

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659976

研究課題名（和文） 細胞内大規模蛋白分解機構による歯周組織老化の制御

研究課題名（英文） Defective autophagy in aged periodontal tissue

研究代表者

山下 元三 (YAMASHITA MOTOZO)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90524984

研究成果の概要（和文）：本研究において、歯周組織におけるオートファジー（蛋白大規模分解）の役割について検討した。歯根膜細胞は、歯周組織の恒常性維持、創傷治癒並びに再生の中心となる細胞と考えられている。歯根膜細胞においては、栄養飢餓や増殖因子刺激、酸化ストレスなどの環境ストレスに暴露した際に、オートファジーが自律的に機能し、ECM 産生やストレス応答を調節することで細胞老化を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the roles of autophagy in periodontal tissue. Periodontal ligament (PDL) cells are crucial for balancing the homeostasis, wound healing and tissue regeneration in periodontal tissue. We found that autophagy actively regulated the synthesis of ECM protein and stress response in PDL cells against various environmental stress. We also found that autophagy was defective in aged PDL cells those were exposed to senescence inducing stimulus, such as nutrient starvation, inflammatory cytokines and oxidative stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：細胞内大規模蛋白分解

1. 研究開始当初の背景

成人の歯周組織は、栄養過多（メタボリック）、成長因子刺激のアンバランス、細菌感染、外傷性咬合などの様々な環境ストレスに常時暴露される可能性があり、その結果として、歯根膜細胞に種々のダメージが蓄積されることで老化が進行する。近年加齢にともなうストレスにより細胞内には異常細胞器や異常蛋白質が蓄積することで、恒常性維持能や組織修復再生能が低下し老化が進行するとの考え方が注目されている。そのような細胞内ダメージの除去に重要な役割を担うのが細胞内大規模蛋白分解機構-オートファジーである。本研究では歯周組織構成細胞、

とりわけ歯根膜細胞の増殖・分化および老化の過程での「歯根膜オートファジー」が担う

生理学的役割を明らかにすることを考えた。歯周組織の老化のメカニズムを歯根膜幹細胞に着目した本研究は世界的にみても類を見ない。歯根膜オートファジーの生理的な意義を明らかにする本研究は、歯根膜幹細胞の生命維持、老化、増殖・分化機構の未だ明らかとなっていない制御機構への解明へとつながる。

2. 研究の目的

成人の歯周組織は、栄養過多（メタボリック）、成長因子刺激のアンバランス、細菌感染、外傷性咬合などの様々な環境ストレスに常時暴露される可能性があり、その結果として、歯根膜細胞に種々のダメージが蓄積されることで老化が進行し、恒常性維持能や組織修復再生能が加齢とともに低下しているものと想定される。そこでこの歯根膜細胞の老化制御機構を分子レベルで解明する為に、上述の細胞内大規模蛋白分解の概念を導入し、“歯根膜オートファジー”が歯根膜幹細胞の老化や増殖・分化過程で担う生理的役割を明らかにする。研究成果により、オートファジー制御に基づいた、歯周組織のみならず口腔全体の老化制御法への展開や、細胞移植を伴う次世代型歯周組織再生誘導療法において高機能の組織幹細胞の増大技術開発の為の基盤情報を構築する。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織を構成する細胞、とりわけ歯根膜組織中には歯根膜、歯槽骨、セメント質の修復再生を可能ならしめる間葉系幹細胞が存在しており、歯周組織の恒常性維持にとり重要であることから、ヒト初代培養歯根膜細胞株（HPDL）を実験に供し、その細胞機能に与えるオートファジーの役割を検討した。①栄養飢餓状態として、血清飢餓状態での細胞培養、栄養過多状態として、高グルコース含有培地での細胞培養②インスリンや FGF, TGF-beta, BMP などの細胞増殖・分化因子存在、非存在下での細胞培養③酸化ストレスとして H₂O₂ 或は NO_x 誘導剤添加下での細胞培養を行い、経時的なオートファゴソーム（の動態を評価することで細胞内オートファジーをモニタリングした。評価方法としては、電子顕微鏡を用いた形態学的な観察により脂質二重膜であるオートファゴソームの数の定量化解析や形態学的観察並びに、オートファゴソームのマーカー LC3 に対する抗体を用いた免疫細胞染色、Western blot 法による生化学的な解析で LC3-I/LC-3II アイソフォームの比率を検討した。細胞内小胞形成がオートファゴソームであるか否かを検討する為に、実績のある、オートファジー誘導剤ラパマイシン並びにオートファゴソーム形成の阻害剤である 3-MA、CQ で処理した際に誘導される小胞形成を電子顕微鏡を用いた形態学的な観察並びに生化学的解析をおこなった。

(2) オートファジーの機能制御が歯根膜細胞の増殖・分化並びに老化に与える影響を検討した。オートファジー誘導剤ラパマイシン

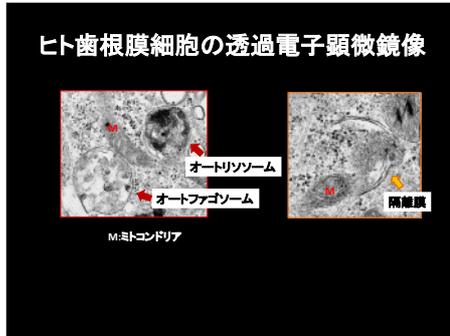
並びにオートファゴソーム形成の阻害剤である 3-MA、CQ を添加し、細胞増殖能、細胞老化、栄養代謝能、石灰化能についてその影響を検討した。評価方法として、細胞増殖能はトリパンブルー染色或は BrdU 取り込み試験、増殖能や細胞老化、細胞死を規定する細胞周期の解析は PI ラベルを利用した FACS による解析により行った。細胞老化時における異常な細胞内蛋白質蓄積の指標として細胞内の蛋白質含有量を FACS にて解析するとともに、オートリソソーム内の分解過程にある異常な細胞内小器官をユビキチンに対する免疫細胞染色或は電子顕微鏡を用いた形態観察により検討した。ECM 産生については、アスコルビン酸の添加下長期培養することで石灰化誘導を行い、ALP 活性やアリザリン染色による石灰化物形成の定量解析を行なった。その際に経時的な石灰化関連遺伝子群の発現を real-Time PCR による mRNA 定量で比較検討した。オートファジー阻害剤、3-MA、CQ には非特異的な薬理作用が予測されるため、上述の結果はオートファジー誘導に必要な遺伝子である ATG5 遺伝子をノックダウンした shATG5 細胞株を上述の実験系で用いることで検討した。

(3) オートファジーが歯周組織の組織老化に及ぼす影響を C57BL6 マウスに絹糸を結紮し歯周病（外傷性咬合）病態を誘導したマウスの歯周組織の形態学的或は分子生物学的解析により *in vivo* レベルで検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯根膜細胞（HPDL）を用いた *in vitro* オートファジー実験系の樹立-HPDL においては、栄養飢餓や増殖因子刺激に暴露された際に、隔離膜やオートリソソーム、オートファゴソームが活発に形成されていることが、透過型電子顕微鏡像により観察された。GFP-LC3 と LysoTracker により細胞標識した細胞を、共焦点顕微鏡にて観察し、これらの膜動態の変化が経時的変化を伴うことを確認した。Western blot 法による生化学的な解析で LC3-I/LC-3-II アイソフォームの比率が形態学的な変化と連動していることも確認された。ATG1~12, Beclin, P62/SQSTM1 などの一連のオートファジー誘導メカニズムに必要なとされる遺伝子群が発現していることも確認された。HPDL においては、至適濃度の mTOR 阻害剤ラパマイシン処理、オートファゴソーム形成の阻害剤である 3-MA, CQ, E64d, Pepstatin 処理並びに、ATG5 の shRNA による遺伝子ノックダウンによりオートファジーの調節制御は可能であった。ヒ

ト歯根膜細胞を用いた *in vitro* オートファジー実験系が樹立されたことにより、HPDL 細胞内オートファジーが歯周組織構成細胞の恒常性維持を担っていることが明らかとなった。



(2) オートファジーの機能制御が歯根膜細胞の増殖・分化並びに老化に与える影響-

① 前述の Rapamycin, 3-MA, CQ, E64d, Pepstatin を添加し、細胞増殖能に与える影響を検討した。オートファジー促進作用のある Rapamycin の添加は細胞増殖能を抑制し、また、阻害剤である 3-MA, CQ, E64d+Pepstatin 処理は細胞増殖を濃度依存的に強く抑制した。しかしながら、これらの作用は、mTOR 活性化さようのあるインスリンや FGF, TGF-beta の作用と相反するものであった。これより HPDL においては、Insulin/IGF/FGF-AKT -mTOR の下流でオートファジーは細胞増殖能に影響することが示唆された。

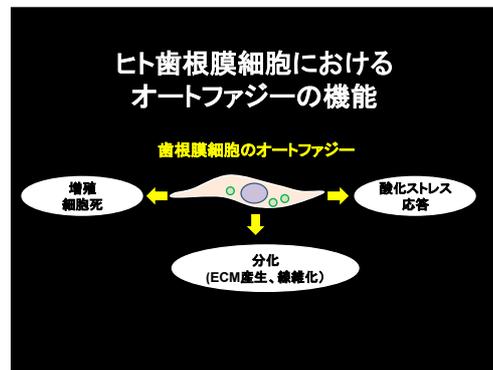
② HPDL の石灰化長期培養においては Rapamycin 添加により、歯根膜の産生する代表的な ECM 蛋白である *Collagen 1A1* の mRNA の増強、E64d+Pepstatin 処理により抑制が認められた。しかしながら、石灰化の指標となる Arizalin Red 染色像では、Rapamycin 添加により染色度の低下、E64d-Pepstatin 処理では染色度が増強し、相反する結果が得られた。Arizalin Red 染色は感度に問題があることから、擬陽性の場合には判定が困難である。そこで、Collagen 1A1 特異抗体を用いた細胞免疫組織染色と Western blot 法にて検討を行い、Rapamycin 添加によるオートファジーの促進は Collagen 1 蛋白の生成を促進する一方、オートファジーの阻害は細胞内の小胞での異常コラーゲン鎖の生合成、凝集を誘導することを認めた。HPDL においては、オートファジーはコラーゲン蛋白の遺伝子の転写のみならず、異常蛋白凝集体の分解、アミノ酸リサイクル、小胞輸送システムを通じて成熟コラーゲンの産生に影響することが示唆された。

③ 継代培養により誘導された老化 HPDL にお

いては、ユビキチン蛋白並びに P62/SQSTM1 の蓄積を認めた。細胞内 Collagen 1 蛋白の発現低下と ROS 生成の増強が認められたことから、老化 HPDL においてはオートファジーの低下による ECM 蛋白生成の低下、異常蛋白の蓄積・凝集による細胞内 ROS の誘導が恒常性の破綻に関与していることが示唆される。

(3) オートファジーとヒト歯根膜細胞における酸化ストレス-オートファジー阻害剤 E64d+Pepstatin にて 24hrs.m 前処理した HPDL は、H2O2 処理に誘導される細胞内 ROS の蓄積が増強した。これは、HPDL においてオートファジーが酸化ストレスなどの細胞ストレスへの防御機構として機能することを示唆する。

外傷性咬合などのストレス負荷を想定した歯周病態マウスの歯周組織においては有為な歯槽骨の吸収が生じていることを μ CT による解析にて認めた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① 山下元三、河原貴展、村上伸也、歯根膜細胞の石灰化過程における TGF- β シグナルの役割、日本歯周病学会会誌、査読あり、第 55 巻 2 号、2013 年、印刷中

② Blank M, Tang Y, Yamashita M, Burkett SS, Cheng SY, Zhang YE: A tumor suppressor function of Smurf2 associated with controlling chromatin landscape and genome stability through RNF20, *Nat Med*, 2012, 18(2): 227-234, doi: 10.1038/nm.2596.

③ Tang LY, Yamashita M, Coussens NP, Tang Y, Wang X, Li C, Deng CX, Cheng SY, Zhang YE. Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF- β signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. *EMBO J*. 2011 Nov 1;30(23):4777-89. doi: 10.1038/emboj.2011.393.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ikegami K: Effect of aging on a hard tissue-forming ability of periodontal ligament cells. 第 60 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR)、2012 年 12 月 14 日、新潟市
- ② 中村友美、SIRT1 による歯根膜細胞の石灰化制御、第 135 回日本歯科保存学会学術大会、2011 年 10 月 20 日、大阪市
- ③ 中村友美、歯根膜細胞におけるオートファジーの役割、第 52 回日本歯周病学会学術大会、2011 年 5 月 16 日、岡山

[図書] (計 1 件)

野崎剛徳、村上伸也、歯周組織破壊へのロードマップ、-ビジュアル-歯周病を科学する (天野敦雄 岡賢二 村上伸也 編)、クインテッセンス出版、2012 年、P33-45

[その他]

<http://www.dent.osaka-u.ac.jp/graduate/course/perend.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

- ① 野崎 剛徳 (NOZAKI TAKENORI)
大阪大学大学院・歯学研究科・助教
研究者番号：30263304

(3) 研究協力者

- ① 中村 友美 (NAKAMURA TOMOMI)
大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生
- ② 池上 久仁子 (IKEGAMI KUNIKO)
大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生