

氏名	米田 俊樹
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5136号
学位授与の日付	平成27年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合学研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Anti-aging effects of co-enzyme Q10 on periodontal tissues (歯周組織に対する還元型コエンザイム Q10 の抗加齢効果)
論文審査委員	高柴 正悟 教授      長塚 仁 教授      森田 学 教授

### 学位論文内容の要旨

【緒言】酸化ストレスと加齢との間には関連があることが知られている。加齢に伴うミトコンドリアの機能不全は、細胞の核内で処理できない程の活性酸素を発生させ、酸化ストレスによるDNAの損傷を引き起こす。続いて、DNAの酸化損傷産物である8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) が、核から細胞質へと移行し、細胞質内受容体であるNod-like receptor protein 3 (NLRP3)を活性化させ、Caspase-1、Apoptosis associated speck like protein (ASC)と共にインフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体を形成する。インフラマソームは、炎症性サイトカインであるInterleukin (IL)-1 $\beta$ を誘導し、炎症反応や破骨細胞の分化を引き起こす。一方、酸化ストレスの上昇は、転写因子であるNuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)を活性化させ、IL-1 $\beta$ の産生を誘導することも知られている。これらのように、加齢に伴う酸化ストレスの上昇はインフラマソームの形成やNF- $\kappa$ Bの活性化を介して炎症や骨吸収を進行させる。したがって、加齢に伴う酸化ストレスを抑制することは、インフラマソームの形成やNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害し、組織の損傷を抑えることが期待される。

還元型コエンザイムQ10 (rCoQ10)は組織浸透性が高く、抗酸化作用を有する。医科の分野では、CoQ10の皮膚に対する抗酸化作用、抗加齢作用がすでに報告されている。しかし、rCoQ10が歯周組織の加齢変化に対してどのような効果を示すのかは不明である。そこで本研究では、rCoQ10をラット歯肉に塗布し、歯周組織に対する抗加齢効果を検討した。

【方法】4ヶ月齢のFischer系344雄性ラットを6匹ずつ、実験群(1.0%rCoQ10配合軟膏を歯肉に塗布した群)と対照群(rCoQ10非配合軟膏を歯肉に塗布した群)の2群に分けた。両群ともに、4ヶ月齢から6ヶ月齢に達するまでの2ヶ月間、1日1回10分間、週5回の割合で、綿球を用いて歯肉を含む上顎の口腔内全体に軟膏を塗布した。軟膏の塗布は、2-4%イソフルレン・酸素混合気体による全身麻酔下で行った。2ヶ月の実験期間終了後、ラットを屠殺し、血液、上顎歯周組織、および上顎歯肉のbiopsyサンプルを採取した。また、加齢変化を評価するために、2ヶ月齢と4ヶ月齢のFischer系344雄性ラットを6匹ずつ別途購入し、1週間の通常飼育後に屠殺し、血液と上顎歯周組織を採取した。なお、本実験計画は岡山大学動物実験委員会の承認(OKU-2012184)を受けてい

る。

血清中のCoQ10濃度と8-OHdG濃度を、高速液体クロマトグラフィー法とenzyme-linked immunosorbent assay法を用いてそれぞれ測定した。また、上顎歯周組織について、抗8-OHdG抗体を用いた免疫染色、ヘマトキシリン・エオジン染色、およびtartrate resistant acid phosphate (TRAP)染色を行い、それぞれ単位面積あたりの8-OHdG陽性細胞数、セメント・エナメル境から歯槽骨頂までの距離、および歯槽骨表面のTRAP陽性破骨細胞数を計測した。さらに、上顎歯肉からRNAを抽出し、逆転写PCR法にて、NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 $\beta$ 、およびNF- $\kappa$ Bの遺伝子発現を評価した。統計分析では、Tukey法を用いて血清中の8-OHdG濃度とセメント・エナメル境から歯槽骨頂までの距離の4群比較した。血清中の総CoQ10濃度、8-OHdG陽性細胞数、TRAP陽性破骨細胞数、および遺伝子発現の実験群と対照群との比較ではt検定を用いた。

【結果】6ヵ月齢の実験群の血清CoQ10濃度は、同齢の対照群と比べて有意に高かった( $p < 0.05$ )。実験群と対照群の血清8-OHdG濃度は、共に2ヵ月齢、4ヵ月齢の値よりも高くなり有意差を認めたが( $p < 0.05$ )、実験群の値は対照群よりも有意に低かった( $p < 0.05$ )。さらに、実験群の歯周組織における8-OHdG陽性細胞数とTRAP陽性破骨細胞数は、どちらも対照群よりも少なかった( $p < 0.05$ )。一方、セメント・エナメル境から歯槽骨頂までの距離について、2ヵ月齢群と比較して、他の3群(4ヵ月齢、実験群、対照群)は有意に高い値を示したが( $p < 0.05$ )、実験群と対照群との間に大きな違いはなかった。また、実験群の歯肉組織におけるNLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ Bの遺伝子発現は、いずれも対照群と比べて低くなった。

【考察】血清CoQ10濃度は、rCoQ10の歯肉への局所塗布により増加した。このことは、今回の実験モデルにおいて血中へ移行できるほど、歯周組織にrCoQ10が浸透したことを示唆している。

8-OHdGは、酸化ストレスの指標の一つである。本研究では、加齢に伴う血清8-OHdG濃度の増加が、rCoQ10の塗布によって抑えられていた。加えて、歯周組織における8-OHdG陽性細胞数もまた、rCoQ10の塗布によって少なくなっていた。これらの所見から、rCoQ10は加齢に伴う酸化ストレスの増加を緩和できると考えられる。さらに、rCoQ10の塗布は、歯肉におけるNLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 $\beta$ といったインフラマソームの関連遺伝子の発現を抑制し、歯槽骨表面におけるTRAP陽性破骨細胞数を少なくした。過去の研究から、酸化ストレスはインフラマソームの形成を促し、その結果として、炎症反応や骨吸収を大きくすることが知られている。すなわち、rCoQ10の抗酸化作用は、インフラマソームの形成を阻害することにより、加齢に伴う炎症反応や破骨細胞の分化を小さくしていると推測される。

酸化ストレスを介したNF- $\kappa$ Bの遺伝子発現は、炎症反応を促すことが報告されている。今回の実験において、rCoQ10の塗布は歯肉組織におけるNF- $\kappa$ Bの遺伝子発現を抑制した。したがって、インフラマソームの形成阻害だけではなく、NF- $\kappa$ Bの発現の抑制もまた、本研究の結果に影響を与えた可能性がある。

しかし、本研究では、歯槽骨レベルにおけるrCoQ10の効果は認められなかった。歯槽骨

レベルにおいても差を認めるためには、rCoQ10の塗布期間を更に長くする必要があるのかもしれない。この点については、さらなる研究が必要である。

**【結論】**rCoQ10の歯肉への塗布は、加齢に伴う歯周組織の酸化ストレスを抑制した。また、rCoQ10は歯周組織におけるインフラマソームの関連遺伝子の発現や歯槽骨表面における破骨細胞の分化を抑えていた。

## 論文審査結果の要旨

酸化ストレスと加齢との間には関連があることが知られている。加齢に伴う酸化ストレスの上昇は、Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), Caspase-1, Apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain (ASC) からなるインフラマソーム複合体の形成や免疫反応に関与する転写因子のNuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) の活性化を介して、炎症や骨吸収を進行させる。したがって、加齢に伴う酸化ストレスを抑制することは、インフラマソームの形成やNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害し、加齢による組織の損傷を抑えることが期待される。一方、コエンザイムQ10 (CoQ10) は体内で還元型 (rCoQ10) へと変換され、抗酸化作用を発揮しやすいと報告されている。皮膚科領域では、CoQ10の皮膚に対する抗酸化作用と抗加齢作用がすでに報告されている。これらのことから、抗酸化作用を有するrCoQ10の状態でも適用することで、より大きな抗酸化作用が期待できる。しかし、rCoQ10が歯周組織の加齢変化に対してどのような効果を示すのかは不明である。そこで本研究では、rCoQ10をラット歯肉に塗布し、歯周組織に対する抗加齢効果を検討している。

加齢モデルとして使用されるFischer系344の雄性ラットを各群6匹で、実験群 (1.0% rCoQ10配合軟膏を塗布した群；軟膏基材の組成：ミツロウ33%、ダイズ油67%)、対照群 (rCoQ10非配合軟膏を塗布した群)、そして相対的な若年群を2群 (2ヵ月齢と4ヵ月齢)。実験群と対照群は、4ヵ月齢から6ヵ月齢に達するまでの2ヵ月間、1日1回10分間、週5回の割合で、約0.5g/回の量を綿球を用いて口蓋の歯肉と粘膜全体に軟膏を塗布した。塗布時には、2~4%イソフルレン・酸素混合気体による全身麻酔下を行った。2ヵ月間の実験終了後にラットを屠殺し、心臓の血液、上顎左側歯周組織、および上顎右側歯肉を採取した。また、相対的な若年群は、1週間の通常飼育後に屠殺し、心臓の血液と上顎左側歯周組織を採取した。

血清中のCoQ10濃度とDNAの酸化損傷産物である8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 濃度を、それぞれ高速液体クロマトグラフィー法とenzyme-linked immunosorbent assay法を用いて測定すると、血清中CoQ10濃度は実験群で対照群よりも有意に高く、血清中8-OHdG濃度は両群とも加齢に伴い増加したが、実験群で対照群よりも有意に低かった。また、6ヵ月齢における上顎第1臼歯部歯周組織の免疫染色では、8-OHdG陽性細胞数とtartrate resistant acid phosphate 陽性破骨細胞数が実験群で対照群よりも有意に減少した。さらに、歯肉内におけるNLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 $\beta$ , そしてNF- $\kappa$ Bを構成するRelAの遺伝子発現が、実験群で対照群よりも有意に低かった。

rCoQ10の歯肉への塗布は、本剤の血液中への移行と血液中の8-OHdG濃度を抑制し、歯周組織におけるインフラマソームの関連遺伝子の発現や歯槽骨表面における破骨細胞の出現を抑制していた。すなわち、本研究で、rCoQ10の歯肉への塗布が加齢に伴う歯周組織の酸化ストレスを抑制した、と結論付けている。

本研究は、歯周組織に対するrCoQ10塗布による抗加齢効果を示唆した知見である。したがって、論文審査委員は一致して本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。