

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792332

研究課題名(和文) TNF- α の新たな転写制御因子候補 TDP-43 の歯周病病態に果たす役割

研究課題名(英文) A role of TDP-43, a candidate of novel transcription factor for TNF-alpha gene regulation, in the pathogenesis of periodontitis.

研究代表者

村田 裕美 (MURATA, Hiromi)

徳島大学・大学病院・医員

研究者番号：00583874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでに、TNF- α の新たな転写制御因子としてTDP-43を同定した。本研究では、ヒト単球におけるTDP-43の機能を調べた。TDP-43は、単球系細胞株THP-1の核内に恒常的に存在し、それはLPSの刺激を受けると増加した。TDP-43を過剰発現させた細胞ではTNF- α 遺伝子発現が増加し、TDP-43をノックダウンした細胞ではLPS誘導性のTNF- α 遺伝子発現が減少した。TDP-43が結合するTNF- α プロモーター領域には、複数の核内蛋白が結合した。結論として、TDP-43は単球において他の核内因子と相互に作用してLPS誘導性のTNF- α 遺伝子発現を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In previous study, TDP-43 was identified as a candidate of novel transcription factor for TNF-alpha gene regulation in periodontitis. The aim of this study was to investigate a role of TDP-43 in human monocytes/macrophages. TDP-43 localized constitutively in nuclei of differentiated THP-1 cells. LPS increased TDP-43 expression in nuclei of differentiated-THP-1 cells immediately. Overexpression of TDP-43 in THP-1 cells resulted in an increase of TNF-alpha gene expression. Inversely, knockdown of TDP-43 in THP-1 cells downregulated LPS-induced TNF-alpha gene expression. Moreover, it was suggested that the target region located -550 to -487 in TNF-alpha promoter bound several nuclear proteins such as TDP-43 and p65. These results have shown that TDP-43 may play a role as an up-regulator of LPS-induced TNF-alpha gene expression by acting in combination with other factors such as NF-kappaB in nuclei of monocytes and macrophages.

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：歯周病 単球 LPS TNF- α TDP-43

1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌の lipopolysaccharide (LPS)の刺激を受けた単球 / マクロファージから産生される TNF- α は、歯周病の病態を修飾する主要な炎症メディエーターである。LPS 誘導性の TNF- α 遺伝子発現は、主に NF- κ B を介する経路から捉えられてきたが、それ以外の因子の関与を示唆する報告も多数ある。我々はこれまでに、単球系細胞株を用いて、LPS 誘導性に強い転写活性を示すプロモーター領域を同定し、さらに、その領域に結合する新規の TNF- α 転写制御因子の候補として TDP-43 を同定した。

2. 研究の目的

歯周病罹患部位のマクロファージにおける TDP-43 の局在や発現動態、および LPS 誘導性の TNF- α 遺伝子発現調節への影響に焦点を当て、TDP-43 が歯周病の病態形成に果たす役割について検討し、将来 TDP-43 をターゲットとした歯周病治療への応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) マクロファージにおける TDP-43 の局在と LPS 刺激による発現動態の検討：phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を用いてマクロファージ様に分化させた単球系細胞株 THP-1 の培養系に *E. coli* 由来 LPS を添加したときの経時的な TDP-43 発現を、タンパクレベル (免疫染色、ウェスタンブロット) および mRNA レベル (リアルタイム PCR) で調べた。

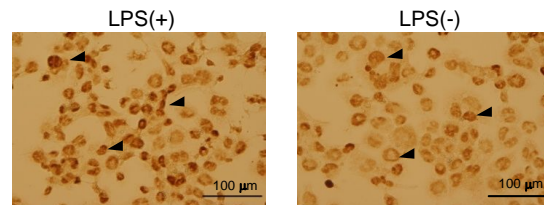
(2) TDP-43 の TNF- α 遺伝子発現における役割の検討：THP-1 の培養系にヒト TDP-43 の発現ベクターあるいは TDP-43 の siRNA を導入したときの TNF- α 遺伝子発現変化を、リアルタイム PCR にて調べた。

(3) TDP-43 と NF- κ B との関係の検討：マクロファージ様に分化させ、LPS を作用させた THP-1 の核抽出物と、標的の TNF- α プロモーター断片 (プローブ) を用いたゲルシフトアッセイにおいて、NF- κ B の非標識結合配列および抗体を加えたときのシフトを解析することによって検討した。

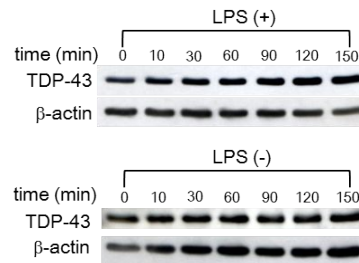
4. 研究成果

(1) 単球系細胞株 THP-1 を PMA を含む培地で 24 時間培養してマクロファージ様に分化させた後、LPS を添加して 0 - 240 分間培養を行った。TDP-43 の抗体を用いた免疫細胞染色の結果、TDP-43 タンパクは LPS 刺激の有無にかかわらず主に核内に局在することがわかった (図 1)。核抽出物を用いたウェスタンブロットの結果、核内における TDP-43 発現は、LPS 刺激後、早期 (10 分後) に上昇し、経時的に増加する傾向を示した (図 2, 3)。また、mRNA レベルでは、LPS 刺激の 20 分後に発現上昇のピークを迎え、30 分後

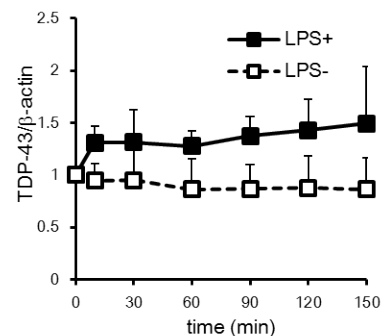
にはベースラインに戻った (図 4 -A)。TNF- α mRNA は LPS 刺激の 30 分後から発現の上昇がみられることから (図 4 -B), TDP-43 の発現上昇は、mRNA レベル、タンパクレベルともに TNF- α 遺伝子発現に先行していたと言える。これらの結果から、LPS 刺激を受けた単球細胞では、TDP-43 mRNA の発現上昇あるいは細胞質にもわずかに存在する TDP-43 タンパクの核内への移行を経て、核内の TDP-43 タンパクが増加し、TNF- α 遺伝子発現を促進する方向に働くことが推察された。



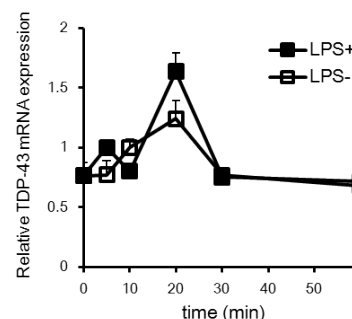
【図 1】LPS 刺激後 4 時間の THP-1 細胞に存在する TDP-43 の免疫染色像。



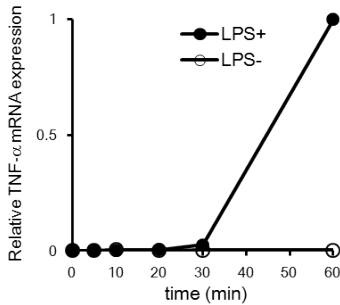
【図 2】LPS 刺激後の THP-1 細胞の核内における TDP-43 タンパク量の経時変化。



【図 3】図 2 の黒化度の測定結果。

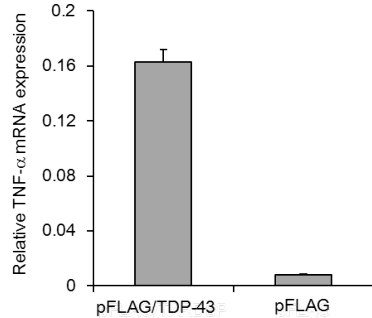


【図 4 -A】LPS 刺激後の THP-1 細胞における TDP-43 mRNA 発現量の経時変化。

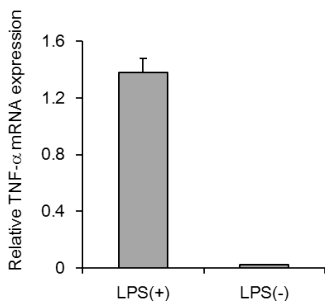


【図 4-B】LPS 刺激後の THP-1 細胞における TNF-α mRNA 発現の経時的変化。

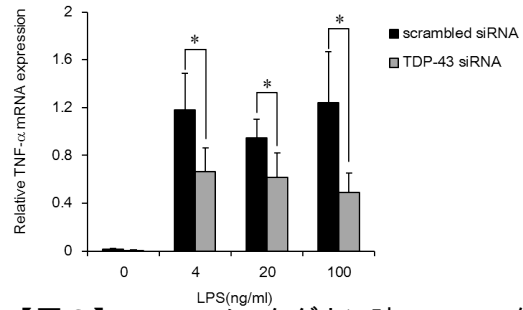
(2) THP-1 細胞の TNF-α 遺伝子発現における TDP-43 の役割を調べることを目的とし、TDP-43 の過剰発現時およびノックダウン時の TNF-α mRNA 発現量の変化を調べた。尚、TNF-α 遺伝子発現における PMA の影響を排除して考えるために、PMA で分化させていない THP-1 細胞を用いた。その結果、TDP-43 を過剰発現させた細胞では、コントロール細胞（ベクターのみ導入した細胞）に比べて TNF-α mRNA 発現量が増加した（図 5-A）が、それは LPS で刺激した場合の増加量に比べると少なかった（図 5-B）。また、TDP-43 をノックダウンした細胞では、コントロール細胞（scrambled siRNA を導入した細胞）に比べて LPS 刺激時の TNF-α mRNA 発現量が減少した。これらの結果から、TDP-43 は THP-1 細胞の恒常的および LPS 刺激時の TNF-α 遺伝子発現において無くてはならない因子であるが、LPS 刺激時の TNF-α 遺伝子発現の促進には共に働く他の因子を必要とすることが推察された。



【図 5-A】TDP-43 過剰発現時の THP-1 細胞における TNF-α 遺伝子発現量の変化。

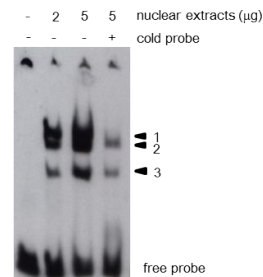


【図 5-B】LPS 刺激時の THP-1 細胞における TNF-α 遺伝子発現量の変化。

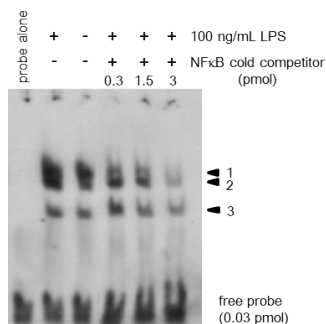


【図 6】TDP-43 ノックダウン時の THP-1 細胞における LPS 刺激時の TNF-α 遺伝子発現量の変化。

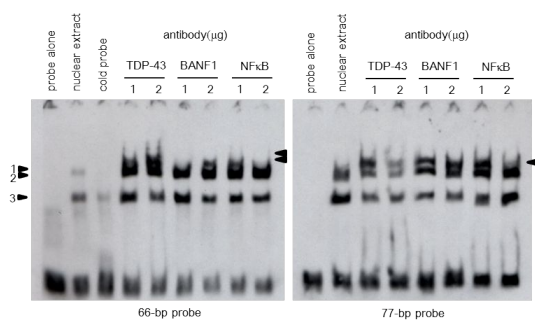
(3) TDP-43 と NF-κB との関係の検討を目的とし、PMA による分化誘導後に LPS で刺激した THP-1 の核抽出物と、標的の TNF-α プロモーター断片（プローブ）を用いたゲルシフトアッセイを行った。LPS で刺激した THP-1 細胞の核内には、標的の TNF-α プロモーター領域に結合する、移動度の異なる少なくとも 3 種類のタンパクが存在することを確認した（図 7）。次に、それらのタンパク群に NF-κB が含まれるかどうかを調べるために、NF-κB 結合配列の非標識プローブを用いた競合アッセイと、NF-κB (p65) の抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行った。その結果、図 7 で検出した 3 つのバンドは、NF-κB 結合配列の非標識プローブの濃度依存的に減弱する傾向を示した（図 8）。また、TDP-43 および NF-κB (p65) の抗体を加えると、それぞれ、バンドのスーパーシフトあるいは消失を認めた（図 9）。これらの結果から、TDP-43 は直接的あるいは間接的に標的の TNF-α プロモーター領域に結合し、NF-κB と複合体を形成することによって、LPS の刺激を受けた THP-1 細胞における TNF-α 遺伝子発現を促進する働きを果たすことが推察された。



【図 7】LPS 刺激時の THP-1 細胞の核内における標的 TNF-α プロモーター結合性タンパクの検出。



【図8】NF-κB 結合配列の非標識プローブを用いた競合アッセイ。



【図9】TDP-43 および NF-κB (p65) の各抗体を用いたスーパーシフトアッセイ。

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)

〔学会発表〕(計6件)

(1) 中島由紀子, 木戸淳一, 稲垣裕司, 板東美香, 廣島佑香, 村田裕美, 永田俊彦
 「低酸素環境がヒト口腔上皮細胞の各種遺伝子発現に及ぼす影響」
 第56回秋季日本歯周病学会, 2013年9月22日, 前橋市民文化会館(群馬)

(2) 村田裕美, 前田博史, 高柴正悟, 木戸淳一, 永田俊彦
 「神経変性疾患関連因子 TDP-43 は単球における LPS 誘導性 TNF-α 転写制御に参与する」
 第56回秋季日本歯周病学会, 2013年9月22日, 前橋市民文化会館(群馬)

(3) 村田裕美, 二宮雅美, 高柴正悟, 前田博史, 木戸淳一, 永田俊彦
 「A major neurodegenerative disease protein TDP-43 enhances TNF-α transcriptional regulation in human monocyte-derived macrophage-like cells」
 10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, 2013年9月4日, 奈良県新公会堂(奈良県)

(4) 村田裕美, 生田貴久, 前田博史, 高柴正悟, 木戸淳一, 永田俊彦
 「神経変性疾患関連因子 TDP-43 はマクロファージ様細胞の TNF-α 転写調節に参与する」
 第138回春季日本歯科保存学会, 2013年6月28日, 福岡国際会議場(福岡県)

(5) 二宮雅美, 板東美香, 村田裕美, 生田貴久, 木戸淳一, 永田俊彦
 「姉妹に認められた広汎型侵襲性歯周炎に対して包括的歯周治療を行った症例」
 第56回春季日本歯周病学会, 2013年5月31日, タワーホール船堀(東京)

(6) 木戸淳一, 板東美香, 坂東由紀子, 稲垣

裕司, 廣島佑香, 梶浦由加里, 美原智恵, 村田裕美, 生田貴久, 篠原宏貴, 橋本万里, 舟木真理, 斉藤晴比呂, 永田俊彦

「糖尿病関連歯周炎の診断マーカーとしての歯肉溝滲出液中グリコアルブミンとカルプロテクチンの有用性」

第56回日本糖尿病学会, 2013年5月17日, ホテル日航熊本(熊本県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 裕美 (MURATA HIROMI)

徳島大学・大学病院・医員

研究者番号: 00583874

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし