

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06962

研究課題名(和文) 歯周組織老化におけるmicroRNA-34aの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of micro RNA-34a in senescent periodontal ligament cells.

研究代表者

池上 久仁子 (Ikegami, Kuniko)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80779116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は加齢に伴い罹患率が増加し、歯周組織の喪失を伴う慢性炎症性疾患である。よって、細胞レベルでの生物学的老化の関与が強く示唆される。MicroRNA(miRNA)は、ストレス応答性の小分子RNAであり、老化寿命の制御に関わることが報告されている。我々が、遺伝子網羅解析により同定したmiR-34aは、老化歯根膜に強発現しており、長寿遺伝子、NAD+依存性ヒストン脱アセチル化酵素SIRT1を標的遺伝子としていた。本研究により、老化歯根膜細胞におけるmiR-34aによるSIRT1の発現制御が、歯周組織における歯根膜の幹細胞性喪失の一端を担うことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is characterized as an age-dependent chronic disease with tissue destruction caused by dental plaque. Accumulation of environmental stress, such as bactericidal infection, ROS and traumatic occlusal force is thought to induce senescence in periodontal tissue at cellular level. We previously reported that senescent human periodontal ligament cells (HPDL) secrete various inflammatory cytokines, referred to as the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Moreover, senescent HPDL showed the diminished stem cell property. A comprehensive analysis of microRNA identified miR-34a which is preferentially expressed in senescent HPDL as a regulator of cellular senescence. While miR-34a expression was elevated, SIRT1 expression was decreased in senescent HPDL. Exogenous miR-34a treatment induced IL-6 production in HPDL by targeting SIRT1. miR-34a-SIRT1 pathway may participate in stem-cell aging in senescent HPDL.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 老化

1. 研究開始当初の背景

ヒトは、加齢 (Aging) に伴い免疫系、内分泌系、神経系を統べる生体システムが低下し、各種臓器の機能不全を特徴とした全身の老化 (Senescence) が進行する。また、糖尿病、動脈硬塞性疾患、リウマチ性疾患などの成人性疾患の基礎病態として加齢性の慢性炎症が注目されている。このような老化に伴う臓器の機能低下の原因として、細胞レベルでの老化、すなわち“細胞老化説”が有力視されている。老化臓器において、構成細胞ならびに幹細胞は、その増殖能の低下により組織の修復・治癒を遅延すること (ステムセルエイジング) 近年になり、老化細胞が炎症性サイトカインやケモカイン、マトリックス分解酵素 (以下 MMPs と略す) を高分泌する SASP (Senescence associated secretory phenotype) 随伴現象が明らかとなり、臓器に老化性炎症を誘導する機構が細胞レベルで明らかとされつつある。

歯周病の発症と進行において、加齢は重要なリスク因子の一つである。臓器へとつながる第一関門である口腔において、歯周組織は細菌種、活性酸素種、メカニカルストレスなどの老化誘導ストレスに暴露されることから、老化が及ぼす影響は甚大と考えられる。しかしながら、いかなる分子機構によって歯周組織の老化が進行し、慢性炎症を伴う組織破壊に至るかは未だ不明である。そこで、申請者は“高齢者に特徴的な歯周病の病態形成には、老化細胞が関与している”との仮説のもと、歯周組織における老化細胞の同定と同細胞の機能解析に取り組んでいる。

歯根膜細胞は、豊富な細胞外基質タンパク (ECM) を産生することで歯根膜の生理的特性を担うのみならず、骨芽細胞、セメント芽細胞へ分化する能力を維持することで、硬組織代謝を担う幹細胞性を有し、歯周組織再生の鍵となる細胞である。よって、申請者らのグループは、初代培養ヒト歯根膜細胞を用いた *in vitro* 複製老化モデルを樹立し、老化ヒト歯根膜細胞の機能解析に取り組んでいる。実験当初の研究結果より、ヒト歯周組織においても老化細胞由来の慢性炎症を示唆する基礎データが得られたことより、歯根膜細胞に特徴的な生理作用を調節制御する miRNA を同定するために microRNA アレイ (2000 プローブ) による解析を実施し、老化歯根膜細胞に高発現している miRNA 種群を同定した。その中で、歯根膜における細胞老化の制御因子の候補として、発現頻度が上位に位置する、miR-34a に着目した。miR-34a は、ガン抑制遺伝子 p53 によって発現が誘導され、細胞周期制御サイクリン依存性キナーゼ CDK4/6、アポトーシス制御 BCL2 を標的遺伝子とし、機能阻害することが報告されている。興味深いことに、miR-34a ノックアウトマウス由来の体細胞に山中 4 因子の遺伝子導入により、iPS 細胞の誘導効率の向上が報告さ

れており、miR-34a が幹細胞性の維持に重要であることが示唆されている。また、申請者は、バイオインフォマティクス解析により、miR-34a が、幹細胞ニッチへの分化に重要な NOTCH、長寿遺伝子 SIRT1 を標的遺伝子とすることを見つけたことより、miR-34a が歯根膜の幹細胞性の制御を介して歯周組織の恒常性維持に果たす役割は大きいと予測した。そこで、本研究においては、miR-34a が歯根膜の恒常性維持に果たす役割、とりわけ細胞老化 (Cellular senescence) が幹細胞老化 (ステムセルエイジング) に及ぼす影響を解析し、老化歯周組織の破綻の原因として、幹細胞能の低下による組織喪失と治癒の遅延のメカニズムの解明に取り組む本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

歯周病は、加齢に伴い疾患罹患率並びに重篤度が増加する慢性炎症性の疾患であり、加齢が重要なリスク因子の一つであることが疫学的に証明されている。現在、加齢に伴って臓器の機能が低下し、生体の老化現象が進行する原因の一つとして、「細胞老化」説が有力視されているが、歯周病における老化細胞の役割は未だ不明である。

本研究では、歯周組織の老化過程を *in vitro* モデルにて構築し、歯根膜細胞の細胞老化の分子機構を microRNA (miRNA-34a) に焦点をあてて検討する。得られた分子情報を *in vivo* 動物モデルで検証することで、歯周組織老化の分子病態を解明し、新規の歯周病診断法、再生治療法開発の為の基盤情報とする。

3. 研究の方法

本研究課題では、歯周組織の老化過程を *in vitro* モデルにて構築し、歯根膜の細胞老化ならびに幹細胞老化 (ステムセルエイジング) を miR-34a を中心とした分子機構として解明する。歯根膜細胞は、豊富な ECM タンパクを産生することで歯根膜の物理的特性を担うのみならず、骨芽細胞、セメント芽細胞へ分化することで硬組織代謝を担う幹細胞能を有し、歯周組織恒常性の維持、組織再生の鍵となる細胞である。

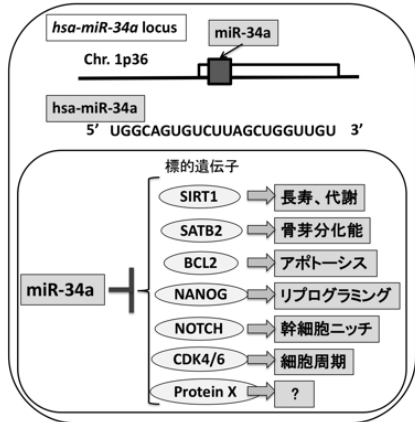
そこで、次の項目について解析を行った。

miR-34a が歯根膜細胞の幹細胞能に及ぼす影響を *in vitro* モデルにて検討する。

メカニカルストレス、細菌性刺激、活性酸素種などの老化誘導ストレスが、歯根膜細胞における miR-34a 機能をどのように調節制御しているか検討する。

In vivo 歯周病モデルを用いて、歯周組織老化における miR-34a の生理作用を検討する。

4. 研究成果



平成 28 年度は、ヒト歯根膜細胞の老化過程において、miR-34a がいかなる分子メカニズムで幹細胞能を制御しているのかについて、細胞、分子レベルで検討した。初代ヒト歯根膜細胞 (HPDLs) に継代培養を繰り返し、複製老化を誘導し、HPDLs の細胞老化機構について検討した。p16、p21 等の細胞周期制御タンパクの発現ならびに SA-β Gal 活性の増強を確認することで、老化 HPDLs への誘導ならびに樹立を確認した。老化 HPDLs は、SASP (Senescence associated secretory phenotype) 随伴現象の代表的な炎症タンパクである炎症性サイトカイン、ケモカイン、IL-6、IL-8 と、各種の MMPs 産生の増強を示した。興味深いことに、老化 HPDLs は、細胞運動能の低下を示し、HPDLs に特異的な細胞外マトリクス (ECM) タンパクの一つである、Periostin 産生の異常を認めた。

In vitro 複製老化誘導過程において、継代数の異なる細胞における幹細胞の割合を、幹細胞の表面抗原マーカーの一つである SSEA3 と CD105 について、FCM 解析にて比較、検討した。その結果、継代を経た老化 HPDLs においては、CD105 陽性細胞の割合は変動しないものの、SSEA3 陽性細胞の割合は著明に減少することを見出した。

老化 HPDLs においては、miR-34a の発現が増加する一方で、標的遺伝子である長寿遺伝子、NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 の発現が減少していることを、Western blot 法、細胞免疫染色法によりタンパクレベルで確認した。

また miR-34a (hsa-miR-34a) の RNA 配列を模倣して人工合成した mimic miRNA あるいは、相補配列で阻害作用をもつ microRNA 阻害剤 (inhibitor miRNA) を老化 HPDLs、正常 HPDLs に遺伝子導入し、その生理的役割を検討した。その結果、miR-34a mimic の導入により、正常 HPDLs において、SIRT1 の発現がタンパクレベル、遺伝子レベルで減少することを確認した。

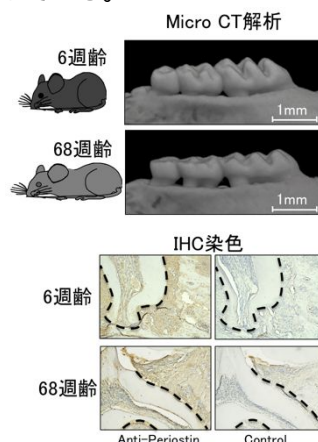
平成 30 年度は、前年度から継続し、miR-34a

のヒト歯根膜の幹細胞能に及ぼす影響を検討した。その結果、miR-34a mimic を正常 HPDLs に導入することにより、G1/S 期の細胞周期調節因子である CDK2/4 の発現低下を認めた。実際に、老化 HPDLs は、miR-34a を強発現し、細胞増殖の低下を示したことから、老化 HPDLs において認められる、不可逆性の細胞増殖の停止機構の一端を miR-34a が担っていることが示唆された。また、miR-34a mimic の導入により、上述の Periostin の mRNA レベルの発現が増加したことより、miRNAs 依存性の ECM タンパクの機能変化が、老化歯根膜細胞の幹細胞性ならびに細胞運動性の喪失に与ることが示唆された。

また、細胞分裂をほぼ停止した immature 老化 HPDLs は、IL-6、IL-8、ケモカイン、MMPs を高産生する SASP 随伴現象を示した。しかしながら、その分子機構を詳細に検討した結果、炎症性 miRNAs として報告のある miR-146a ではなく、miR-34a が、老化 HPDLs の SASP 随伴現象に重要であることを見出した。現在、miR-34a が、SIRT1 の機能制御を介して、NF-κB 依存性に炎症性サイトカインを誘導するメカニズムについて解析を実施している。

miR-34 の発現を誘導する遺伝子として、ガン抑制遺伝子 P53 が報告されている。そこで、正常 HPDLs に、各種の増殖因子、BMP-2、TGF-β、FGF-2 或いは、炎症性サイトカイン、IL-1、TNF-α ならびに H₂O₂ 刺激を添加した結果、H₂O₂ 刺激は P53 発現を増強し、増殖因子 FGF-2 のみが P53 を発現抑制した。これは、FGF-2 シグナルが、歯根膜細胞において、P53 の発現を介して細胞老化を抑制するメカニズムを示唆するものであり、大変興味深い。

次に、高週齢マウスを用いた実験により、*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) 細菌非感染に加齢性の歯槽骨吸収を伴う歯周病の *in vivo* 老化性炎症の歯周病病態モデルの構築に成功した。実際に、組織切片を用いた免疫組織学的な解析により、老化マーカーである SA-β GAL の上昇と、上述の SIRT1、Periostin の発現変化を認めた。現在、小分子 RNA である miRNAs 検出が可能な新規 *in situ* hybridization 法により、歯周組織における miR-34a の発現と幹細胞遺伝子の発現分布を検討している。



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4件)

池上久仁子、山下元三、鈴木美麻、柳田学、野崎剛徳、山田聡、北村正博、村上伸也
歯根膜の老化性炎症における細胞老化の役割、第59回秋季日本歯周病学会学術大会2016/10、新潟

山下元三、池上久仁子、鈴木美麻、柳田学、山田聡、北村正博、村上伸也
microRNA-34aによるヒト歯根膜細胞の老化制御、第39回日本分子生物学会年会、2017/11、横浜

池上久仁子、山下元三、鈴木美麻、山本智美、沢田啓吾、森健太、粟田敏仁、大原廣之、柏木陽一郎、小笹匡雄、竹立匡秀、北垣次郎太、柳田学、野崎剛徳、山田聡、北村正博、村上伸也
歯周組織の老化性炎症におけるmicroRNA-34aの役割、第16回日本再生医療学会総会、2017/03、仙台

池上久仁子、山下元三、鈴木美麻、三木康史、北垣次郎太、柳田学、北村正博、村上伸也
ヒト老化歯根膜細胞におけるmicroRNA-34a-SATB2を介した硬組織形成制御、第38回日本炎症・再生医学会、2017/07、大阪

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
池上久仁子(IKEGAMI KUNIKO)
大阪大学・歯学部附属病院 医員
研究者番号：80779116

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

山下元三(YAMASHITA MOTOZO)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：90524984

村上伸也(MURAKAMI SHINYA)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号：70239490