

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：18K09639
研究課題名（和文）歯周組織の老化におけるGDF6の機能解析

研究課題名（英文）GDF6 in Aging of Periodontal Tissue

研究代表者

瀬名 浩太郎（Sena, Kotaro）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：60701117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：老化は生体内の全ての組織を脅かす現象であり、組織の恒常性の維持や創傷治癒能力の低下を引き起こす。現在、歯周組織の再生に関わる多くの研究も再生する組織や個体の老化についての検証はほとんど行われていない。本研究では歯周組織で発現される成長因子の一つであるgrowth differentiation factor 6（GDF6）がヒト歯根膜細胞の老化によってその発現が影響されるのか、さらに老化に関連するタンパク質の発現について解析を行った。本研究より、歯周組織の老化にGDF6が関与していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、老化に伴い、歯周組織におけるGDF6の発現が減弱し、老化に関連するタンパク質の発現の亢進を認めた。このことは、加齢とともに増加する歯周病の発症および高齢者で重症化し易い歯周治療に関する研究分野において、重要な知見となり得る。我々の研究結果により、GDF6が歯周病の発症および予防に関わる因子となる可能性が示唆された。このことは、GDF6に着目した新しい歯周治療のアプローチを提供できると考えられ、社会的にも有意義である。

研究成果の概要（英文）：Aging is a phenomenon that affects all tissues in the body and causes deterioration in maintaining tissue homeostasis and wound healing ability. At present, most studies related to periodontal tissue regeneration have rarely verified the effect of aging in regenerated tissues and individuals. In this study, we analyzed whether the expression of growth differentiation factor 6 (GDF6), which is one of the growth factors expressed in periodontal tissue, is affected by the aging of human periodontal ligament cells and the expression of proteins related to aging. From this study, it is considered that GDF6 is involved in the aging of periodontal tissue.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周疾患 老化 歯根膜細胞 GDF6

1. 研究開始当初の背景

歯周病は我が国において極めて高い罹患率を示す口腔疾患である。平成 28 年度の歯科疾患実態調査によると、我が国において、歯周疾患を有する人は 45 歳以上で約半数に達しており、年齢が増すにつれて重症化していき、50~70 歳代の人半数以上が中等度~重度の歯周病となる。従って、歯周疾患の病態メカニズムの解明により導かれる新規の予防法、診断法や治療法の社会的意義は極めて高いと考えられる。歯周病により破壊される歯周組織は歯槽骨、セメント質、歯根膜、歯肉といった複数の異なる組織によって構成される。歯根膜中に存在する歯根膜細胞(PDL)には新たな骨・セメント質・歯根膜に分化しうる歯根膜由来幹細胞が存在しており、歯周組織の恒常性の維持や歯周組織の再生に関与することが知られている。

老化は生体内の全ての組織を脅かす現象であり、形態的な変化のみならず、組織の恒常性の維持や創傷治癒能力の低下を引き起こし、これらに組織特異的な幹細胞が関与することが知られている。細胞老化の特徴として細胞増殖を停止すること以外にも大きく広がった形態などさまざまな表現型が報告されてきた。さらに近年、細胞老化により遺伝子の発現プロファイルが大きく変化することも明らかになってきた。なかでも、細胞が老化にともない炎症性サイトカインなどさまざまな分泌性タンパク質を高発現し、それらを細胞外に分泌する細胞老化関連分泌現象(senescence-associated secretory phenotype; SASP)とよばれる現象が注目されている。SASP タンパク質の多くは炎症反応を促進する作用をもつことが知られており、老化細胞が SASP を介して炎症性疾患を制御している可能性も示唆されている。このため、細胞老化にともなう SASP 等の分泌性タンパク質の役割を解明することは、歯周炎など加齢にともなう疾患の発症機序の解明や予防法の開発に役立つものと期待される。しかしながら、老化による PDL からのタンパク質の分泌への影響については不明である。

GDF6 は歯周組織でも歯根形成期に発現している成長因子であり、GDF6 が間葉系幹細胞の老化とともに発現が減少し、GDF6 の高発現が老化した MSC の機能を回復することが報告された。歯周組織の老化および歯周炎でも GDF6 の関与が推測されるが、歯周組織における GDF6 の機能は不明である。

2. 研究の目的

歯周組織の老化における GDF6 の機能を解明し、GDF6 を応用した歯周病の新規の再生療法の開発のための研究基盤の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯根膜細胞の培養

LONZA 社より購入したヒト歯根膜由来線維芽細胞を使用した。継代培養により継代をおおよそ 25 回繰り返す(P25)と複製老化が起きることが報告されており、本研究では継代初期(P5)および継代後期/複製老化(P30)の細胞を使用した。

(2) 酸性ガラクトシダーゼ(SA-gal)染色

老化細胞マーカーである SA-gal 染色を行った。

(3) リアルタイム polymerase chain reaction (real-time PCR) 法

SASP タンパク質、骨分化のマーカー分子等について、各分子に対する特異的なプライマーを用い、遺伝子発現量の解析を行った。

(4) 骨芽細胞様分化

各細胞を骨分化誘導培地にて培養し、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の解析を行った。

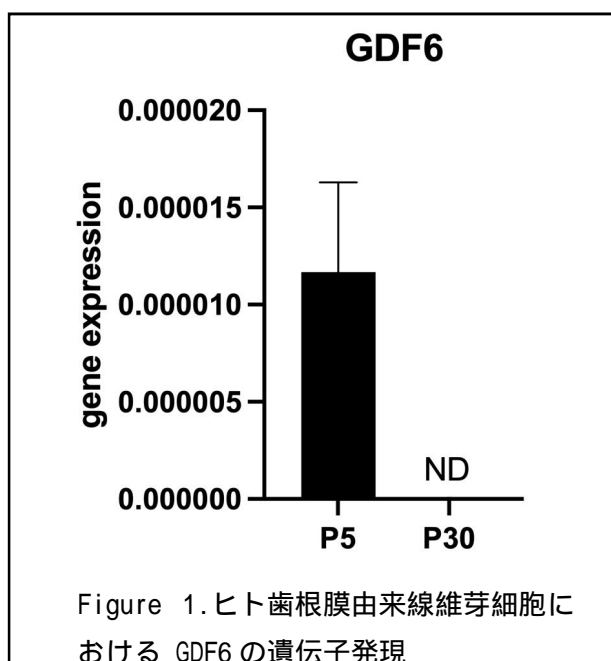
(5) マウス

8 週(2 ヶ月) 齢および 105 週(2 年) 齢の C57BL/6 マウス(雄)の下顎臼歯を摘出後、歯根部より歯根膜組織を採取した。

4. 研究成果

(1) 歯根膜細胞の老化による GDF6 の発現

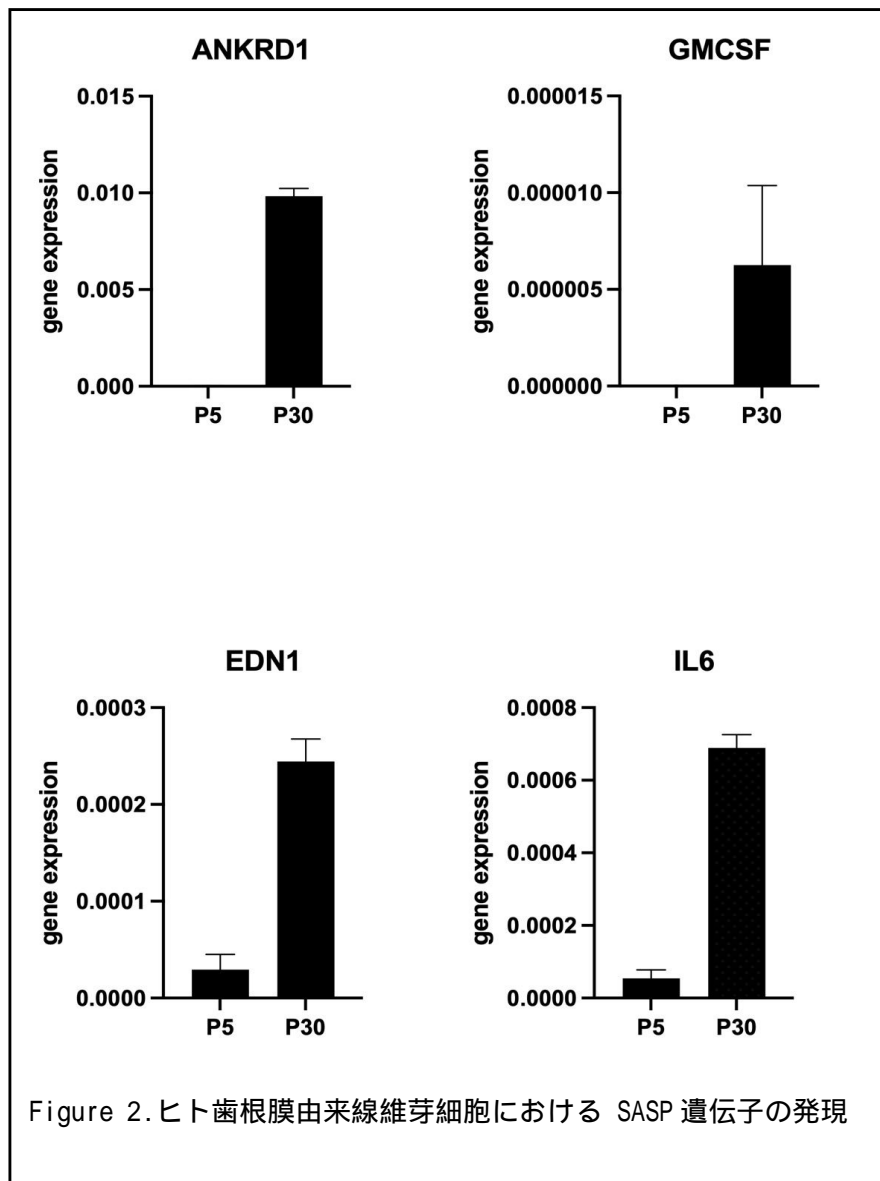
継代初期(P5)および継代後期/複製老



化 (P30) のヒト歯根膜由来線維芽細胞における SA- gal 染色を行い、P30 の歯根膜細胞では SA- gal 陽性の細胞を認めた。その後、P5 および P30 の歯根膜細胞における GDF6 の発現の解析を行い、P5 では GDF6 の遺伝子発現を認めたが、P30 では発現が検出されなかった。(Figure 1)

(2) SASP タンパク質の遺伝子発現

P5 および P30 のヒト歯根膜細胞における SASP 遺伝子の発現の解析を行い、P5 と比較し、P30 では ANKRD1、GMCSF、EDN1、IL6 の遺伝子発現が有意に高かった (Figure 2)。また、P30 では CSF1 の遺伝子発現レベルも有意に高く認められた。



(3) マウス臼歯の歯周組織における GDF6 の発現

8 週齢のマウス臼歯の歯周組織では GDF6 の発現を認めたが、105 週齢のマウス臼歯の歯周組織では GDF6 の発現が検出されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Shirakata Yoshinori, Imafuji Takatomo, Sena Kotaro, Shinohara Yukiya, Nakamura Toshiaki, Noguchi Kazuyuki | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Periodontal tissue regeneration after low intensity pulsed ultrasound stimulation with or without intra marrow perforation in two wall intra bony defects - A pilot study in dogs | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology | 6. 最初と最後の頁 54 ~ 63 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcpe.13197 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Sena Kotaro, Furue Kirara, Setoguchi Fumiaki, Noguchi Kazuyuki | 4. 巻 129 |
| 2. 論文標題 Altered expression of SARS-CoV-2 entry and processing genes by Porphyromonas gingivalis-derived lipopolysaccharide, inflammatory cytokines and prostaglandin E2 in human gingival fibroblasts | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Archives of Oral Biology | 6. 最初と最後の頁 105201 ~ 105201 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2021.105201 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 瀬名浩太郎, 古江きらら, 野口和行 |
| 2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis 由来 lipopolysaccharide の骨細胞への影響 |
| 3. 学会等名 第 1 回南九州歯学会総会 ・ 学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Y Shirakata, T Imafuji, K Sena, Y Shinohara, T Nakamura, K Noguchi |
| 2. 発表標題 Periodontal regenerative effect of low-intensity pulsed ultrasound with/without intramarrow perforation in intrabony defects in dogs |
| 3. 学会等名 IAP 2019 The 17th Biennial Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|--|-------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 迫田 賢二 (Sakoda Kenji) (70419654) | 鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701) | |
| 研究 分担者 | 古江 きらら (Furue Kirara) (10813157) | 鹿児島大学・附属病院・助教 (17701) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|