

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	峯尾 修平
学位	博士 (歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第 505 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	<b>Rice bran-derived protein fractions enhance sulforaphane-induced anti-oxidative activity in gingival epithelial cells</b> (米糠由来のタンパク分画は歯肉上皮細胞における SFN 誘導性の抗酸化活性を増強させる)
論文審査委員	主査 教授 多部田 康一 副査 教授 泉 健次 副査 教授 照沼 美穂

### 博士論文の要旨

学位申請者 峯尾 修平 氏より提出のあった主論文の要旨は以下の通りである。

【背景および目的】穀物に含まれるペプチドには、抗菌作用や抗炎症作用、抗酸化作用を有する機能性タンパクが存在することが報告されている (Mansour, Pena, & Hancock, 2014)。酸化ストレスは、生体内における酸化と抗酸化のバランスが崩れた状態であり、フリーラジカルである活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) の過剰産生によって DNA やタンパク質、脂質が損傷することで、がんや心血管疾患など様々な疾患と関連することが知られている (Schieber & Chandel, 2014)。歯周炎の発症・進行における酸化ストレスの関与についても、これまでの多くの疫学研究や動物実験から示唆されている (Chapple & Matthews, 2007)。歯周組織における生体防御の最前線である歯肉上皮細胞 (Gingival epithelial cells ; GECs) は、外来病原因子によって誘導される酸化ストレスを介して歯周炎の病態形成に関与することが示唆されるが、GECs における穀物由来ペプチドの抗酸化作用については明らかでない。そこで本研究の目的は、GECs における穀物由来ペプチドによる酸化ストレスへの影響を明らかにし、歯周炎の予防や治療への応用を検討することである。

【材料および方法】穀物由来ペプチドとして、米糠・米胚乳・トウモロコシ・大豆のタンパクを酵素処理後、等電点電気泳動を用いて各々 20 種類のペプチド分画を精製し、それらを実験に供した (Taniguchi et al., 2017)。抗酸化応答経路に対する各穀物由来ペプチド分画の影響をスクリーニングする目的で、ヒト胎児腎由来株 (HEK293T) に抗酸化応答配列 (Antioxidant response element ; ARE) を組み込んだルシフェラーゼレポーター安定細胞株に対して、各穀物由来ペプチド分画 (0.5 mg/mL) による単独刺激、もしくは抗酸化誘導物質 Sulforaphane (5 $\mu$ M SFN) との共刺激を行い、4 時間後に発光強度を測定し、各刺激群間の比較検討を行った。次に、スクリーニングで抗酸化ストレス応答活性化が認められた候補ペプチド分画を用いて、ヒト歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) における細胞傷害性の有無を MTT 法にて確認した。また、候補ペプチド分画と SFN の共刺激下における抗酸化ストレス応答因子 Heme oxygenase-1 (HO-1) の mRNA 発現およびタンパク産生を quantitative PCR 法および Western blotting 法にて解析を行った。候補ペプチド分画が SFN 誘導性の抗酸化作用を実際に増強させることを検討する目的で、ROS 反応性蛍光プローブである CellROX Green reagent および ROS 産生誘導剤である tert-butyl hydroperoxide (tBHP) を用いて、Ca9-22 における ROS の産生量を flow cytometry 法にて解析を行った。さらに、候補ペプチド分画と SFN の共刺激下における抗酸化応答に関与する細胞内シグナリング経路を明らかにする目的で、mitogen-activated protein kinase (MAPK) および抗酸化応答促進因子 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) について、Western blotting 法にて解析を行った。

【結果】HEK293T 細胞株を用いたスクリーニングにおいて、各穀物由来の全ペプチド分画の単独刺激は抗酸化応答の活性化を認めなかった。一方、米糠由来の特定のペプチド分画は SFN との共刺激で抗酸化応答の有意な活性化を認めたため、それらのペプチド分画を以降の実験で供した。Ca9-22 における米糠由来ペプチド分画刺激は細胞為害性を認めなかった。米糠由来ペプチド分画と SFN の共刺激によって、HO-1 は mRNA およびタンパクレベルで上昇することが認められた。また、米糠由来ペプチド分画および SFN による前処置によって、tBHP 誘導性の ROS 産生を有意に抑制することが確認された。さらに、抗酸化応答活性化の細胞内シグナリングにおいては、Nrf2 および extracellular signal-regulated kinase (ERK) が関与することが示唆された。

【考察および結論】米糠由来の特定のペプチド分画は、ERK-Nrf2-ARE 経路を活性化することによって、GECs における SFN 誘導性の抗酸化応答を増強させることが確認された。ペプチド分画による SFN 誘導性の抗酸化応答の増強メカニズムとして、ペプチド分画による細胞内シグナル伝達の活性化や細胞膜に対する親和性の向上が可能性として考えられる。今後は *in vivo* におけるこれら米糠由来の特定のペプチド分画の歯周炎への影響を明らかにすることが必要と考えられる。

#### 審査結果の要旨

本研究の研究テーマの背景と妥当性については以下のとおりである。

本穀物に含まれるペプチドには、抗菌作用や抗炎症作用、抗酸化作用などの機能性タンパクが存在することが報告されている。過去の研究においても、米由来ペプチドが *Porphyromonas gingivalis* と *Fusobacterium nucleatum* のバイオフィルム形成阻害作用を有していることや、米胚乳ペプチドが歯周炎による骨吸収を抑制する作用を有していることが報告されている。また歯周炎の発症・進行のメカニズムとして、酸化ストレスの関与が示唆されている。申請者らの研究室の歯周炎と酸化ストレスの関連性を示唆する先行研究として、細菌代謝産物 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid (KetoC) が ERK-Nrf2-ARE 抗酸化経路を活性化することによって、歯肉上皮細胞 (Gingival epithelial cells ; GECs) における抗酸化応答を誘導することが報告されている。GECs は酸化ストレスを介する歯周炎の病態形成に関与することが示唆される一方、GECs における穀物由来ペプチドの抗酸化作用について明らかになっていない。そこで、穀物由来ペプチドによる GECs における酸化ストレスへの影響について検証するに至った。

研究方法と論旨の展開については以下のとおりである。

研究目的と照らし、ヒト胎児腎由来細胞株、Ca99-2 を使用する理由と妥当性については、ヒト胎児腎由来細胞株 (HEK293T) には、トランスフェクションによる遺伝子導入が容易であるという特徴より、HEK293T に抗酸化応答配列 (Antioxidant response element ; ARE) とルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターをトランスフェクトし、ARE 応答性ルシフェラーゼレポーター細胞株を作製し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。ルシフェラーゼの発光強度を測定することで、Nrf2-ARE 経路による抗酸化応答に対して穀物由来ペプチド分画に与える影響について迅速かつ高感度で解析することができ、本研究における標的ペプチドのスクリーニングに最適と考え、HEK293T を用いた。Ca9-22 はヒト歯肉上皮由来細胞株として数多くの口腔粘膜上皮研究で用いられている実績がある (Leewanathawet et al., *Sci Technol Adv Mater*, 2019 ; Oda et al., *Microbiol Immunol*, 2020)。また初代培養細胞と比べて長期継代が可能で、実験に供するに必要な細胞数を得ることが容易であることから、本研究において Ca-22 の使用は適切であると考えられる。

抗酸化ストレス応答をモニターする研究方法の妥当性については、方法として、quantitative PCR 法や Western blotting 法、flow cytometry 法が一般的に用いられる十分なリファレンスが示されている。

スルフォラファン (SFN) との共刺激においてのみ抗酸化ストレス応答の活性が認められることについての考察については以下の回答を得た。穀物由来ペプチド単独刺激でなく、SFN 共刺激時のみ抗酸化ストレス応答が活性される理由として、SFN による抗酸化ストレス応答をペプチドが増強するためと考えられる。増強メカニズムとして、ペプチドによる SFN の細胞膜透過性の亢進、もしくはペプチドによる SFN 誘導性の細胞内シグナル応答の更なる活性化が挙げられる。

ペプチドによる細胞膜への影響について、一過性の細孔の形成や、細胞内への薬物透過性を高めることが数多く報告されている。また細胞内シグナル応答に関連して、カチオン性ペプチドがTNF受容体を介したシグナル伝達を調節するという報告があり (Fotin-Mleczek et al., *Journal of Cell Science*, 2005), ペプチドが細胞内シグナル応答の増強に関与したことが考えられる。ペプチドの増強メカニズムを明らかにするために、電子顕微鏡を用いた細胞膜の観察や細胞内シグナル因子のさらなる解析が必要である。

仮定として正常歯肉由来の初代培養細胞を用いて本実験を実施した場合、結果への影響は以下が考察された。Ca9-22 細胞は、継代 6~10 代目を用いた。初代培養細胞は由来組織の持つ生来の性質を維持している点で株化細胞よりも優れていると考えられる。したがって初代培養細胞の場合、本実験で得られた結果より顕著な抗酸化活性を示す可能性がある。しかし、細胞分裂の限界があり、かつ継代を重ねることによる性質変化も考えられ、安定した実験結果を得られない可能性がある。また生体からサンプルを直接採取するため、採取できる細胞数には限りがあり、実験に供するに十分な細胞数を揃えることは困難である。本研究においては、安定に細胞数を揃える目的で株化細胞を用いた。

抗酸化作用を期待して穀物由来ペプチドを使用した背景は何か。また、抗酸化作用物質のポジティブコントロールとして、ポリフェノール、レスベラトロールなどを対象物質として用いる必要はなかったかの問いについて以下回答を得た。穀物に含まれるペプチドには、抗酸化作用を有する機能性タンパクが存在することが知られ、ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) やヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における抗酸化作用が過去に報告されており、歯周炎の予防効果を発揮する物質であることが考えられる。ところが、穀物由来ペプチドが歯周病原細菌のバイオフィーム形成阻害作用や *in vivo* における歯周炎による骨吸収に対する阻害作用を持つことは認められているが、歯肉上皮細胞 (Gingival epithelial cells; GECs) においてどのような影響を与えるかについて明らかになっていない。そこで本研究では、穀物由来ペプチドの GECs における酸化ストレスへの影響を検証するために、穀物由来ペプチドを使用した。本研究において、抗酸化誘導物質のポジティブコントロールとして Sulforaphane (SFN) を用いた。SFN はポリフェノールやレスベラトロールとともにファイトケミカルとして知られ、その抗酸化作用については多くの報告がされている。また申請者らの研究室において、GECs における抗酸化応答のポジティブコントロールとして用いられていたため、GECs における抗酸化応答を誘導する物質として信頼性があると考え、他の対象をポジティブコントロールとして用いなかった。

ROS 検出の FCM での死細胞除去法の必要性については以下である。一般的に FCM における死細胞の同定には、7-AAD や PI が用いられる。しかしながら、本研究においては細胞株を用いており、予備検討にて位相差顕微鏡を用いた Trypan Blue 染色による細胞の生死判定を行ったところ、tBHP 刺激による細胞死はほとんど確認されなかった。これらのことから、特定の細胞集団のゲーティングのみで生細胞のデータ抽出することができると考えたため、本研究では FCM での死細胞除去法は用いなかった。

Fig.2 で、米糠と同様に有意差が出ている米胚乳のペプチドを実験に用いなかった理由は以下である。米糠ペプチド分画と米胚乳ペプチド分画の2種類で有意差が確認された。その中でも、米糠ペプチドは抗酸化作用に関する研究がこれまで多く報告されており、米胚乳と比べてタンパク質やビタミン類、ミネラルなどの生理活性物質を豊富に含んでおり、抗酸化や抗菌などの生理活性効果が期待されている。また米糠の大部分は廃棄物として処理されており、天然資源の利用効率向上のために米糠を有効活用する方法を確立することが検討されている (Taniguchi et al., *日本食品科学工学会誌*, 2012)。これらのことから米糠の将来的な有効性が示唆され、本研究では米糠ペプチドを用いた。

本研究で用いた統計解析方法の選択理由と妥当性については以下のとおりである。実験に使用した細胞株は、厳密に管理された状態で培養していて、群間のバラつきは少ないと考えられる。群間のバラつきを抑えた上で、各実験における各群のサンプル数は同じであることから正規性は保たれ、3 群以上のデータの平均の差を検定するために一元配置分散分析の選択は妥当である。

本研究の学術意義、新規性、創造性は以下のとおりである。本研究では GECs における歯周炎と酸化ストレスの関連性について研究を進める上で、GECs における抗酸化応答を増強する物質

として穀物由来ペプチドに可能性を見出し、米糠由来ペプチドが SFN 誘導性の ERK-Nrf2-ARE 抗酸化経路を活性化し、GECs における抗酸化応答を増強させることを報告した点で新規性を有する。米糠由来ペプチドによる GECs における SFN 誘導性の抗酸化応答の増強を示唆したが、米糠由来ペプチドが GECs における酸化ストレスを介する歯周炎の病態形成に与える影響についてさらに明らかになれば、歯周炎の治療・予防への有効性が期待されるとともに、米糠由来ペプチドが有する新たな生理活性メカニズムの発見につながる。

本研究結果の学術的発展性や応用価値は以下のとおりである。本研究において、米糠由来ペプチドによる SFN 誘導性の抗酸化応答増強によって歯周炎の発症・進行に関与する可能性を示唆した。ペプチドによる SFN 誘導性の抗酸化応答増強メカニズムを明らかにすることは、歯周炎のみならず全身の酸化ストレス関連疾患の病因論を検討する上で有用であることから、学術的発展性を有すると考えられる。また、GECs における抗酸化応答に関与するペプチド成分の影響について明らかにすることで、歯磨剤や洗口剤などに有効なペプチド成分を配合するなど、歯周炎の予防に対する応用が期待される。

論文構成・文法・語法の適切性については適切に執筆されている。

以上