

論文要旨

Hydrogen sulfide inhibited cell proliferation and cell cycle arrest via an elevated p21^{Cip1} level in Ca9-22 cells

〔 硫化水素は Ca9-22 細胞において p21^{Cip1} レベルの上昇により細胞増殖および細胞周期の進行を抑制する 〕

武内 博信

【序論および目的】

口臭の主要な原因物質は硫化水素 (H₂S)、メチルメルカプタン (CH₃SH) などの揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compounds: VSC) であり、*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* 等の口腔内グラム陰性細菌により産生され、歯周病の進行に伴い VSC 濃度の上昇がみられる。メチルメルカプタンは歯周病患者の口腔内において高濃度に検出されることから、歯周病との関連についての多くの報告がされている。私共も特にメチルメルカプタンの歯周組織に対する為害作用に着目し、これまでに高濃度のメチルメルカプタンが口腔上皮細胞の細胞増殖を抑制すること報告している (Setoguchi *et al.* 2002)。しかしながら、口臭の主要な原因物質である硫化水素の口腔内の組織における生理機能への影響に関する報告はほとんどされていない。

近年、ガス伝達物質としての内因性硫化水素が注目され、硫化水素の生理機能が研究されており、硫化水素による細胞増殖抑制作用が報告されている (Yang *et al.* 2004, Du *et al.* 2004)。そこで本研究では、VSC と歯周病の関連を解明するための基礎的研究として硫化水素による歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) の細胞増殖および細胞周期への影響を検討した。

【材料および方法】

1. 細胞培養および硫化水素刺激

実験には歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) を用いた。パーミエーターおよび硫化水素パーミエーションチューブによって発生させた硫化水素ガスを培養器内のチャンバー内に流入させ、同チャンバー内で細胞を培養し、これを実験群とした。硫化水素濃度はベースガスである 5% CO₂/95% air の流量で決定し、実験群には 5 および 10 ng/ml の硫化水素を流入させ、対照群には同流量のベースガスのみを流入させた。

2. 細胞生存率測定

トリパンブルー染色法にて検討した。

3. 細胞傷害性測定

Lactate dehydrogenase (LDH) 活性測定 (cytotoxicity detection kit, Roche Diagnostics) にて

検討した。

4. DNA 合成測定

BrdU ELISA assay (Cell Proliferation ELISA, BrdU, Roche Diagnostics) にて検討した。

5. 細胞周期測定

細胞内の DNA を Propidium Iodide で染色し、総 DNA 量をフローサイトメーターにより分析した。

6. Rb, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} の発現

タンパク成分を SDS-PAGE にて分離し、1 次抗体として抗 Rb モノクローナル抗体 (Pharmingen), 抗 p21^{Cip1} モノクローナル抗体 (Cell Signaling), 抗 p27^{Kip1} モノクローナル抗体 (Pharmingen)、2 次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体を用いて、ウェスタンブロット法にて検討した。

【結 果】

細胞生存率において実験群と対照群に差はなく、また細胞傷害性も認められなかった。このことから本研究で用いた硫化水素濃度および刺激時間ではネクローシスは生じないことがわかった。DNA 合成測定においては、硫化水素刺激によって 5, 10 ng/ml の両濃度とも有意な BrdU の取り込みの減少を認めた ($p < 0.05$)。細胞周期測定では、対照群と比較して硫化水素刺激群では 5, 10 ng/ml の両濃度とも有意な G1 期の細胞数の増加 ($p < 0.001$) および S 期の有意な細胞数減少 ($p < 0.01$) が認められた。ウェスタンブロット法の結果から硫化水素刺激によって Rb タンパクのリン酸化が抑制され、時間依存的に p21^{Cip1} の発現の増強を認めた。p27^{Kip1} の発現に明確な差は認められなかった。

【結論及び考察】

口臭の主要な原因物質である硫化水素は Ca9-22 細胞において、p21^{Cip1} の発現を増強することで Rb タンパクのリン酸化を抑制し、G1 arrest を誘導することで細胞増殖を抑制することが明らかとなった。これは我共が以前報告したメチルメルカプタンのネクローシス誘導による細胞増殖抑制とは異なるメカニズムであった。また p21^{Cip1} の発現増強から、その転写因子である p53 のリン酸化に硫化水素が関わっている可能性が示唆された。

本研究で用いた硫化水素濃度 (5, 10 ng/ml) は、それぞれ 3.5 および 7.0 ppm に相当し、臨床的に経験する口腔内気体中の濃度よりも高濃度である。しかし、歯肉溝滲出液中の硫化水素濃度は最も高いもので 1.9 mM (換算値: 64.8 ppm) であったと報告されている (Persson 1992)。深い歯周ポケットにおいて本研究で用いた硫化水素濃度よりも高濃度の硫化水素が存在し、歯周ポケット内で上皮の修復の遅延に硫化水素が関わっている可能性が示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 14 号	学位申請者	武内 博信
審査委員	主査	於保 孝彦	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	伴 清治	副査 徳田 雅行
	副査	米澤 傑	副査 松山 孝司

Hydrogen sulfide inhibited cell proliferation and induced cell cycle arrest via an elevated p21^{Cip1} level in Ca9-22 cells

(硫化水素は Ca9-22 細胞において p21^{Cip1} 発現の上昇により細胞増殖および細胞周期の進行を抑制する。)

口臭の主な原因物質は硫化水素、メチルメルカプタン、硫化ジメチルといった揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compound, 以下 VSC) といわれている。特にメチルメルカプタンは疫学的な研究報告から口臭の原因疾患である歯周病と関連していると考えられ、メチルメルカプタンによる口腔組織への為害作用についての分子生物学的アプローチが行われてきた。一方で、生理的口臭の主要な原因であり、さらに歯周病患者においてもメチルメルカプタンとともに高濃度に検出される硫化水素の口腔組織への作用についての研究はほとんど報告されておらず、不明な点が多い。そこで学位申請者は、歯周病と硫化水素との関連を解明するため、歯周組織で最も硫化水素に曝されると考えられる上皮組織に着目し、歯肉上皮細胞の細胞増殖および細胞周期に及ぼす硫化水素の作用を検討した。歯肉上皮細胞として Ca9-22 細胞を用い、硫化水素混合ガスの存在下で培養した。DNA 合成は BrdU ELISA 法にて測定した。細胞周期分析はフローサイトメーターを用いて G1, S, G2 各期の細胞数を分析した。Rb タンパクのリン酸化および CDK インヒビターである p21^{Cip1}, p27^{Kip1} の発現をウェスタンブロット法にて検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 硫化水素によって DNA 合成が有意に抑制された。
- 2) 細胞周期分析において、硫化水素により G1 期の細胞数の有意な増加、および S 期の有意な細胞数の減少が認められた。
- 3) 硫化水素によって Rb タンパクのリン酸化が抑制された。
- 4) 硫化水素によって p21^{Cip1} の発現が増強された。p27^{Kip1} の発現には影響は認められなかった。

硫化水素は Ca9-22 細胞の細胞増殖を抑制し、それは細胞周期の G1 期から S 期への進行を阻害すること、つまり G1 arrest によって生じることが示唆された。また G1 arrest のメカニズムとして Rb タンパクのリン酸化阻害に p21^{Cip1} の発現増強が関与していた。深い歯周ポケット内は嫌気状態であるため嫌気性菌から産生される高濃度の硫化水素が存在することが知られており、本研究で示された硫化水素の作用が歯周ポケット内の上皮に生じている可能性が考えられ、上皮の修復の遅延に硫化水素が関与していることが示唆された。

本研究は、硫化水素による口腔組織への作用を歯周組織の歯肉上皮に着目して細胞増殖および細胞周期への影響を検討した結果、硫化水素が p21^{Cip1} の発現を増強させることで G1 arrest を誘導することを示した。口腔内細菌の代謝産物である硫化水素を口臭の原因物質としてだけでなく歯周病の増悪因子として捉え、分子生物学的に検討した本研究は大変意義のあるもので興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 14 号	学位申請者	武内 博信
審査委員	主査	於保 孝彦	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	伴 清治	副査 徳田 雅行
	副査	米澤 傑	副査 松山 孝司

主査および副査の5名は、平成19年 2月19日、学位申請者 武内 博信 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 線維芽細胞に対する硫化水素の影響についての報告はないのか。

(回答) 現在のところ報告はなく、今後、歯周組織への影響として線維芽細胞への影響についても検討していきたいと考えている。

質問2) 臨床的にはどのくらいの濃度の硫化水素が検出されるのか。

(回答) 個人によってばらつきがあるが、臨床的経験から重度口臭患者では0.5-1 ppm程度認められる。

質問3) 5, 10 ng/ml の2つの濃度で実験を行っているが、濃度依存性はあるのか。

(回答) 各濃度とも独立した実験であるため、各濃度間での評価はできないが、予備実験において $p21^{Cip1}$ の発現は5 ng/ml よりも10 ng/ml の方が強い傾向にあった。

質問4) Rb タンパクのウェスタンブロット法の高リン酸化と低リン酸化はどう解釈するのか。またどのように分離したのか。

(回答) 実際には総タンパクを検出しているが、Rb タンパクは SDS-PAGE の条件によってはリン酸化の進んでいる高リン酸化 Rb タンパクとリン酸化の進んでいない低リン酸化 Rb タンパクに分離が可能であり、高リン酸化 Rb タンパクが増加していれば相対的に低リン酸化 Rb タンパクの発現は減少する。本研究では、7.5%のポリアクリルアミドスラブゲルを用い、50V の低電圧で約18時間かけて SDS-PAGE を行った。

質問5) 実験に用いた細胞濃度について

(回答) 5×10^4 /ml の濃度で細胞を播種した。培養細胞はコンフルエントになると細胞周期に影響がでるため、刺激終了時にサブコンフルエント程度の細胞濃度にした。

質問6) 細菌の硫化水素産生において、L-システインから硫化水素以外に生じる物質には何があるのか。

(回答) ビルビン酸とアンモニアが生じる。

最終試験の結果の要旨

質問 7) ウェスタンブロット法においてのタンパク定量はキットを用いているが、その原理について

(回答) BCA 法によるタンパク定量キットであり、その原理は、ピシニコニン酸 (BCA) 溶液と硫酸銅溶液からなる試薬を用い、タンパク存在下では同試薬中の第 2 銅イオンは還元されて第 1 銅イオンになる。第 1 銅イオンは BCA 2 分子とキレート化し、これに伴って試薬が黄緑色から紫色に変化することを応用している。

質問 8) 人体における硫化水素の解毒作用について

(回答) 硫化水素は 3 種の経路を通じて代謝される。すなわち、酸化、メチル化、および金属タンパク質またはジスルフィド含有タンパク質との反応である。肝臓における酸化が主要解毒経路である。主要な酸化生成物はチオ硫酸塩であり、次に硫酸塩に変換され、そして尿中に排泄される。メチル化経路も解毒経路としての機能を果たす。

質問 9) 硫化水素とメチルメルカプタンではどちらの毒性が強いのか。

(回答) 硫化水素およびメチルメルカプタンは toxic gas として知られており、高濃度においては共に強い毒性を持つと考えられるが、以前の私共の報告ではメチルメルカプタンによる細胞増殖抑制は 50 ng/ml で生じているのに対し、本研究での硫化水素による細胞増殖抑制は 5 ng/ml で生じていることから、細胞に対する作用としては硫化水素の方が強いのではないかと考えられる。

質問 10) ウェスタンブロット法の結果に再現性はあるのか。

(回答) Rb タンパク, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} それぞれ 3 回以上行っており、いずれも同様の傾向を示した。

質問 11) p27^{Kip1} の発現に影響を与えなかったのはどうしてか。

(回答) 実験に用いた細胞株の特異性なのか、硫化水素の作用の特徴なのか、現段階でははっきりしていないため今後検討したい。

質問 12) 硫化水素は直接 p21^{Cip1} の発現を増強するのか。

(回答) p21^{Cip1} の発現にはその転写因子である p53 が関わっているため、硫化水素が p53 のリン酸化を増強することは考えられる。また MAPK である ERK1/2 が硫化水素による p21^{Cip1} 発現に関与しているという報告があり、本研究で用いた Ca9-22 細胞においても ERK1/2 の関与は考えられる。

質問 13) 実際の口腔内では硫化水素とメチルメルカプタンが混在しているが、作用の相乗効果はないのか。

(回答) 硫化水素とメチルメルカプタンが互いの活性を打ち消し合うという報告はなく、十分に可能性はあるが、今後、硫化水素とメチルメルカプタンの混合および単独による作用の検討もしていきたい。

質問 14) 本研究結果をもとに口臭の予防に対する展望はあるのか。

(回答) 本研究は歯周病と硫化水素の関連を解明するため、歯周組織の歯肉上皮に着目して硫化水素の作用を検討したが、今後は他の歯周組織を構成する細胞への作用を詳細に検討し、さらには VSC 産生菌に対してアプローチし、VSC 産生の詳細なメカニズムを解明することで、口臭の予防および治療の発展に繋がれたらと考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。