

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593003

研究課題名(和文) 口腔角化病変発症メカニズムでのカルボニルタンパクの意義とレドックス抑制機構の解明

研究課題名(英文) The significance of carbonyl protein and redox suppression mechanism in the onset mechanism of oral hyperkeratosis

研究代表者

熊谷 章子 (Kumagai, Akiko)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：10286594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 難治性口腔粘膜角化病変発症の原因を、加齢に伴う抗酸化作用の低下と、酸化損傷分子の蓄積による酸化ストレスの影響に注目し検討した。その結果、対象者の血液、尿それぞれの抗酸化物質、酸化ストレスマーカーの測定値と年齢との間に相関関係は認めなかったが、健常者との間に尿酸、SOD活性(Superoxide dismutase)、ビタミンCの値に差を認めた。酵素抗体法を利用した研究では、病変内のタンパクにカルボニル化が確認され、その基底細胞層には、脂質酸化ストレスマーカーの発現も認めた。これらの局所的酸化損傷を表す結果から、口腔粘膜角化病変への分子生物学的影響を強く肯定できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We examined the influence of an aging-related reduction in antioxidant activity and oxidative stress related to the accumulation of oxidation-damaged molecules to clarify the etiology of hyperkeratosis of the oral mucosa as a precancerous lesion/condition. As results, although there was no correlation between the blood/urinary levels of respective antioxidant substances and age on the subjects, when comparing the results between subjects and controls, it showed significant differences in the levels of uric acid, SOD activity, and the vitamin C. Enzyme antibody methods confirmed the carbonylation of a protein in the lesions and lipid oxidative stress marker in the basal cell layer. These results showed the oxidative damage localized of the lesions. Therefore, it was suggested that the possibility of strong affirmation of molecular biological effects to the oral keratinocytes lesions.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔粘膜 角化病変 酸化ストレス 活性酸素 カルボニル化タンパク 抗hexanoyl-Lysin抗体 酵素抗体法 加齢

1. 研究開始当初の背景

前癌状態、前癌病変といわれる口腔扁平苔癬、白板症は、中年から高齢者に多い口腔粘膜疾患である。特に口腔扁平苔癬の原因はアレルギー、遺伝的素因、自己免疫疾患、ストレスなどの精神的因子、さらに代謝障害などの関与が考えられている。しかし、正確な原因は不明であるため、未だ確実に奏功する治療法が確立されていない。口腔内は特殊な環境下のため慢性炎症を起こす機会が多く、常に酸化ストレスに曝されている。そこでわれわれは、加齢に伴う抗酸化作用の低下と、酸化損傷分子の蓄積による酸化ストレスの影響に注目した。分子生物学的な老化研究により、酸化ストレスに伴う口腔の加齢性変化が、病変の発生機序に關与することを究明できれば、抗加齢による新たな治療法の確立が期待でき、また結果を罹患予防戦略の開発につなげることで、予防医学への貢献の意義があると考えられる。

2. 研究の目的

血液中、尿中、口腔粘膜角化病変の抗酸化物質と酸化ストレスマーカーを評価し、加えて生活習慣や基礎疾患などの全身的要因との関与を検索することで、未だ発生機序が明確でない口腔粘膜角化病変発症の原因の一因としての、加齢による抗酸化作用の減退の影響や、活性酸素の発生および蓄積の関連性を証明することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究は、本学の倫理委員会の承諾と被験者のインフォームドコンセントを得て実施した。臨床所見または病理組織学的所見で診断された、口腔扁平苔癬(LP)患者21名(男性3名、女性18名、平均年齢69.8歳)、白板症(LE)患者10名(男性2名、女性8名、平均年齢67.8歳)、および口腔粘膜角化病変を有しない非角化病変(N)患者7名(男性2名、女性5名、平均年齢51.5歳)を対象とした。

(1)対象者から静脈血と尿をそれぞれ10ml採取し、血清中の抗酸化物質としてビタミンA・C・E、葉酸、亜鉛、superoxide dismutase (SOD)活性、および酸化ストレスマーカーとして血清中尿酸と尿中8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)を測定した。対象患者の年齢と測定値との関係はPearsonの相関係数で評価した。LP群、LE群、N群それぞれの比較については、Studentのt検定による統計解析を行った。なお、各検体の測定は、院内血液検査室および株式会社エスアールエルに委託した。これらの結果に加え、対象者の喫煙歴、飲酒歴、その他の嗜好物、常用内服薬、基礎疾患の治療歴の有無に関する5項目の問診を行い、「有」の回答を1点として、その合計点を患者背景点数として、口腔粘膜角化病変の罹患状況と比較した。

(2)組織中の酸化ストレスマーカーであるカルボニル化タンパクの同定を行なうため、対象者から口腔粘膜組織200mgを採取し、その組織試料をホモジナイズすることで、可溶性タンパクを抽出した。カルボニル基は2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)と容易に脱水縮合するため、ヒドラジン試薬で検出可能なタグを付加し、ヒドラゾンを形成することにより、抗ジニトロフェニル抗体を用いてカルボニル化タンパクの検出が可能である。そこでわれわれは、Chemicon®のOxyBlot Protein Oxidation Detection Kitを使用して、その後の一連の作業を行った。ヒドラゾン形成させた試料を、SDSポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)によって分離した。1つのサンプルに対して2枚のゲルで同時に電気泳動を行い、1枚はCBB染色、もう1枚はセミドライ式の装置を使用してウェスタンブロッティング法(WB法)を行ってPVDFメンブレン上にタンパクを転写した。免疫染色にて酸化ストレスマーカーであるカルボニル化タンパクの発現を確認し、そのメンブレンの発色バンドと同部位のSDS-PAGE後の染色ゲルのバンドを切り出し、nanoLC MS/MS(株式会社 医学生物研究所委託)でタンパクを同定した。

(3)LP、LEそれぞれの病変部と、Nの口腔粘膜組織を、脂質酸化ストレスマーカーである抗hexanoyl-Lys(HEL)抗体を使用した免疫組織染色をし、陽性細胞の発現から、その局在性を観察した。

4. 研究成果

(1)血中、尿中の抗酸化物質と酸化ストレスマーカーの評価

血液、尿それぞれの測定値と年齢との間に明らかな、統計学的な相関関係は認めなかった。各群の比較では、LP群とLE群で血清中の尿酸、SOD活性で有意差を認めた。ビタミンCでは、3群において有意差を認めた(図1)。各被験者の患者背景点数と罹患状況とを比較したが、それぞれ有意な結果は得られなかった。

本研究では、口腔粘膜角化病変の発症と、全身的要因として考えられた加齢とそれに伴う抗酸化力の減退や生活習慣の患者背景の影響を強く肯定することはできなかったが、血清中の尿酸の蓄積、ビタミンCの減少およびSOD活性の低下は、口腔粘膜角化病変発症に何かしらの影響を与えているかもしれない。また、これらの結果は、加齢性の口腔粘膜の変化の要因となっている可能性もある。口腔扁平苔癬と白板症との間でも有意差を認められたことから、今回の患者背景の調査項目の他に、この2つの疾患で異なる背景が存在する可能性があるため、さらに検討してゆく必要があると思われる。

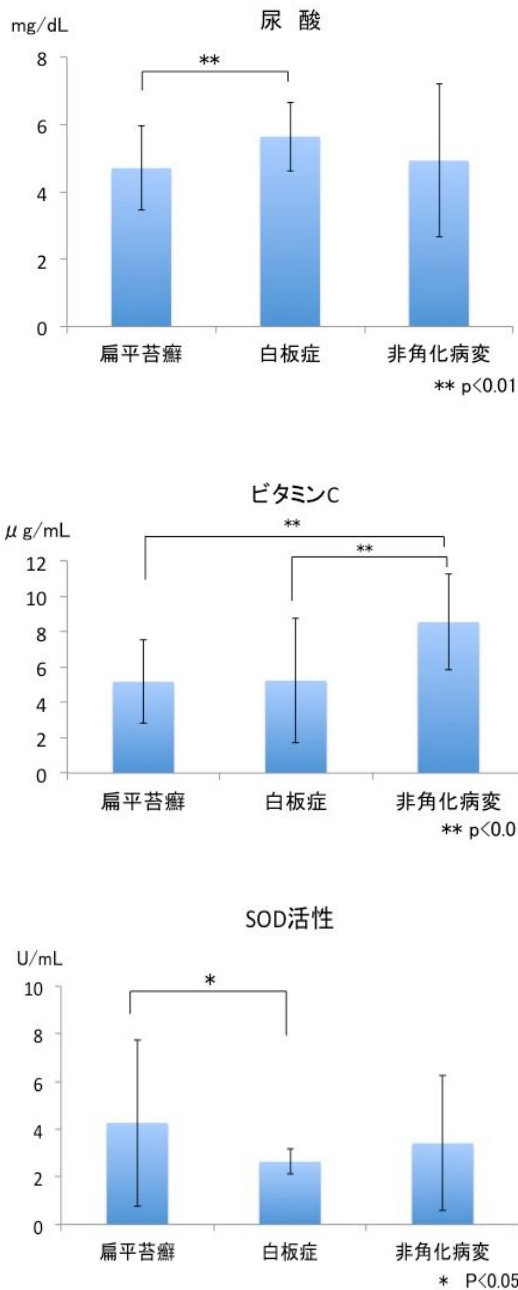


図1 各群の血清中尿酸、ビタミンC、SOD活性の測定値

(2)カルボニル化タンパクの検出 (WB法)

LPでは21症例中7例、LEでは10症例中6例に、100kD付近に見られたタンパクにカルボニル化を確認した(図2)。同時に行ったSDS-PAGE後の、同分子量のゲル片を切り出し、nanoLC MS/MSでタンパク同定を行ったところ、alpha-actinin-1、alpha actinin 4、tumor rejection antigen (gp96) 1、neutral alpha-glucosidase AB precursor のカルボニル化が示唆された。

酸化した脂質の分解物がタンパク質と結びついてALE=終末脂質過酸化産物(Advanced Lipoxidation Endproducts)という物質を作

り出してしまうのがカルボニル化である。過去の報告からも、カルボニルが老化現象や生活習慣病などの慢性疾患の原因の一つであると考えられるため、有害なカルボニルを減少させることで疾患を予防、治療する研究に発展させ、レドックス療法が可能となることが期待されている。近年では、皮膚の角質層の、カルボニル化による影響とそれによる変色等に関する報告がなされ、すでに商品が開発されている。口腔粘膜においても同様の影響が示唆される。

本研究では、カルボニル化したタンパクとして、alpha-actinin類、tumor rejection antigen (gp96) 1といった興味深いタンパクが同定された。alpha-actininはactin結合タンパクである。がん転移・浸潤の因子のひとつである細胞運動能に必要な変化としてactin束状化があり、特にactinin-4は、そのactin束状化タンパクと言われている。このタンパク質の発現の上昇は、浸潤性乳管癌の予後や、大腸癌のリンパ節転移、さらには口腔扁平上皮がんの浸潤様式と正の相関をしているという。

また、ヒートショックプロテインであるtumor rejection antigen (gp96) 1は、扁平上皮癌の陰性バイオマーカーとして研究が散見され、特にワクチン療法としての効果が期待されている。これらのような癌発現もしくは抑制への関与が疑われるタンパクのカルボニル化が、前癌状態、前癌病変である口腔粘膜角化病変を引き起こす可能性を追跡することは、非常に興味深いことである。

本研究の結果では、病変部に存在するカルボニル化合物やそのタンパク修復物の、口腔粘膜角化病変の病態における生物学的意義を解明するまでに至っていないが、カルボニル生成の抑制方法を発見できれば、予防医学的治療方法への応用、さらには臨床応用が可能な口腔ケア用品の開発にもつながると考えている。しかし、カルボニル化タンパクの発生機序は非常に複雑であることが予測され、さらに分子生物学的に解明していく必要があると思われる。

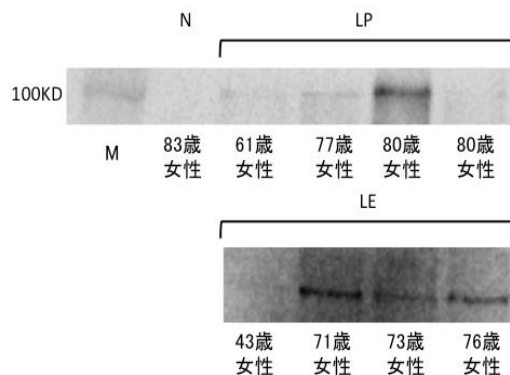


図2 WB法によるカルボニル化タンパクの検出

(3) HELの免疫組織染色

口腔粘膜角化病変、特に白板症で、基底細胞層に著明な抗HEL抗体による発色を認め、HELの局在性が明らかとなった(図3)。

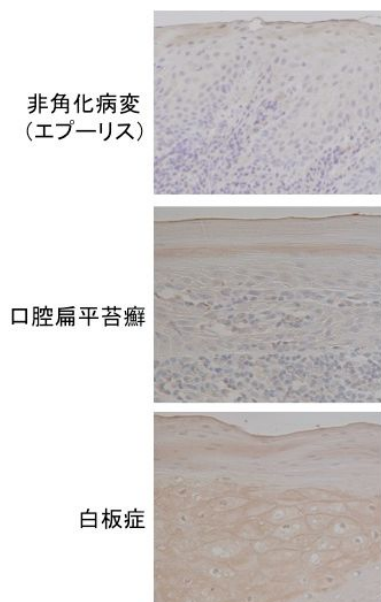


図3 抗HEL抗体による免疫組織染色所見

HELの発現と疾病との関連性については、動脈硬化病変部位に局在することが免疫学的に証明されており、したがって動脈硬化に伴い発症することが疑われる疾患への研究にも、HELの発現を利用した研究が多数行われている。本研究のテーマである酸化ストレスの、血管への影響を考慮することは、口腔粘膜角化病変発症解明の有効な手段となるかもしれない。

本研究の結果は、局所的な酸化ストレスの影響を大いに示唆できるものであった。今後、病変部から同定されたタンパクや動脈硬化等の脈管的病態について、さらに研究を進め解明していくことで、難治性口腔粘膜角化病変の治療および予防方法の開発につながっていくことが期待される。

<引用文献>

- Oh-Ishi M, Ueno T, Maeda T. Proteomic method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model otsuka long-evans tokushima fatty (OLETF) rat. *Free Radical Biol Med* 34, 11-22, 2003.
- Kumagai A, Nakayashiki N, Aoki Y, Analysis of age-related carbonylation of human vitreous humor protein as a tool for forensic diagnosis, *Legal Medicine* 9, 175-180, 2007.
- Ekuni D, Tomofuji T, Sande T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Kokeyuchi S, Yamamoto T, Periodontitis-induced lipid peroxide

in rat descending aorta is involved in the initiation of Atherosclerosis. *J Periodontol Res* 44, 434-442, 2009.

Yamada S, Yamamoto S, Yoshida H, Yoshitomo I, Kawasaki G, Mizuno A, Nemoto TK, RNAi-mediated down-regulation of alpha-actinin-4 decreases invasion potential in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39, 61-67, 2010.

Akutsu Y, Matsubara H, Kano M, Usui A, Yoneyama Y, Lkeda N, Komatsu A, Yusup G, Correlation between gp96 expression and the surgical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 18, 832-837, 2011.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 3件)

熊谷章子、口腔角化病変発症における酸化ストレスの影響 第1報 -全身的要因の検索-、第14回日本抗加齢医学会総会・学術集会、2014年6月6-8日、大阪府大阪市

角田耕一、口腔粘膜角化病変発症メカニズムにおける酸化ストレスの影響に関する研究、第60回日本口腔外科学会・学術大会、2015年10月16-18日、愛知県名古屋

Tsunoda Koichi, Influence of oxidative stress as the pathogenesis of oral hyperkeratosis, 23th Congress of the European Association for Cranio Maxillo-Facial Surgery, 13-16, September, 2016, London, UK.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷章子 (KUMAGAI, Akiko)

岩手医科大学・歯学部・口腔顎顔面再建学講座・口腔外科学分野・講師

研究者番号：10286594

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

角田耕一 (TSUNODA, Koichi)