塩基性であるので、負荷電を持つ DNA はヒストンへの親和性が強くなる。このことは転写に必要な分子が DNA のプロモーター領域やエンハンサー領域へ結合するのを妨げているので、転写が起こりにくい状況になっている (closed chromatin)。それに対してヒストンのアセチル化は DNA とヒストンの結合を弱めることによって、転写に関わる因子が DNA のプロモーターや転写調節部位に結合しやすくなる。つまり、酪酸とプロピオン酸は Ca9-22 細胞のヒストンアセチル化を亢進し、広範な遺伝子転写を促進する (open chromatin) [7]。また、HAT の阻害剤である C646 は Ca9-22 細胞のヒストン H3 のアセチル化を弱め、酪酸やプロピオン酸によって上昇した転写活性を抑制し、それに追隨して酪酸とプロピオン酸によって誘導された細胞死を抑制する[7]。酪酸およびプロピオン酸によって転写量の増加した遺伝子のうち HAT 阻害剤で発現量が元に戻された遺伝子の中には、オートファジーと ROS 産生に関与するものが多数存在した[7]。イソ酪酸やイソ吉草酸によって Ca9-22 細胞のヒストンアセチル化が促進されるかどうかは不明だが、イソ酪酸とイソ吉草酸処理でみられた Ca9-22 細胞の細胞死誘導メカニズムは酪酸とプロピオン酸処理によるものと非常に似ていることから (図 1-3, 5-7)、ヒストンアセチル化と関係していると考えられた。

酪酸およびプロピオン酸処理による Ca9-22 細胞の細胞死促進に伴い、HMGB1 および SAP130 などの DAMPs が細胞外に放出された (図 4)。最も良く知られた DAMPs の一つである HMGB1 は toll-like receptor (TLR) 2, TLR4 および receptor for advanced glycation end product などの受容体に結合し、好中球の浸潤や炎症性サイトカイン産生を促進する[13-15]。樹状細胞表面に存在する c-type

lectin 受容体への SAP130 の結合は rapidly accelerated fibrosarcoma 1 および spleen tyrosine kinase シグナル伝達を介して nuclear factor- κ B の発現を促進させて、自然免疫系を活性化する[15,16]。SCFAs 処理によって誘導される Ca9-22 細胞の細胞死は、DAMPs の放出を伴うことから (図 4), 歯肉の炎症発症に重要な役割をもつ可能性がある。今回, イソ酪酸とイソ吉草酸によって DAMPs が放出されるかどうかについては調べていないが, おそらく細胞死に引き続き DAMPs は放出されていると考えられる。なぜなら, これらの SCFAs によって引き起こされる細胞死は, 破れた細胞膜を通過して二本鎖 DNA にインターカレートする時にだけ強い緑色蛍光を発する SYTOX-green 色素[17]を用いて測定しているので, イソ酪酸およびイソ吉草酸処理によって強い蛍光を発したということは細胞膜の破壊を特徴とするネクロシス様の細胞死が生じていると考えられるからである。

図 8 に本研究から考えられる歯肉炎の発症メカニズムの概要図を示す。これに従うと, ROS の不活化が歯肉炎予防に有効であり, すでに安全性が確立されている L-cysteine や ascorbic acid などの還元剤[18-20]を歯磨剤や洗口剤等に加えることで, 歯肉をより健康に保つことができると考える。

結 論

Ca9-22 細胞の SCFAs 誘導性細胞死における ROS 産生, オートファジー亢進, および DAMPs 放出との関連性を調べ, 以下の結果と結論を得た。

1. 酪酸, プロピオン酸, イソ酪酸, およびイソ吉草酸はオートファジーを亢進し, 細胞死を誘導した。
2. このオートファジー亢進には ROS 産生が影響した。
3. 酪酸とプロピオン酸が誘導する細胞死では DAMPs の放出をともない, ROS の不活化は DAMPs の放出を阻害した。

以上のことから, Ca9-22 細胞における SCFAs 誘導性細胞死と DAMPs の放出には, ROS 産生促進によるオートファジーの亢進が必要であることが示唆された。

謝 辞

ご指導をいただいた日本大学歯学部口腔外科学第I講座の外木守雄特命教授，同第II講座の米原啓之教授に深く感謝いたします。また，日本大学歯学部生化学教室の津田啓方准教授の熱心な指導と様々なご支援に深く感謝いたします。研究遂行上非常に有益なご助言を頂いた新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野の三上剛和准教授，日本歯科大学新潟生命歯学部解剖学第1講座の鳥海拓准教授，日本大学歯学部口腔外科学第I講座の篠塚啓二専任講師，日本大学大学院歯学研究科の朝山雄之先生にも深く感謝いたします。

参考文献

1. Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ (2003) Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol* 2000 31, 12-31.
2. 柴 秀樹 (2007) 歯周炎発症における歯肉上皮細胞の役割に関する研究. *日歯周誌* 49, 111-119.
3. Tsuda H, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K (2010) Butyrate, a bacterial metabolite, induces apoptosis and autophagic cell death in gingival epithelial cells. *J Periodontal Res* 45, 626-634.
4. Evans M, Murofushi T, Tsuda H, Mikami Y, Zhao N, Ochiai K, Kurita-Ochiai T, Yamamoto M, Otsuka K, Suzuki N (2017) Combined effects of starvation and butyrate on autophagy-dependent gingival epithelial cell death. *J Periodontal Res* 52, 522-531.
5. Ebe N, Hara-Yokoyama M, Iwasaki K, Iseki S, Okuhara S, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Watanabe A, Akizuki T, Watanabe H, Yanagishita M, Izumi Y (2011) Pocket epithelium in the pathological setting for HMGB1 release. *J Dent Res* 90, 235-240.
6. Castiglioni A, Canti V, Rovere-Querini P, Manfredi AA (2011) High-mobility group box 1 (HMGB1) as a master regulator of innate immunity. *Cell Tissue Res* 343, 189-199.
7. Uemichi K, Mikami Y, Watanabe T, Shinozuka K, Tonogi M, Tsuda H (2023) Histone-deacetylase-inhibitory effects of periodontopathic-bacterial metabolites induce human gingival epithelial Ca9-22 cell death. *Odontology* 111, 658-667.
8. Halasi M, Wang M, Chavan TS, Gaponenko V, Hay M, Gartel AL (2013) ROS inhibitor *N*-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors.

Biochem J 454, 201-208.

9. Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48, 452-458.
10. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T (2012) Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 7-12.
11. Hinchey EC, Gruszczczyk AV, Willows R, Navaratnam N, Hall AR, Bates G, Bright TP, Krieg T, Carling D, Murphy MP (2018) Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *J Biol Chem* 293, 17208-17217.
12. Marino A, Hausenloy DJ, Andreadou I, Horman S, Bertrand L, Beauloye C (2021) AMP-activated protein kinase: a remarkable contributor to preserve a healthy heart against ROS injury. *Free Radic Biol Med* 166, 238-254.
13. Huang W, Tang Y, Li L (2010) HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. *Cytokine* 51, 119-126.
14. Berthelot F, Fattoum L, Casulli S, Gozlan J, Marechal V, Elbim C (2012) The effect of HMGB1, a damage-associated molecular pattern molecule, on polymorphonuclear neutrophil migration depends on its concentration. *J Innate Immun* 4, 41-58.
15. Roh JS, Sohn DH (2018) Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Netw* 18, e27.
16. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 465-479.
17. Thakur S, Cattoni DI, Nöllmann M (2015) The fluorescence properties and binding mechanism of SYTOX green, a bright, low photo-damage DNA intercalating

agent. *Eur Biophys J* 44, 337-348.

18. Bartoccini F, Retini M, Crinelli R, Menotta M, Fraternali A, Piersanti G (2022) Dithiol based on agent L-cysteine and cysteamine as a disulfide-reducing agent. *J Org Chem* 87, 10073-10079.
19. European food safety authority (EFSA) panel on additives and products or substances used in animal feed, Parma, Italy (2013) Scientific opinion on the safety and efficacy of L-cysteine hydrochloride monohydrate as a flavouring additive for pets. *EFSA Journal* 11, 3437.
20. Pehlivan FE (2017) Vitamin C: an antioxidant agent. Hamza AH ed. IntechOpen, London, doi: 10.5772/intechopen.69660.

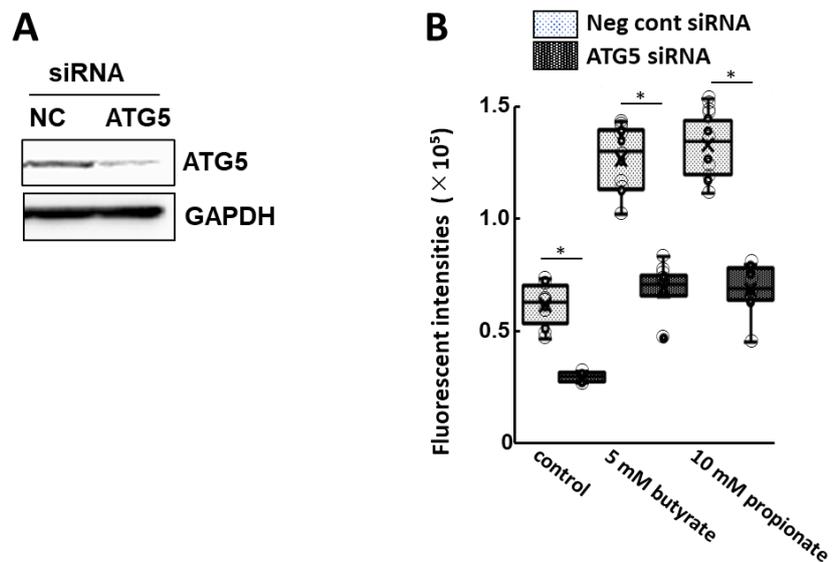


図 1 ATG5 ノックダウンがオートファジー抑制と酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死に与える影響

(A) ATG5 の siRNA あるいは negative control siRNA を Ca9-22 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に細胞抽出液を調整し、タンパク量として 10 μg をウエスタンブロットにアプライして ATG5 のノックダウンレベルを確認した。一次抗体にはウサギ抗 ATG5 抗体を使用した。また、GAPDH を内部標準とした。

(B) siRNA をトランスフェクションした Ca9-22 細胞に 5 mM 酪酸あるいは 10 mM プロピオン酸を 48 時間作用させた。死細胞は SYTOX-green 細胞死アッセイによって測定した ($n = 8$; * , $P < 0.01$)。

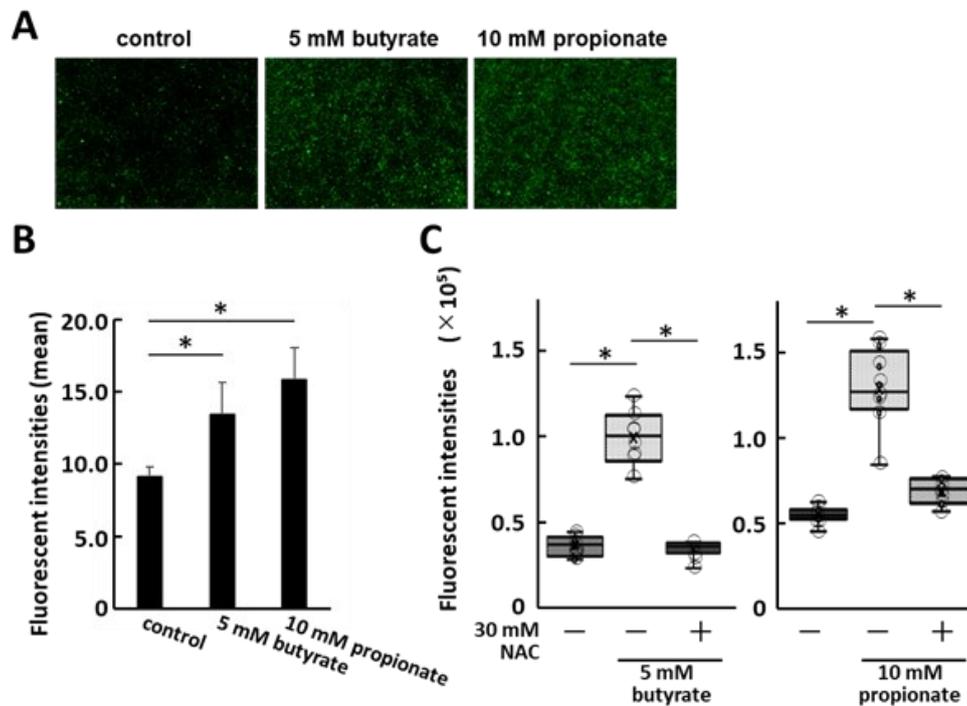


図2 酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死と ROS 産生

(A) 5 mM 酪酸 (butyrate) あるいは 10 mM プロピオン酸 (propionate) を 40 分間作用させた Ca9-22 細胞が産生する ROS を ROS-Assay Kit with photo-oxidation resistant DCFH-DA を用いて検出した。(B) 各条件 4 つのウェルから各 2 視野ずつ、各条件計 8 視野の写真を撮影し、それぞれ ImageJ ソフトウェアを用いて緑色蛍光の強度を数値化した。蛍光強度は (平均蛍光強度) \pm (標準偏差) で表した ($n=8$; *, $P<0.01$)。(C) NAC (30 mM) で 1 時間処理した Ca9-22 細胞に 5 mM 酪酸あるいは 10 mM プロピオン酸を NAC 存在下で 48 時間作用させた。死細胞は SYTOX-green 細胞死アッセイによって測定した ($n=8$; *, $P<0.01$)。

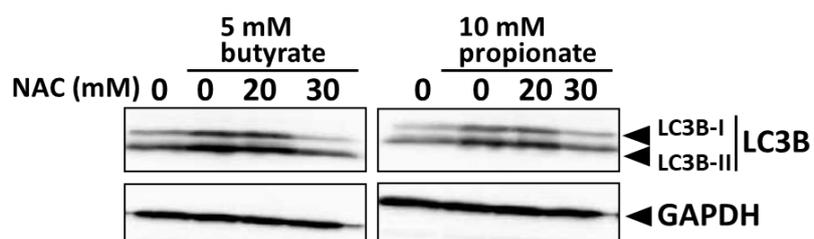


図3 酪酸およびプロピオン酸誘導性オートファジー亢進と ROS 産生

NAC (0, 20 あるいは 30 mM) で 1 時間処理した Ca9-22 細胞に, 5 mM 酪酸 (butyrate) あるいは 10 mM プロピオン酸 (propionate) を NAC 存在下で 6 時間作用させた。また, 細胞抽出液を調整し, タンパク量として 5 μ g をウエスタンブロットにアプライした。一次抗体にはウサギ抗 LC3B 抗体を使用した。また, GAPDH を内部標準とした。

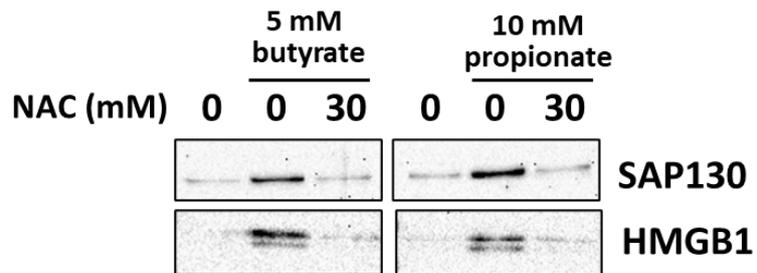


図 4 ROS の不活化と HMGB1 および SAP130 の放出阻害

Ca9-22 細胞を NAC (30 mM) で 1 時間処理し, 5 mM 酪酸 (butyrate) あるいは 10 mM プロピオン酸 (propionate) を NAC 存在下で 48 時間作用させた後, 等量の培養上清をウエスタンブロットにアプライした。一次抗体にはマウス抗 HMGB1 抗体およびウサギ抗 SAP130 抗体を使用した。

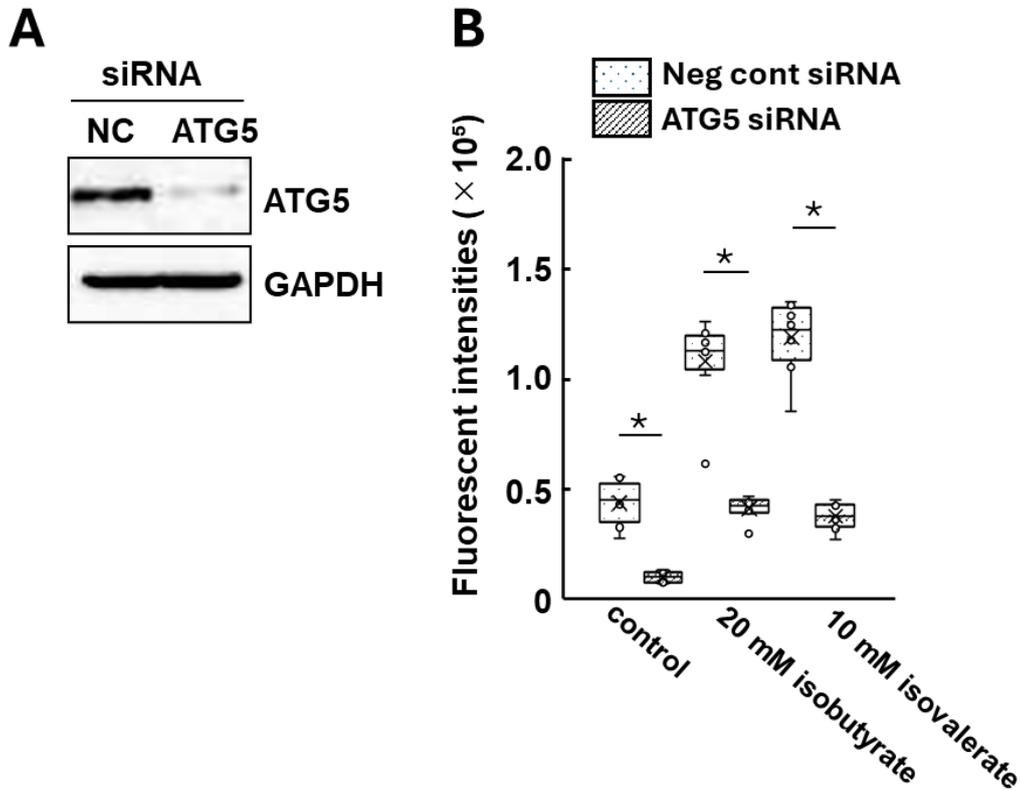


図 5 ATG5 ノックダウンによるオートファジー抑制とイソ酪酸およびイソ吉草酸誘導性細胞死の阻害

(A) ATG5 に対する siRNA あるいは negative control siRNA を Ca9-22 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に細胞抽出液を調整し、タンパク量として 10 μg をウエスタンブロットにアプライした。一次抗体にはウサギ抗 ATG5 抗体を使用した。また、GAPDH を内部標準とした。(B) siRNA をトランスフェクションした Ca9-22 細胞に 20 mM イソ酪酸 (isobutyrate) あるいは 10 mM イソ吉草酸 (isovalerate) を 48 時間作用させた。死細胞は SYTOX-green 細胞死アッセイで測定した ($n=8$; *, $P<0.01$)。

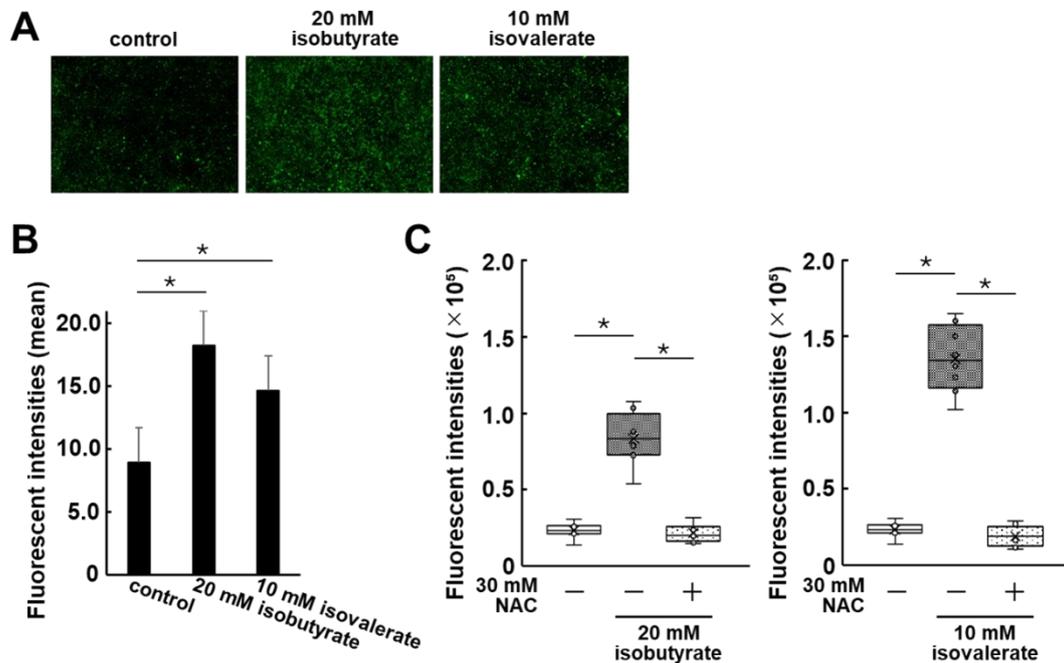


図 6 イソ酪酸およびイソ吉草酸誘導性細胞死と ROS 産生

(A) 20 mM イソ酪酸 (isobutyrate) あるいは 10 mM イソ吉草酸 (isovalerate) を 40 分間作用させた後, Ca9-22 細胞によって産生された ROS を ROS-Assay Kit with photo-oxidation resistant DCFH-DA を用いて可視化し, Keyence BZ-X810 蛍光顕微鏡を用いて撮影した。(B) 各条件 4 つのウェルから各 2 視野ずつ, 各条件計 8 視野の写真を撮影し, それぞれ ImageJ ソフトウェアを用いて緑色蛍光の強度を数値化した。蛍光強度は (平均蛍光強度) \pm (標準偏差) で表した ($n = 8$; *, $P < 0.01$)。(C) NAC (30 mM) で 1 時間前処理した Ca9-22 細胞に 20 mM イソ酪酸あるいは 10 mM イソ吉草酸を NAC の存在下で 48 時間作用させた。死細胞は SYTOX-green 細胞死アッセイで測定した ($n = 8$; *, $P < 0.01$)。

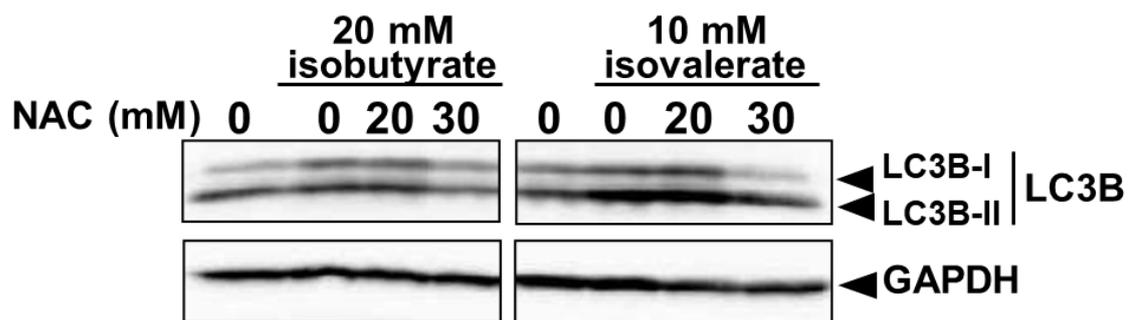


図7 イソ酪酸およびイソ吉草酸誘導性オートファジーと ROS 産生

NAC (0, 20, および 30 mM) で1時間処理した Ca9-22 細胞に, 20 mM イソ酪酸 (isobutyrate) あるいは 10 mM イソ吉草酸 (isovalerate) を NAC 存在下で6時間作用させた。細胞抽出液を調整し, タンパク量として 5 μ g をウエスタンブロットにアプライした。一次抗体にはウサギ抗 LC3B 抗体を使用した。また, GAPDH を内部標準とした。

Gingival epithelium in contact with mature dental plaque

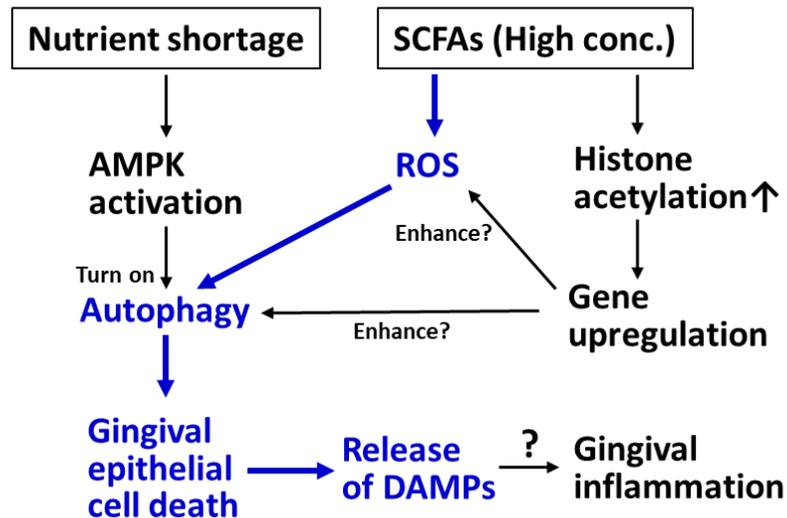


図 8 本研究から推定された歯肉炎発症メカニズム

成熟した歯垢と接する歯肉上皮細胞は歯垢中の細菌との競合による低栄養状態と高濃度の酪酸やプロピオン酸などの SCFAs に晒されている。低栄養状態では AMPK が活性化され、オートファジーを誘導する。高濃度の SCFAs の歯肉上皮細胞への作用は、オートファジー亢進と ROS 産生を誘導する。さらに、SCFAs によるヒストンのアセチル化はオートファジー亢進と ROS 産生に関する遺伝子の発現を上昇させる。その結果、過剰にオートファジーが亢進することで細胞死が起こり、DAMPs が放出される。放出された DAMPs はそれぞれの特異的受容体に結合し、歯肉の炎症を引き起こす可能性が考えられるが、その詳細は不明である。本研究の結果を青字および青線で示した。