

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390371

研究課題名（和文） オートファジーの薬学的操作による口腔粘膜前駆/幹細胞の抗老化・維持システムの確立

研究課題名（英文） Development of an anti-aging protocol and maintaining undifferentiated state of oral mucosa keratinocyte progenitor/stem cells by pharmacological manipulation of autophagy

研究代表者

泉 健次（IZUMI KENJI）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80242436

研究成果の概要（和文）：

TASCC は、粗面小胞体とゴルジ体、オートリソソーム、mTOR の空間的な統合によるタンパク質の分解と合成という急速な代謝回転が行われている領域で、分泌タンパク質の効率的な生合成に有効である。本研究の結果から、ヒト培養口腔粘膜上皮細胞においても TASCC 領域が存在することが確認された。さらに、細胞分裂能を失った成熟・分化した口腔粘膜上皮細胞が産生する Maspin や IL-6 は、TASCC の機能によって合成、分泌されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The TOR-autophagy spatial coupling compartment (TASCC) represents for the intracytoplasmic region where protein degradation and synthesis occur in unison to handle rapid protein turnover by integration of rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, (auto)lysosomes and mTOR, which is beneficial to cells to efficiently produce secretory proteins. In this study, we found the TASCC in primary cultured human oral keratinocytes. In addition, our results suggested Maspin and IL-6 produced by oral keratinocytes were synthesized and secreted through TASCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：再生歯学

キーワード：

オートファジー、mTOR、ラパマイシン、口腔粘膜上皮、前駆/幹細胞、ウェスタンブロットティング

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは自食作用とも呼ばれ、栄養不足や不要な蛋白質が蓄積した時に、不要な自己蛋白質を特殊な細胞膜で包み込み、

分解することで、細胞生存に不可欠な蛋白質やアミノ酸を効率よくリサイクルするシステムである。飢餓や細胞ストレスで起こる誘発性オートファジーの他に、恒常的な細胞内

新陳代謝、異常蛋白質排除による細胞内浄化を行う定常的オートファジーも知られており、定常的オートファジーが健康維持に重要で、発生や分化、老化等の生命現象、また癌や神経変性疾患の発症にも密接に関連していることが明らかになってきている。オートファジーの制御に関わる主要な調節因子として知られる mTOR (mammalian Target of rapamycin) は、その活性が発癌や免疫の調節深く関与する蛋白質リン酸化酵素で、通常オートファジーの誘導を抑制しているが、mTOR 蛋白質 (酵素) の特異的抑制剤である rapamycin によってその活性が抑制されると、酵母をはじめ多様な哺乳類細胞においてオートファジーが誘導される。興味深いことに、高齢正常マウスに rapamycin を与えると、その寿命が有意に延長することが証明され (Harrison, 2009)、その効果は発癌抑制のみならず、mTOR の活性が高等生物の個体寿命の調節にも深く関与している事を示唆し、大きな注目を集めている。

本申請者は、培養環境下における口腔粘膜細胞のサイズに注目し、口腔粘膜の前駆/幹細胞の集団は小型であることを報告した (Izumi et al., 2007)。しかし、培養を維持すると通常細胞は大型化し、前駆/幹細胞を含む小型細胞数は有意に減少し、枯渇した。しかし rapamycin を投与された細胞では、小型細胞数の減少は起こらず、長期間、増殖・生存し続ける結果を得た。これらは、培養口腔粘膜細胞の mTOR の活性を抑制する事がその過分化を阻害し、前駆/幹細胞の機能を維持させるのに重要であることが考えられた。その生化学及び生物学的機序として、最近のオートファジー/rapamycin に関する知見から、rapamycin による培養口腔粘膜の長期生存効果は定常的オートファジーが適度に制御されたことによることが推測される。すなわち前駆/幹細胞集団では、定常的オートファジーな厳密な制御により細胞の老化を防いでいることが想像される。さらに、ダメージを受けたミトコンドリアを選択的に自己分解するミトファジーというオートファジーの

1種も存在することが証明された。ミトコンドリアは細胞にエネルギー供給を行うと同時に、老化の原因と考えられている活性酸素も産生する。すなわちミトファジーは活性酸素の減少によって前駆/幹細胞維持に貢献していることが考えられる (Yogendra, 2009, Mizushima, 2004)。予備実験では、哺乳類オートファジーの活性マーカーである切断型 LC3 が、rapamycin を投与した培養粘膜上皮細胞ではサイズに関係なく発現するも、通常培養下ではわずかであった。また、ヒト歯肉上皮では、表層に行くにつれ発現は強まるが、基底層レベルでもごく少数の細胞で発現していた。この所見は、定常的オートファジーレベルは薬学的に制御可能であるが、生体内では個々の細胞で異なっており、細胞の分化度と運命を決定している要因であることを強く示唆している。

2. 研究の目的

遺伝子改変動物を用いずに、(1) rapamycin による長期生存効果に基づいて、オートファジーマーカーを用いた定常的オートファジー発現機構とレベルの解明を行い、(2) アゴニストとアンタゴニスト作用によってオートファジーレベルと細胞の分化度の連関を検討、(3) 培養下と in vivo 環境における口腔粘膜上皮細胞に本来備わったオートファジーレベルの解析と比較、(4) 低濃度 rapamycin 投与によって定常的オートファジーレベルを操作し、健全な上皮の再生分化能を保有した未分化な培養口腔粘膜細胞を長期間生存、維持可能な培養環境を構築することを目的としていたが、ベースラインのオートファジーレベルの解析でつまづき、その点から先に予定していた実験が困難となった。

研究協力者の猪木博士の示唆により方針を変更し、オートファジーに関連して、TASCC という細胞質内の領域に注目した。TASCC は発達したオートリソソームとゴルジがつくるコンパートメントで、多くの mTOR がコンパートメント内に集積し、オートファジーにより分解、生成された新規アミノ酸が mTOR

の活性を高め、新たなタンパク質の合成を促す重要な場と考えられている。分化した培養口腔粘膜上皮細胞においても、タンパク合成亢進を誘導するメカニズムとして TASC 領域が存在し、Maspin や IL6 といった分化した上皮細胞が産生する分泌タンパク合成に関与しているかどうか検討した。この生物学的現象の存在が証明されれば、再生医療に用いられる、細胞・組織“製品”の出荷前基準として利用可能である。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養 本学医歯学総合病院臨床応用プロトコルに準じ、ヒト初代口腔粘膜上皮細胞を EpiLife 無血清培地を用いて連続培養した。カルシウム濃度は 0.06mM とし、目的に応じて細胞培養 Dish または Chamber スライドで培養、継代 7 代目 (P7) 以降の細胞を主に使用した。

(2) 老化細胞における

β -galactosidase 活性の検出 検出キット (9860; Cell Signaling) を用いて行った。

(3) 免疫蛍光/免疫細胞化学 培養口腔粘膜上皮細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定後、0.3%Triton X-100 で 10 分間浸透処理し、正常血清でブロッキングを行い、1 次抗体を 4 度で一晩インキュベートさせた。翌日、蛍光色素標識 2 次抗体を室温で 1 時間インキュベートし、PBS で洗浄した後、再度ブロッキングと 1 次抗体のインキュベートを行った。翌々日、別の蛍光色素標識 2 次抗体を室温で 1 時間インキュベート後、DAPI 入りのベクタシールドをマウントし、カバーガラスをかけて写真撮影した。Alexa488 あるいは Alexa594 で標識された、マウスあるいはウサギ IgG (Life Technologies) を 2 次抗体として使用した。使用した 1 次抗体は右表を参照。

(4) 微細構造学的観察 2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定後、四酸化オスミウム で後固定、エポン 812 に包埋し、超薄切片を作成、透過型電子顕微鏡 JEM-1400 で観察した。

(5) 免疫組織化学 4%パラホルムアル

デヒド溶液で固定し、4.5 μ m の厚さのパラフィン 包埋したヒト口腔粘膜組織の切片で、Maspin と IL-6 の発現パターンを観察した。脱パラ後、内因性ペルオキシダーゼ ブロックを行い、ヤギ正常血清でブロッキング、1 次抗体を 4 度で一晩インキュベートし、翌日 Envision+Kit (Dako) を用いて DAB 発色した。

(6) ELISA assay 培養上清中の Maspin (ELISA kit for Maspin, USCN life Science) と IL-6 (Quantikine ELISA human IL-6, R&D) 量を市販のキットを使用し、マイクロプレートリーダー (BioRad Model 680) で測定した。

4. 研究成果

(1) Senescence β -Galactosidase Activity 一般に、培養口腔粘膜上皮細胞でも継代が進むにつれ、小型の増殖能を保つ細胞に混じって、大型の分化した細胞の出現頻度が高くなる。大型の細胞に限り細胞老化関連 β ガラクトシダーゼ (青色部分) (老化マーカー分子) の発現を認めた。

(2) TASC とタンパク質分泌装置との位置関係 TASC は、細胞がタンパク質合成とオートファジーによるタンパク質分解とを同時に活性化する領域である。大型の分化した細胞では細胞質に p62 と LC3 の集積した明瞭な境界をもつ領域が観察された。このオートファジー領域は核の近傍にあったり、離れて局在することもあったが、リソソームタンパク質 LAMP2 と共局在した。これはオートリソソームの集積していることを示唆していた。次に、mTOR の局在を調べたところ、mTOR は増殖能の高い小型の細胞では細胞質に広く分布して顆粒あるいは粒状に染色されるが、分化した細胞ではさきのオートファジー領域への集積がみられた。さらに、この mTOR の集積領域にはゴルジ体も発達していた。以上から、分化した培養口腔粘膜上皮細胞内には TASC の特徴と一致する陽性像が認められ、その存在が示唆された。

(3) TASC 領域の電子顕微鏡的観察 蛍光二重染色を用いた免疫細胞化学所見をさら

に裏付けるために、透過電顕で細胞を観察したところ、それに一致した所見が以下のように得られた。分化した細胞でみられた TASC と思われるオートファジー小胞の豊富な領域。オートリソソームとオートファジー小胞の拡大像。さらに、このオートファジー小胞の集積領域にはゴルジ体や粗面小胞体が認められた。

(4) 正常ヒト口腔粘膜における Maspin と IL-6 発現 *In vivo* の組織において、いずれのタンパク質も、分裂能を失いつつある、あるいは失った分化した上基底層細胞でのみ発現を認めることから、十分に重層化が進み、分化して成熟した上皮細胞のマーカーと考えられた。

(5) 培養口腔粘膜細胞の Maspin と IL-6 分泌能 口腔粘膜の機能から考えると、移植材に成熟した上皮が形成されていることは肝要である。このタンパク質がマーカーとして患者移植用の培養口腔粘膜の“製品”出荷基準に適用されるためには、培養上清中にいずれのタンパクも分泌されなければならない。市販の ELISA キットを用いて、培養上清に含まれるタンパク量を測定したところ、分化した細胞群の方が若い細胞群より多くのタンパク質を分泌している傾向があることが分かった。

(6) Maspin および IL-6 と mTOR の共局在 分化した細胞で認められる TASC 領域において合成されるタンパク質として、上皮細胞分化関連分泌タンパク質である Maspin や IL-6 の産生が TASC の近傍で亢進している可能性を示すために、mTOR との局在を調べたところ、大型の細胞での共存が認められ、ELISA 法の結果を形態学的に裏付けることができた。

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 1 件)

Izumi K, Marcelo CL, Feinberg SE, *Methods Mol Biol.* 2013;989:293-303. Enrichment of oral mucosa and skin keratinocyte progenitor/stem cells. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

泉 健次, 加藤寛子, 大貫尚志, 齋藤太郎, 塩見 晶, 上野山敦士, 寺田典子, 河野芳朗, 野澤-井上佳世子, 前田健康: 培養口腔粘膜上皮細胞における細胞分化と TASC に関する検討. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013. 3. 28-30, 講演プログラム・抄録集: 144, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 健次 (IZUMI KENJI)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 8 0 2 4 2 4 3 6

(2) 研究分担者

前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 4 0 1 8 3 9 4 1

寺田 典子 (TERADA MICHIKO)
新潟大学・医歯学系・特任助教
研究者番号: 6 0 3 7 4 5 5 0