

|         |  |
|---------|--|
| 氏名      | 小林 暉政  |
| 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6172号   |
| 学位授与の日付 | 令和2年3月25日  |
| 学位授与の要件 | 医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻<br>(学位規則第4条第1項該当)  |
| 学位論文の題目 | Effects of coffee intake on oxidative stress during aging-related alterations in periodontal tissue<br>(加齢による歯周組織中の酸化ストレスに対するコーヒー摂取の効果の検討) |
| 論文審査委員  | 大原 直也 教授      高柴 正悟 教授      佐々木 朗 教授   |

## 学位論文内容の要旨

### 【目的】

加齢とともに細胞における活性酸素種（ROS）の産生が増加し、酸化ストレスによってミトコンドリアのDNA損傷やアポトーシスが誘導される。したがって、抗酸化物質によりROSを減少させることは、全身への作用だけでなく局所においても加齢プロセスの抑制に役立つ可能性がある。歯槽骨吸収は加齢とともに進行し、ROSの関与が指摘されている。また、抗酸化物質は歯周病の予防に効果がある。一方、コーヒーは多くの国で消費されている飲料であり、強力な抗酸化能をもつ。過去の疫学研究において、コーヒーの摂取量が多い患者は歯周病の重症度が低いと報告されている。その一方で、コーヒーや高用量カフェインの摂取により歯周状態が悪化するという報告もある。しかし、コーヒーの摂取が加齢に伴う歯周組織の変化にどのような影響を及ぼすかについては不明である。

以上の背景から、コーヒーの摂取が全身の抗酸化能を高め、局所においても加齢に伴う歯周組織中の酸化ストレスの増加を抑制し、歯槽骨吸収を抑制するという仮説を設定した。本研究の目的は、ラットの加齢に伴う歯周組織中の酸化ストレス産生および歯槽骨吸収に対する、コーヒー摂取による抑制効果について検討することである。

### 【方法】

8週齢のFischer344系雄性ラットを、ベースライン群、通常食群、コーヒー含有粉末食群（0.62%コーヒー群と1.36%コーヒー群）の4群に分けた（各群8匹ずつ、計32匹）。ベースライン群は直ちに屠殺し、その他の群は12週間飼育後に屠殺し、血液、下顎骨、そして歯周軟組織を採取した。血清中の酸化ストレスの指標としてROSによる代謝産物の一つであるreactive oxygen metabolites (ROM)を、抗酸化能の指標としてOXY adsorbentを測定した。歯槽骨吸収の評価として、第一臼歯のセメント-エナメル境と歯槽骨頂間の距離を測定した。歯周軟組織中の酸化ストレスの評価として、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)の免疫染色を、抗酸化能の評価として、nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)の蛍光染色を行い、8-OHdGの陽性細胞率およびNrf2の核内移行率を算出した。さらに、採取した歯周軟組織を凍結破碎した後、RNAを抽

出し、酸化ストレスおよび抗酸化防御関連遺伝子を対象とした逆転写定量 PCR アレイ解析を行い、歯周軟組織中の酸化・抗酸化関連遺伝子について発現が変動するものを検索した。多群間の比較には Tukey 法を、2 群間の比較には Student *t* 検定を用いた。有意水準は 5%とした。

### 【結果】

血清中の ROM は、ベースライン群でいずれの群よりも有意に低く ( $p = 0.023$ )、コーヒー摂取の 2 群では通常食群よりも低い傾向にあったが、有意な差はなかった。一方、血清中の OXY adsorbent は、1.36% コーヒー群でいずれの群よりも有意に高かった。歯周軟組織中の 8-OHdG 陽性細胞率は、通常食群でベースライン群よりも有意に高く ( $p < 0.001$ )、1.36% コーヒー群では通常食群および 0.62% コーヒー群よりも有意に低かった ( $p = 0.001$  および  $p = 0.018$ )。歯槽骨吸収量は、通常食群でベースライン群よりも有意に大きく ( $p < 0.001$ )、1.36% コーヒー群では通常食群よりも有意に低かった。Nrf2 核内移行率は、1.36% コーヒー群で通常食群よりも有意に高かった ( $p = 0.008$ )。また、1.36% コーヒー群の歯周軟組織中で通常食群よりも発現量が 2 倍以上であった酸化・抗酸化関連遺伝子として、抗酸化関連遺伝子である *Glutamate cysteine ligase*、*Ferritin*、そして *Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1* を検出した。

### 【考察】

血清中の OXY adsorbent が 1.36% コーヒー群で通常食群よりも有意に増加したことから、コーヒー摂取によって全身血清中の抗酸化能が亢進したと考えられる。

歯周組織における 8-OHdG 陽性細胞率が、通常食群でベースライン群よりも有意に高い一方、1.36% コーヒー群では通常食群よりも有意に低かった。さらに、Nrf2 核内移行率が 1.36% コーヒー群で通常食群よりも有意に高かったことと、1.36% コーヒー群の歯周軟組織中で通常食群よりも発現量が 2 倍以上であった抗酸化関連遺伝子が検出されたことから、加齢によって歯周組織で産生された 8-OHdG が Nrf2 を介した抗酸化反応によって減少したと考えられる。

歯槽骨吸収量が、通常食群で有意に大きく、1.36% コーヒー群で有意に小さかったという最終的効果を現した。この効果に至るまでは、コーヒーを継続的に摂取すると、コーヒー中のポリフェノール（クロロゲン酸類など）が血中へ移行することで、全身の血液中の抗酸化能が高まる。全身循環から歯周組織へ至ると、歯周軟組織の細胞に存在する Nrf2 の核内への移行を促す。核内へ移行した Nrf2 は Antioxidant responsive element (ARE) に作用し、抗酸化物質を放出し、酸化ストレスとそれに伴う骨芽細胞の機能低下および破骨細胞の活性化を抑制することで歯槽骨吸収の進行を抑制することがわかっており、本実験においても加齢に伴う歯周組織中の酸化ストレス産生と歯槽骨吸収の進行を抑制した可能性が考えられる。

### 【結論】

1.36% コーヒー含有飼料を摂取したラットでは、全身血清中の抗酸化能が上昇し、局所の歯周軟組織の細胞においても Nrf2 核内移行が増加することで加齢に伴う歯周組織中の酸化ストレス産生と歯槽骨吸収が抑制されることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

加齢とともに活性酸素種（ROS）が増加し、ROSは歯槽骨吸収の進行に関与することが指摘されている。一方、コーヒーは抗酸化能をもつことが知られているが、その摂取が加齢に伴う歯周組織の変化にどのような影響を及ぼすかについては不明である。本研究では、歯周軟組織中の加齢に伴う酸化ストレスの産生、そしてコーヒーの摂取がその軽減に与える影響、その結果として加齢に伴う歯槽骨吸収に与える影響を検討した。

8週齢のFischer344系雄性ラットを、ベースライン（BL）群、通常食群、コーヒー含有粉末食群（0.62%コーヒー群と1.36%コーヒー群）の4群に分けた（各群8匹ずつ、計32匹）。BL群は直ちに屠殺し、その他の群は12週間の飼育後に屠殺し、血液、下顎骨、そして歯周軟組織を採取した。血清中の酸化ストレスの指標としてReactive Oxygen Metabolites（ROM）、抗酸化能の指標としてOXY adsorbentを測定した。歯槽骨吸収の評価として、第一臼歯のセメント-エナメル境と歯槽骨頂間の距離を測定した。歯周軟組織中の酸化ストレスの評価として、8-hydroxydeoxyguanosine（8-OHdG）の免疫染色を、抗酸化能の評価として、nuclear factor erythroid 2-related factor 2（Nrf2）の蛍光染色を行い、8-OHdGの陽性細胞率およびNrf2の核内移行率を算出した。さらに、採取した歯周軟組織からRNAを抽出し、酸化ストレスおよび抗酸化防御関連遺伝子を対象とした逆転写定量PCRアレイ解析を行い、歯周軟組織中の酸化・抗酸化関連遺伝子について発現が変動するものを検索した。多群間の比較にはTukey法を、2群間の比較にはStudent *t*検定を用いた。有意水準は5%とした。

血清中のROMは、BL群でいずれの群よりも有意に低く（ $p=0.023$ ）、コーヒー摂取の2群では通常食群よりも低い傾向にあったが有意な差はなかった。一方、血清中のOXY adsorbentは、1.36%コーヒー群でいずれの群よりも有意に高かった。歯周軟組織中の8-OHdG陽性細胞率は、通常食群でBL群よりも有意に高く（ $p<0.001$ ）、1.36%コーヒー群では通常食群および0.62%コーヒー群よりも有意に低かった（ $p=0.001$ および $p=0.018$ ）。歯槽骨吸収量は、通常食群でBL群よりも有意に大きく（ $p<0.001$ ）、1.36%コーヒー群では通常食群よりも有意に低かった（ $p=0.001$ ）。Nrf2核内移行率は、1.36%コーヒー群で通常食群よりも有意に高かった（ $p=0.008$ ）。また、1.36%コーヒー群の歯周軟組織中で通常食群よりも発現量が2倍以上であった酸化・抗酸化関連遺伝子として、抗酸化関連遺伝子である *Glutamate cysteine ligase*、*Ferritin*、そして *Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*を検出した。

以上のことから1.36%コーヒー含有飼料を摂取したラットでは、コーヒーに含まれる有効成分であるポリフェノールが小腸などの消化管で吸収され、全身血中へと移行することで、歯周軟組織の細胞におけるNrf2の核内移行が増加し、抗酸化物質を放出することで加齢に伴う歯周軟組織中の酸化ストレス産生と歯槽骨吸収が抑制されることが示唆された。

本論文は、すでに学術誌「In Vivo」に受理されている。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。