

令和 2 年 5 月 29 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：18K17064

研究課題名(和文) miR-34a-SATB2 axisによる歯根膜ステムセルエイジングの解析

研究課題名(英文) Analysis of stem-cell aging by targeting miR-34a-SATB2 axis

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は歯周組織の破壊を伴う慢性炎症性疾患であり、加齢に伴い罹患率が増加する。よって、細胞レベルでの老化すなわち「細胞老化」「幹細胞老化(ステムセルエイジング)」の関与が示唆される。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。我々はmiR-34aが老化歯根膜細胞に発現しており、SATB2(硬組織形成を促進する遺伝子)を標的遺伝子と見出した。本研究により、老化歯根膜細胞におけるmiR-34aによるSATB2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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜は、歯周組織の修復・再生にとり重要な組織である。老化歯根膜細胞においてはmiRNA-34の発現が増加し、その標的遺伝子であるSATB2(硬組織形成を促進する遺伝子)の発現は減少していたことから、miR-34aがSATB2を調節制御していることが示唆された。miR-34aを遺伝子導入した細胞株、SATB2を欠失させた細胞株において石灰化関連遺伝子の発現は減少しており、miR-34a-SATB2経路が歯根膜細胞の複製能・分化能に影響を及ぼすことが示唆されたことより、高齢者の歯周病の予防、再生治療の有効な治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a chronic inflammatory disease characterized by the destruction of periodontal tissue, and its prevalence increases with age. MicroRNAs (miRNAs) are stress-responsive small RNAs that have been reported to be involved in the regulation of senescence and lifespan in small animals, suggesting the involvement of cellular senescence and stem cell aging. We found that miR-34a is strongly expressed in senescent periodontal cells and targets SATB2 (a gene that promotes hard tissue formation). miR-34a-transfected cells and SATB2-knocked down cells showed decreased expression of calcification-related genes under the calcification-induced culture. This study demonstrates that regulation of SATB2 expression by miR-34a in senescent periodontal ligament cells is partly responsible for stem-cell aging, loss of stem-cellness, of the periodontal ligament cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 老化 歯根膜細胞 miR-34a SATB2 ステムセルエイジング

1. 研究開始当初の背景

超高齢化が急速に進行する日本においては、平均寿命の延長とともに、難治性の老化関連疾患の罹患率が急上昇し、社会的な課題となっている。申請者は、伊丹市における高齢者 2000 人の健康長寿研究(SONIC)の疫学調査を通じて、歯周病との関連が考えられている、糖尿病や心筋梗塞、関節リウマチ等の病態の相関係数が高齢者において顕著に増加することを経験した。このことから、各々の病気に特異的に対処するのではなく、加齢性の臓器機能障害に共通の基盤病態となる生物学的な‘老化’の解明が、老化関連疾患の克服には必要との着想に至った。

加齢に伴い機能不全に陥った各種の臓器において、細胞増殖の停止した老化細胞の蓄積が認められる。そして細胞レベルでの老化である「老化細胞」が生体の加齢に伴う臓器の機能低下の原因として、有力視されている。糖尿病や冠動脈疾患、関節リウマチなどの加齢性の慢性疾患においては、原因となる肝臓、血管、軟骨組織において臓器の老化が認められる。そしてその共通の病因として、老化細胞が臓器に蓄積し、炎症性サイトカイン、細胞外基質分解酵素、機能性 RNA 分子を含有するエクソソームを分泌することで慢性炎症や発ガンなどの病態形成に関与することが明らかとされている。

歯周病の発症と進行においても、加齢は重要なリスク因子の一つである。種々の生理学的・病的刺激を受ける口腔において、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様々な老化誘導ストレスに恒常的に暴露されている。そこで、申請者は“高齢者における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きた。新たに樹立した *in vitro* 老化誘導培養系を用いてヒト初代培養歯根膜細胞から誘導した老化歯根膜細胞が、細菌感染に非依存性に IL-6, IL-8, GRO, MMPs などの炎症性サイトカイン、ケモカインなどの老化関連分泌(Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP)タンパクを高産生する事を見だし、その研究成果を報告してきた(JADR-APR, 2013, Thai)。また、歯周組織幹細胞の加齢による機能低下と、ニッチェ様細胞の TGF- $\beta$  の産生を伴う炎症制御機構を見いだしている(JADR 2012, 2013)。これら一連の研究成果は、高齢者の歯周組織に老化細胞が存在すること、さらには歯周病重篤化の病因論として、老化性の慢性炎症と幹細胞の枯渇が関与していることを強く示唆するものである。

歯根膜細胞は、細胞外基質タンパクを産生することで弾性組織としての歯根膜の生理的特性を担うのみならず、骨芽細胞、セメント芽細胞へと分化することで、硬組織代謝を担う、多能性組織幹細胞亜集団を含有する。加齢により、破壊された口腔組織の機能回復には、組織再生もしくは老化制御のアプローチが考えられる。しかしながら、申請者らが臨床研究に携わったリグロス(FGF-2)製剤を用いても歯周組織再生が困難である高齢者の症例を経験したことから、歯根膜幹細胞能枯渇の分子メカニズムの解明が必要であるとの考えに至った。そこで、老化歯周組織に特徴的な組織修復・再生能の低下や治癒遷延化の原因の一つと予測される歯根膜における細胞老化の分子機構を明らかにすることを目指して、慢性疾患や癌などの病態と個体の発生を制御する microRNAs (miRNAs) に着目した。申請者が、老化歯根膜における miR-34a の標的遺伝子として新たに同定した SATB2 は頭蓋顔面形成異常の原因遺伝子であり、骨芽細胞への分化を調節制御する DNA 結合タンパクであったことから、miR-34a が幹細胞の自己細胞分裂能と硬組織細胞への分化制御を介して、歯根膜の幹細胞性維持に極めて重要な役割を担うと予測している。そこで今回申請者は、歯根膜ステムセルエイジングの全容解明には、加齢に伴い発現が上昇するガン抑制遺伝子 p53 により誘導される miR-34-SATB2 の分子制御機構の解明が必要である、との問いを得た。得られた研究成果は、高齢者の歯周病の予防・診断法のみならず、早老症

の一面を有する侵襲性歯周炎の理解や重篤な歯周病の幹細胞老化阻害を標的とする新規歯周組織再生療法開発への応用が期待される。microRNA は、生体内在性の安定二本鎖 RNA であることから、核酸医薬品としての開発に対する技術的なハードルは低く、全身投与により、歯周病のみならず、臓器の老化を基盤病態とする全身疾患の老化関連疾患治療薬への応用が期待される。

## 2 . 研究の目的

本研究では、老化歯周組織の再生・修復治癒能力低下の原因を明らかにするため、歯周組織再生の中心となる歯根膜の老化性の幹細胞能の破綻とステムセルエイジングの分子機構の解明を目指す。歯周組織再生療法の開発において、修復組織における組織幹細胞の賦活化や数の増大を目標としてきたが、歯周組織欠損部における組織幹細胞の増殖・分化能低下の分子機構についての検討はほぼ皆無である。よって、細胞老化—ストレス応答性機能性 RNA 分子-幹細胞制御因子の細胞内分子ネットワーク ( p53/miR-34a-SATB2 経路 ) の解析を軸として、歯根膜ステムセルエイジングの全容解明を目指すことを目的とした。

## 3 . 研究の方法

本研究課題では、老化歯根膜細胞において発現亢進する microRNA-34a と、その標的遺伝子 SATB2 ( 硬組織形成を促進する遺伝子 ) の経路に焦点をあて、歯周組織の再生の中心となる歯根膜における細胞老化の分子機構を解明する。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-SATB2 によるヒト歯根膜幹細胞維持機構の解明

口腔細菌感染などの老化誘導ストレスによる miR-34a-SATB2 制御機構の解明

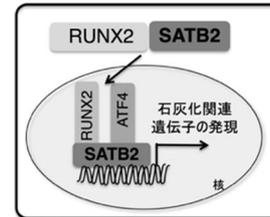
老齢の実験的歯周炎動物モデルにおける miR-34a-SATB2 制御機構の *in vivo* 解析

## 4 . 研究成果

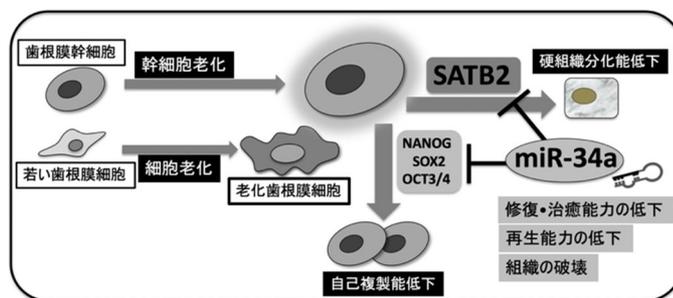
平成 30 年度は、老化歯根膜細胞において発現亢進する microRNA-34a とその標的遺伝子 SATB2 の幹細胞性の制御機構をヒト歯根膜細胞の *in vitro* 複製老化過程において検討した。初代ヒト歯根膜細胞の複製老化の誘導により、異なるラインの老化歯根膜細胞を得た。これら全てのラインにおいて、幹細胞の表面抗原マーカーの一つである SSEA3 を用いた FCM 解析にて幹細胞の割合を比較、検討したところ、継代を経た老化 HPDLs においては、SSEA3 陽性細胞の割合は著明に減少することを見出した。また、これら全てのラインにおいて、老化 HPDL における miR-34a の発現亢進と SATB2 の発現低下を遺伝子、タンパクレベルで確認した。興味深いことに、miR-34a の発現亢進は、細胞増殖停止の前より認められた。

実際に、mimic miR-34a ( hsa-miR-34a の RNA 配列を模倣した人工合成 oligos ) あるいは inhibitor miR-34a を遺伝子導入し検討を行なった。mimic miR-34a を導入した継代数の小さい歯根膜細胞は、導入していない細胞と比較し、大きく広がる老化細胞様の形態を示した。mimic miR-34a、inhibitor miR-34a を遺伝子導入し SATB2 の発現量のモニタリングを行った結果、mimic miR-34a を導入した歯根膜細胞では SATB2 のタンパク発現が低下していたことから、老

化歯根膜細胞においては miR-34a が SATB2 を調節制御し、細胞分裂に関与していることが示唆された。また、正常歯根膜細胞に mimic miR-34a を導入後に、5 日間硬組織分化誘導培養を行い、ALPase 活性、石灰化関連遺伝子の発現を検討した。導入群では ALPase 活性の低下、並びに Runx2、I 型 collagen、ALPase 遺伝子の発現低下を認めた。miR-34a の標的遺伝子は、SATB2 以外にも存在する事から、CRISPR/Cas9 システムにて、SATB2 を欠失させた歯根膜細胞において同様に 5 日間の硬組織誘導培養を行った。SATB2 ノックダウン細胞株では、Runx2 の遺伝子発現は低下していたことから、miR-34a-SATB2 経路が歯根膜細胞の分化能に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。



平成 31 年は、前年度に引き続き、miR-34a-SATB2 によるヒト歯根膜幹細胞維持機構の解析を継続した。CRISPR/Cas9 システムにて、SATB2 を欠失させた歯根膜細胞の細胞形態を詳細に観察したところ、Western Blotting にて SATB2 の欠失が明確であった細胞は、大きく広がる老化細胞様の形態を示すことが明らかとなった。miR-34a は細胞周期制御タンパクを標的とし、幹細胞の増殖にも影響を及ぼすことが報告されている。そこで、歯根膜細胞に mimic miR-34a を遺伝子導入し、G1/S 期において細胞周期を制御するタンパクである CDK2,CDK4 の発現を検討した結果、その発現は減少することが明らかとなった。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。このことより、miR-34a は SATB2 を介して幹細胞の分化を抑制するのみならず、細胞分裂を制御し、ステムセルエイジングに影響を及ぼす可能性が示唆された。



次に、高週齢マウスを用いた実験により、*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)細菌非感染性に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を行った。実際に、高週齢マウスは若齢マウスと比較し、micro CT を用いた解析により歯槽骨吸収が進行していること、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- $\alpha$ -GAL が上昇していることを確認した。次にマウスの第二臼歯に絹糸を結紮することで咬合性外傷モデルを構築し、micro CT を用いて歯槽骨の吸収を計測すると、高週齢マウスは若いマウスと比較し、有意な歯槽骨骨吸収を認めた。現在、小分子 RNA である miRNAs 検出が可能な新規 *in situ* hybridization 法に用いる miR-34a の高感度プローブを設計し、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

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Mio Suzuki, Kouki Hashimoto, Tomomi Nakamura, Koji Miki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami.
2. 発表標題 MiR-34a Regulates Stem Cell Aging in Periodontal Ligament Stem Cells.
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motozo Yamashita, Mio Suzuki, Kuniko Ikegami, Tomomi Nakamura, Arisa Nishikawa, Kouki Hashimoto, Tatsuya Morikawa, Koji Miki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami.
2. 発表標題 Analysis of Mitophagy in Senescent HPDL Cell.
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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 老化ヒト歯根膜細胞における活性酸素産生に及ぼすミトファジーの役割
3. 学会等名 2019年度日本歯科保存学会春季学術大会 (第150回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辰己真理, 柳田 学, 長谷川詩織, 鈴木美麻, 池上久仁子, 山下元三, 北村正博, 村上伸也
2. 発表標題 タバコ煙の長期曝露が歯肉線維芽細胞の細胞機能に及ぼす影響
3. 学会等名 2019年度日本歯科保存学会春季学術大会 (第150回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Mio Suzuki, Arisa Nishikawa, Tomomi Nakamura, Koji Miki, Jirouta Kitagaki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami
2. 発表標題 Senescence-associated miR-34a accelerates periodontal stem-cell aging by targeting SATB2
3. 学会等名 American Academy of Periodontology (AAP) 104th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motozo Yamashita, Mio Suzuki, Kuniko Ikegami, Tomomi Nakamura, Arisa Nishikawa, Koji Miki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Optical dissection of the mitophagy dynamics in HPDL cells.
3. 学会等名 American Academy of Periodontology (AAP) 104th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Mio Suzuki, Arisa Nishikawa, Tomomi Nakamura, Koji Miki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami
2. 発表標題 Senescence-associated miR-34a suppress osteoblastic differentiation in periodontal stem cell.
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mari Tatsumi, Manabu Yanagita, Shiori Hasegawa, Mio Suzuki, Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Effects of long-term exposure of cigarette smoke on gingival fibroblasts
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mio Suzuki, Motozo Yamashita, Kuniko Ikegami, Tomomi Nakamura, Arisa Nishikawa, Kouki Hashimoto, Koji Miki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Dissection of the mitophagy dynamics in HPDL cells by fluorescent probe.
3. 学会等名 第66回国際歯科学研究学会日本部会総会・学術大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下元三、鈴木美麻、池上久仁子、西川有梨沙、橋本康樹、柳田学、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 老化歯根膜細胞におけるマイトファジーの機能解析
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----