

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17063

研究課題名(和文) 歯周組織における歯根膜マイトファジーの生体ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analysis of mitophagy dynamics in periodontal ligament.

研究代表者

中村 友美 (Nakamura, Tomomi)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：00807589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯根膜細胞は、オートファジー阻害下では細胞内ROSの蓄積が増加した。それに伴って、異常形態のミトコンドリアの増大とミトコンドリア由来ROSの増加が認められた。蛍光プローブ mt-Keimaを導入した安定発現株の解析により、マイトファジー機能が歯根膜細胞のROS制御には重要であることが明らかとなった。さらに、新規のオートファジー検出蛍光プローブの導入により、従来困難であったオートファジー活性と基底レベルのオートファジーダイナミクスの定量解析に成功した。これらの研究成果により、歯周病病態を模した様々な侵害ストレスが歯根膜のオートファジーに及ぼす影響が検証可能となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の研究成果は、最大のROS産生場となるダメージミトコンドリアを選択的に除去する、マイトファジーの歯根膜細胞における生理的役割に焦点をあて解析したものである。また、新規蛍光プローブを用いた標識やイメージング解析を行うことで、歯根膜細胞におけるマイトファジーの生体ダイナミクスの測定を行った。

これらの研究成果は、細胞機能に有害な過剰なROS産生を標的とする歯根膜マイトファジー制御に基づいた、歯周病の発症や進行を抑制する新たな治療薬の開発につながる基盤情報となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Human periodontal ligament cells (HPDL) showed accumulation of intracellular ROS accumulation under autophagy inhibition. A concomitant increase in abnormal morphology of mitochondria and an increase in mitochondria-derived ROS were observed. Analysis of mt-Keima HPDL revealed that mitophagy function is crucial for the regulation of ROS in periodontal ligament cells. Furthermore, by introducing a novel fluorescent autophagy detection probe, we have succeeded in the quantification of autophagy activity and basal-level autophagy dynamics, which have been difficult to obtain in the past. These studies will enable us to clarify the effects of various invasive stresses that mimic periodontal pathology on the autophagy of the periodontal ligament.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜 マイトファジー ミトコンドリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、真核細胞において脂質二重膜で構成されるオートファゴソームにより細胞内成分を包み込み、同成分をリソソームへ運搬し分解する大規模タンパク分解機構である。オートファジーは、細胞周囲を取り巻く環境が栄養飢餓に陥った状態で活発に誘導され、傷害を受けた細胞内小器官や不要なタンパク質などを分解することで細胞内を浄化し、アミノ酸や核酸として同分解産物をリサイクルすることで新陳代謝を担うことが明らかにされている。哺乳類細胞においては、オートファジーが細菌感染や外的ストレス刺激時に作動することで、細胞のみならず、臓器、個体レベルでの生体の環境適応システムとして機能し、オートファジーの機能低下が糖尿病や心筋梗塞、関節リウマチなどの加齢性の慢性疾患の病態に大きく影響を及ぼすことが提唱されている。近年、本来は非特異的な大規模分解機構であるオートファジーによる、ミトコンドリアなどの特定の細胞内小器官の選択的クリアランス機構(マイトファジー:ミトコンドリア+オートファジー)が注目されている。興味深いことに、パーキンソン病では、神経細胞におけるオートファジーの機能低下がダメージミトコンドリアの蓄積を惹起し、過剰な ROS の産生を介して病態発症の一因となることが報告されている。

申請者は初代培養ヒト歯根膜細胞においても、アミノ酸が枯渇した栄養飢餓状態でオートファジーが誘導されること(日本歯周病学会, 2014, 岐阜) さらにオートファジー抑制下では異常形態を示すミトコンドリアが増加すること(日本歯科保存学会, 2014, 滋賀)を、透過型電子顕微鏡を用いた形態学的解析にて発見し、世界に先駆けて報告した。歯根膜は歯周組織において咬合圧などのメカニカルストレスを緩衝するのみならず、多様な侵害刺激を遮断する生体バリアーとしての生理的役割を担っている。そこで、口腔内細菌や唾液の pH 変化、O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> 変化などの環境ストレスにより傷害された、ダメージミトコンドリアの産生する ROS 等の酸化ストレス回避に適応した細胞自律のシステムとして、歯根膜オートファジーが歯周組織、特に歯根膜の恒常性維持に重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

歯周病との相関が、疫学レベルのみならず分子レベルでの証明がなされている糖尿病や心筋梗塞などの慢性疾患においては、オートファジー機能低下の発症機序への関与が提唱されている。また、老化細胞においてはオートファジー活性が低く、代謝能の低下が報告されており、これは高齢患者の歯周組織において、細菌感染やメカニカルストレスなどの環境ストレスへの適応力の低下要因であることを示唆するものである。これまでに、オートファジーが口腔細菌の上皮細胞への侵入排除に関与することは報告されているが、歯周病の病態形成や歯周組織の恒常性維持に果たすオートファジーの役割について、未だ詳細な検討はなされていない。

本研究においては、歯根膜細胞における生理的役割を ROS 産生の場合となるダメージミトコンドリアの選択的除去に重要なマイトファジーに焦点をあて解析する。また、ダメージミトコンドリアを新規蛍光プローブにて標識し、共焦点イメージング解析することで、歯根膜細胞におけるマイトファジーダイナミクスの解明に挑む。その研究成果は、細胞機能に有害な過剰な ROS 産生を標的とする歯根膜マイトファジー制御に基づいた、歯周病の発症や進行を抑制する新たな治療薬の開発に有用な基盤として重要と考えられる。

### 3. 研究の方法

マイトファジーによるダメージミトコンドリアの細胞内クリアランスが歯根膜細胞の酸化ストレス応答に果たす役割を *in vitro* 細胞イメージングで解析し、オートファジーのヒト歯根膜細胞における生理的役割を検討した。

また、新規のオートファジー活性検出蛍光プローブを用いた解析により、従来困難であった基底レベルのオートファジーを評価し、歯根膜細胞におけるマクロオートファジーの生体ダイナミクスと酸化ストレス応答に焦点を当て歯周病病態に及ぼす影響を検証した。

#### (1) ヒト歯根膜のオートファジーが ROS 代謝に及ぼす影響の解析

ヒト歯根膜細胞の定常状態の ROS 代謝量を解析する為に、オートファジー誘導剤(ラバマイシン)あるいは阻害剤(E-64d とペプスタチン A) 処理下での細胞内 ROS 蓄積量の変動を検討した。ROS の検出には CellROX Orange (Life Tech.) を添加し、共焦点顕微鏡(SP8、ライカ)を用いてイメージング解析するとともに、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて経時的な定量解析を行った。

細胞内 ROS 蓄積のメカニズムを検討するため、細胞内の最大の ROS 生成の場であるミトコンドリアに着目し、解析を行った。具体的には、オートファジー阻害によるミトコンドリアへの影響を検討するため、MitoTracker (Life Tech.) でミトコンドリアを染色し、GFP-LC3 でオートリソソームを標識し、その細胞内局在を共焦点顕微鏡を用いて解析した。さらに透過型電子顕微鏡を用いて、二重膜に被覆されたミトコンドリア微細構造物を探索し、オートファゴソームにトラップされたとミトコンドリアの検討を行った。また MitoSOX Red (Life Tech.) を用いて、

ミトコンドリア由来 ROS を特異的に検出し、細胞内 ROS の発生源を検証した。

2種類の蛍光プローブ GFP-LC3-RFP-LC3 G を用いて LC3-GFP / RFP-LC3 G の蛍光比を得ることで、従来困難であったオートファジー活性の定量化と、一細胞中の基底レベルのオートファジーの評価を行った。

#### (2) ヒト歯根膜細胞におけるマイトファジーの解析

過剰な ROS 生成の場となるダメージミトコンドリアの排除機構としてマイトファジーに注目し、その分解、排除の生体ダイナミクスを検討した。測定に際し、pH により蛍光特性が変化し、リソソーム内でも分解されないサンゴ由来の蛍光タンパク Keima にミトコンドリア局在配列を連結した mt-Keima をヒト歯根膜細胞に導入し、安定発現株を樹立、計測に用いた。

また、パーキンソン病の原因遺伝子の一つであり、ダメージミトコンドリアの膜に結合する PARKIN 遺伝子を導入し、歯根膜マイトファジーに及ぼす影響を検討した。

#### (3) マウス歯周炎モデルを用いた *in vivo* 歯周組織の病理観察

生体での歯周組織マイトファジーの役割を検討する為に、マウスの歯周炎モデルにおいて、歯周組織における ROS、ミトコンドリアの動態を検討した。老齢野生型マウス (C57/BL6) の歯周組織に絹糸を結紮することでマウス歯周炎モデルを構築した。顎骨の  $\mu$ CT 計測後に歯周組織切片を作製し、HE 染色ならびに免疫組織学的検証を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1)

オートファジー阻害剤である E-64d とペプスタチン A の添加により HPDL の細胞内 ROS 量の著明な増加を認めた。オートファジー誘導剤であるラパマイシンの添加では ROS 量の有意な変化を認めなかった。マイクロプレートリーダーを用いた定量解析においても、E-64d とペプスタチン A 添加下では、Control 群と比較し有意な ROS 量の増加が認められた。

E-64d とペプスタチン A ならびに 3-メチルアデニン添加によるオートファジーの阻害下では、MitoTracker で染色されたミトコンドリアの一部は、Control 群には認められないような膨張した球状の染色像を示した。透過型電子顕微鏡を用いて微細な形態を詳細に検討した結果、E-64d とペプスタチン A を添加し培養した HPDL では、Control と比し、不規則なクリステ構造を呈する膨化ミトコンドリアが多数存在していることが認められた。さらに、オートファジー阻害下ではミトコンドリア ROS 量の有意な増加がマイクロプレートリーダーを用いた定量解析により認められた。

GFP-LC3-RFP-LC3 G の導入では、変異 GFP-LC3/LC3 G を発現した歯根膜細胞が多く生じたことより、-LC3 G をコードしない GFP-LC3-RFP を導入し、その GFP/RFP 比を計測することで基底レベルのオートファジーの評価を行った。その結果、複製老化を誘導した歯根膜細胞や、IL-1 $\beta$  刺激下の歯根膜細胞ではオートファジーの低下が確認された。

#### (2)

mt-Keima 発現歯根膜細胞は、脱共役剤である CCCP 処理によるミトコンドリア障害に際して、色調変化を示し、障害ミトコンドリアのライソゾームにおける分解の検出系として有用であることが確認された。その実験結果は、JC-1 (Life Tech.) 処理によるミトコンドリアの脱分極状態の観察結果と一致するものであった。また、障害ミトコンドリアの認識機構に関係する PARKIN の導入より、マイトファジーの部分的な賦活化が確認された。

#### (3)

老齢野生型マウス (C57/BL6) 顎骨の  $\mu$ CT 計測により、著明な歯槽骨の吸収と、ROS の蓄積、DNA ダメージの蓄積が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 M.Suzuki, M. Yamashita, K.Ikegami, T.Nakamura, A.Nishikawa, K. HASHIMOTO, K.MIKI, M.YANAGITA, M.KITAMURA, S.MURAKAMI
2. 発表標題 Dissection of the mitophagy dynamics in HPDL cells by fluorescent probe.
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木美麻、山下元三、池上久仁子、中村友美、西川有彩、橋本康樹、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 Role of mitophagy on excessive ROS production in senescent HPDL cells
3. 学会等名 2019年度春季日本歯科保存学会（第150回）
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