

研究者：石岡みずき（所属：東京歯科大学千葉病院小児歯科学講座）

研究題目：nNOS ノックアウトマウス歯肉における各種 NOS および SOD の発現

目 的：

NO（一酸化窒素）は常温で無色無臭のガス状分子であり、従来は大気汚染物質として認識されていた。しかし 1987 年、Furchgott らによりこの気体が生体内で血管を弛緩させる作用があることが報告されて以来、NO の持つ様々な生理機能が明らかになってきた。

生体内において NO は細胞内に遊離している NO の受容体、可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化して GTP からサイクリック GMP を生成する。サイクリック GMP はプロテインキナーゼ G を活性化するセカンドメッセンジャーとして働きリン酸化カスケードを通して細胞の活性を変化させ、神経伝達や記憶の形成、殺菌、アポトーシスの抑制、平滑筋の弛緩、血小板凝集の抑制、血管内皮細胞の弛緩など様々な機能を発現させる。

様々な生理機能に関わる NO だが各組織における NO の発生状況を観察しようとするとき、課題となることがある。それは NO が不対電子を持ち他の物質との反応性が高いフリーラジカルの一種であるため、発生したあとすぐに他の分子と結びついて化合物を作ってしまうこと、また、半減期が 3~6 秒と短いことといった理由から、直接発生状況を観察するのが困難であるということである。

そのため NO の関連酵素を用い、その酵素をタンパクレベルや mRNA レベルで観察することにより NO の発生状況を間接的に検索する方法が試みられてきた。

NO は、生体内では一酸化窒素合成酵素（NOS）と呼ばれる酵素によって合成される。ほ乳類の NOS には 3 種類のアイソザイムが報告されている。

nNOS は最初に小脳より精製されたことから神経型と呼ばれている。

nNOS は酵素の状態で構成的に発現しており、細胞内のカルシウム濃度の上昇に伴って活性化され、NO を産生する。近年では脳や脊髄だけでなく、骨格筋、心筋、膵臓の β 細胞、腎臓、そのほか多くの部位でも構成的に発現していることが報告されている。

iNOS は、他の 2 種類のアイソザイムと異なり、通常酵素の形では発現していない。細胞内では転写の段階で制御されており、各種サイトカインおよび細菌の細胞壁構成成分である LPS 等の刺激を受け、主にマクロファージにおいて誘導されるため誘導型 NOS と呼ばれている。iNOS 由来の NO は殺菌作用を発揮するが、iNOS 由来の NO は他の NOS によって合成される NO の 300 倍から 1000 倍とも報告されており、過剰に産生された NO により宿主細胞や生体が障害を受けることも明らかになっている。

eNOS は主に血管内皮細胞に構成的に発現している NOS で、細胞内のカルシウム濃度の上昇に伴って活性化され、NO を産生する。eNOS 由来の NO は血管内皮細胞を弛緩させる作用の他、血小板の凝集を抑制する作用も報告されており血圧の調節に重要な役割を果たしている。

これらの NOS アイソザイムを含め、酵素には、部位特異性がある。これは、組織ごとに主体

となって機能するアイソザイムが異なるという性質であり、nNOSが主体となって働くとされている組織は脳、神経系以外にも多数の報告がある。nNOSノックアウトマウスを用いた実験により、腎臓では遠位尿細管での浸透圧調整にnNOSが重要な役割を果たすことや、気管上皮細胞や肺の上皮細胞においても、正常状態ではnNOSがNO合成を主体となって行っていることが示唆されている。また、nNOSインヒビターを用いた研究では唾液腺の線条部、介在部においても正常状態でnNOSが発現していることが分かっている。

歯肉におけるNOS研究はこれまで、そのほとんどが炎症性病変、すなわち歯肉炎、歯周炎に関わるものであった。2002年、Gaspircらにより慢性歯周炎においてiNOSが正常より強く発現することが報告されて以来、歯周炎に関わるサイトカインとiNOSに関する研究や急性歯周炎、若年性歯周炎の研究、さらには矯正力やインプラント治療時のiNOSの変化などが報告されてきたが、酵素の部位特異性に関しては、歯肉ではほとんど報告がない。共同研究者である渡邊は、他の部位と同様に歯肉においてもNOSアイソザイムのうちのいずれかが部位特異性を有すると仮定し、これまでにiNOSノックアウトマウス、eNOSノックアウトマウスについて検索を行ってきた。NOS2、NOS3のノックアウトにより、歯肉の上皮に関しては他のアイソザイムの変動が見られ、特にNOS3のノックアウトによる変動が著しかったことから、歯肉上皮に部位特異性を有するのはeNOSであることが示唆された。しかし、歯肉の固有層については、iNOSノックアウト、eNOSノックアウトのいずれにおいても他のアイソザイムの変動がみられなかった。

そこで今回、歯肉固有層に部位特異性を有する酵素はnNOSであるという仮説を立て、nNOSノックアウトマウスを用いた実験を行った。

nNOSのノックアウトによる他種アイソザイムの変動を観察し、もし変動が大きければnNOSの部位特異性が示されると考えたためである。

対象および方法：

材料は5週齢で体重20～25gの雄性マウスである。実験群にnNOSノックアウトマウスを、対照群にC57BL6マウスを使用した。マウスに麻酔を施し4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定、その後下顎臼歯部歯槽骨を歯牙と共に切り出し室温で2時間の後固定を行った。パラフィン包埋を行い、ミクロトームにて5 μ mに薄切し標本とした。資料の観察は免疫組織科学染色により各種NOSタンパクの局在を、その後in situ hybridizationにより各種NOS mRNAの発現を検索した。免疫組織科学染色の一次抗体はnNOSとiNOSにはラビットポリクローナルIgG、eNOSにはマウスモノクローナルIgGを用い一時間反応させた。その後nNOSとiNOSはゴートアンチラビット、eNOSはゴートアンチマウスのビオチン標識二次抗体を30分反応させた。In situ hybridizationは通法どおりプレハイブリダイゼーションを行い、ブロッキング後、Dig ラベルのアルカリフォスファターゼ複合体NOSプローブによりハイブリダイゼーションを行った。今回のin situ hybridization法は岡山大学解剖学第一講座佐々木教授のプロトコルに準ずる。また、使用したプローブの設計は大阪市立大学医学部井上正康教授の提供による。

結果および考察：

免疫組織化学染色による各種 NOS タンパクの局在

nNOS タンパクはコントロール群では歯肉固有層に局在し、血管内皮細胞および線維芽細胞で陽性の所見が得られた。ノックアウト群では全ての部位で陰性であり、ノックアウトの結果 nNOS タンパクが産生されていないことが示された。

iNOS タンパクはコントロール群では全ての部位で陰性を示したがノックアウト群では固有層の血管内皮細胞および線維芽細胞で陽性反応が認められた。

eNOS タンパクはコントロール群では固有層の血管内皮細胞および線維芽細胞において弱い陽性反応を示した。

ノックアウト群では固有層の血管内皮細胞および線維芽細胞でコントロール群より強い陽性反応を認めた。

NOS タンパクの染色結果をまとめると正常状態では nNOS と eNOS が歯肉固有層に局在しており、特に nNOS で強く発現していた。ノックアウトでは iNOS と eNOS が固有層で強く発現し、eNOS の結果は正常状態よりノックアウトで発現が増強していた。

in situ hybridization による各種 NOS mRNA の発現

nNOS mRNA はコントロール群において歯肉固有層の血管内皮細胞 および線維芽細胞で陽性の所見が得られた (Fig.1a)。ノックアウト群では全ての部位で陰性であり、ノックアウトの結果 nNOS mRNA が合成されていないことが示された (Fig.1b)。

iNOS mRNA はコントロール群では全ての部位で陰性を示したが (Fig.2a)、ノックアウト群では固有層の血管内皮細胞および線維芽細胞で陽性反応が認められた (Fig.2b)。

eNOS mRNA はコントロール群では固有層の血管内皮細胞および線維芽細胞で弱い陽性反応を (Fig.3a)、ノックアウト群では固有層の血管内皮細胞および線維芽細胞でコントロール群より強い陽性反応を認めた (Fig.3b)。

今回、歯肉の固有層において NOS1 をノックアウトしたことにより、他の2種類の NOS, iNOS と eNOS の発現が著しく増強するという結果を得た。特に iNOS は、固有層の血管内皮細胞と線維芽細胞において変化が大きく、コントロールでは発現が認められなかったものが mRNA レベルでもタンパクレベルでもノックアウトにより強い陽性反応を示した。eNOS も、mRNA レベル、タンパクレベルともに固有層の細胞において発現が増強しており、特に線維芽細胞においてコントロールと比較して強い発現を認めた。

今回、nNOS のノックアウトにより、iNOS と eNOS の発現が著しく増強したことから、歯肉における NOS の恒常性を維持する機構が著しくダメージを受けたことが推察される。種類の異なる NOS 間においては、代償性機構が働くことが示唆されているが、構成的 NOS だけでなく誘導型の iNOS が著しく増強したことは、代償機構として十分なレベルを超えて NO が過剰に発生していることを伺わせる。

今回の実験では、歯肉に発赤等の肉眼的な炎症所見は認められなかったが、過剰な NO 発生の影響による創傷の治癒の遅れや炎症の憎悪などといった影響が出てくる可能性も考えられる。

以上のように、nNOS の欠損状態を観察したことにより、歯肉における nNOS の重要性が明らかとなった。歯肉においては、正常状態における NO 環境の解明がまだまだ十分とは言えない

い。これは、iNOS と炎症性病変の関わりがクローズアップされてきたために、歯肉炎、歯周炎における NOS 研究が先行し、基本的な研究がいわば取り残されてしまった結果とも言える。今回検索した NOS とともに、NO 消去酵素や NO との関わりが深い活性酸素種の動態も含め、今後も検討する必要があると考える。

成果発表：（予定を含めて口頭発表，学術雑誌など）

Tissue and Cell に投稿し，受理されている。