

令和元年6月13日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11807

研究課題名(和文)酸化ストレスからみた口唇裂口蓋裂発症機序解明と予防法の開発

研究課題名(英文) Oxidative stress as an onset mechanism for cleft lip and palate and a possible target for the development of preventive methods

研究代表者

加藤 大樹 (Kato, Hiroki)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30452709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口唇裂口蓋裂の発症頻度は700人に1人と極めて高く、予防法の開発は急務であるが、発症機序が十分に解明されておらず、有効な予防法は確立されていない。口唇裂口蓋裂の発症要因の一つとして、酸化ストレスが示唆されている。また、疫学調査で口唇裂口蓋裂予防効果が報告されている葉酸の作用として、抗酸化ストレス作用が示唆されているが、詳細は不明であった。そこで本研究は、顎顔面形成に重要な働きをする神経堤由来幹細胞を細胞モデルとして、葉酸の抗酸化ストレス作用機序解明を行った。その結果、葉酸がミトコンドリアからの活性酸素種産生を低下させること、またミトコンドリア機能を改善し細胞機能を回復させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで葉酸の抗酸化ストレス作用機序は十分に解明されていなかったが、本研究では葉酸はミトコンドリア機能を回復させることで、抗酸化ストレス作用を発揮することを明らかにできた。葉酸摂取が口唇裂口蓋裂や神経管閉鎖障害等の先天異常を予防することが知られているが、本研究成果を通じて、葉酸摂取による先天異常予防を世間に再啓発できると考える。

研究成果の概要(英文)：The incidence of cleft lip and palate is extremely high at 1 in 700 worldwide. Although the development of preventive methods is urgently needed, the pathogenesis of cleft lip and palate has not been sufficiently clarified and effective preventive methods have not been established. Oxidative stress has previously been suggested as one of the causes of cleft lip and palate. Folic acid has been reported to prevent cleft lip and palate in epidemiological studies, possibly through its induction of antioxidative stress. Therefore, in this study, we investigated the ability of folic acid to cause antioxidative stress using a cellular model of neural crest-derived stem cells that play an important role in maxillofacial formation. We demonstrated that folic acid reduces reactive oxygen species production from mitochondria and improves mitochondrial function to restore cell function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：口唇裂口蓋裂 酸化ストレス ミトコンドリア 葉酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇裂口蓋裂発症頻度は、世界的に見て700人に1人と先天性異常の中で最も高い。そのため予防法の開発は急務であるが、母体要因と遺伝要因が複雑に相互作用する多因子疾患であるため、発症機序は十分に解明されておらず、有効な予防法は確立されていない。口唇裂口蓋裂の発症要因の一つとして、低酸素環境やアルコール代謝などにより発生する酸化ストレスの関与が示唆されていた。また、世界規模の疫学調査で、葉酸の摂取が口唇裂口蓋裂を予防することが報告されているが、その予防作用として抗酸化ストレス作用が示唆されていた。しかしながら、葉酸の口唇裂口蓋裂における抗酸化ストレス作用機序は不明であった。

2. 研究の目的

葉酸の抗酸化ストレス作用機序を明らかにし、それを応用した予防法の開拓を本研究の目標とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト脱落乳歯由来幹細胞(SHED)の調製と培養

健常児および口唇裂口蓋裂患児乳歯より歯髄を単離し、SHEDを調製した。SHEDは15%ウシ胎児血清(Sigma-Aldrich)、100 mM L-ascorbic acid 2-phosphate(富士フィルム和光純薬)、250 μ g/mL ファンギゾン(Thermo Fisher Scientific)、100 U/mL ペニシリン(Thermo Fisher Scientific)、100 μ g/mL ストレプトマイシン(Thermo Fisher Scientific)を含む Eagle's Minimal Essential Medium, Alpha Modification(Sigma-Aldrich)を用いて37°C、5%CO₂の条件で培養した。

(2) 細胞増殖測定

1 x 10⁵個の細胞を6ウェルプレートに播種し24時間後、終濃度0, 10, 20, 40, 80 μ Mで葉酸(富士フィルム和光純薬)を培地に添加した。その6時間後、終濃度0, 12.5, 50, 100 μ Mでピオシアニン(Sigma-Aldrich)を培地に添加し24時間培養を継続した。0.4%トリパンブルー(富士フィルム和光純薬)で細胞を染色し、血球計算盤で細胞数のカウントを行った。

(3) 細胞遊走能測定

Culture-Insert 2 Well(ibidi)を6ウェルプレートに設置し、2.1 x 10³個の細胞をウェル内に播種した。24時間後、Culture-Insert 2 Wellを除去し、終濃度0, 80 μ Mで葉酸を添加して培養を継続した。6時間後、終濃度0, 100 μ Mでピオシアニンを添加し、48時間培養を継続した。ピオシアニン添加後24, 48時間に写真を撮影し、画像をImageJで解析し、Culture-Insert 2 Wellで作成した間隙の閉鎖率を解析した。

(4) 活性酸素種(ROS)測定

ROSの測定は、CellROX Green(Thermo Fisher Scientific)を用いた。CellROX Greenを終濃度5 μ Mで培地に添加し、30分間培養を継続した。その後、Tryple Express(Thermo Fisher Scientific)で細胞を分散させ、フローサイトメータ FACSVerse(BD Bioscience)で蛍光シグナルを解析した。

(5) ミトコンドリア活性酸素種(mtROS)測定

mtROSの測定には、MitoSOX Red(Thermo Fisher Scientific)を用いた。MitoSOX Redを終濃度10 μ Mで添加し、10分間培養を継続した。その後、Tryple Expressで細胞を分散させ、FACSVerseで蛍光シグナルを解析した。

(6) PGC-1 α mRNA 発現解析

細胞を回収し、Total RNAをRNeasy mini kit (Qiagen)で調製した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(東洋紡)でcDNAを合成し、GoTaq qPCR Master Mix(Promega)を用いて定量PCRを行った。プライマーは、PGC-1 α , 5' -GGCAGAAGGCAATTGAAGAG-3' (forward) and 5' -TCAAAACGGTCCCTCAGTTC-3' (reverse); 18S rRNA, 5' -CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' (forward) and 5' -GCTGGAATTACCGCGGCT-3' (reverse)を用い、測定はStepOnePlus(Thermo Fisher Scientific)で行った。

(7) ATP量測定

Tryple Expressで細胞を分散させ回収後、ATP量をCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)を用いて測定した。

(8) ミトコンドリア形態観察

細胞を4%パラホルムアルデヒド(富士フィルム和光純薬)で固定し、0.1% TX-100(ナカライテック)で透過処理、2%BSA(富士フィルム和光純薬)でブロッキング処理を行った後、ミトコンドリア外膜タンパク質Tom20の抗体(Santa Cruz Biotechnology)で細胞免疫染色を行った。2次抗体は、Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(Thermo Fisher Scientific)を用いた。抗体で染色後、核を4', 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI; 同仁化学研究所)で染色した。ミトコンドリア形態の観察は、ApoTome.2 (Zeiss)を装備した、Axio Imager M2 顕微鏡(Zeiss)で行った。

4. 研究成果

研究開始時は、口唇裂口蓋裂を自然発症するCL/Frマウスから調製したマウス胚線維芽細胞(MEF)を病態解析の細胞モデルとして用いる予定であった。しかしCL/Fr由来のMEFは、コント

ロールとして用いる予定であった C57BL/6 由来の MEF と比較して長期保存に適さないことが平成 28 年度に明らかになり、平成 29 年度からヒト脱落乳歯由来幹細胞 (SHED) の利用を検討した。

SHED は神経堤由来幹細胞の一つであり、神経細胞や骨芽細胞へ分化可能な多能性を有する幹細胞である。SHED の調製は脱落乳歯を用いるため非侵襲的に調製可能であり、患児のみならず健常児からの研究協力を得やすい幹細胞である。神経堤由来幹細胞は、顎顔面形成において中心的な役割を果たす。本研究では、SHED を顎顔面形成時の細胞モデルとして解析に用いた。

まず、健常児由来 SHED を用いて酸化ストレスの誘導条件の検討を行った。酸化ストレス誘導は、0-100 μM ピオシアニンを用いて行い、ROS 産生と細胞増殖を指標に至適条件の検討を行った。その結果、100 μM ピオシアニンが細胞に極度なストレスを与えずに酸化ストレスを誘導可能な至適濃度であることがわかった (図 1A, B)。

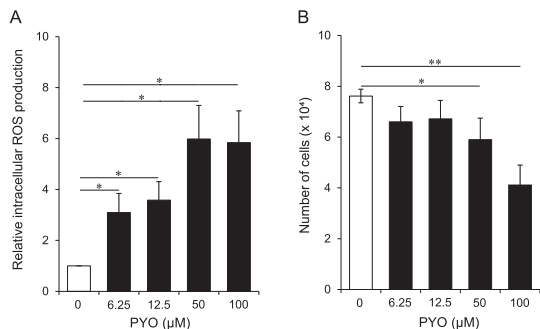


図 1. ピオシアニンによる酸化ストレス誘導条件の検討 (A) ROS 産生、(B) 細胞増殖能力、PYO: ピオシアニン、Zhang, Kato et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019 から引用

次に、酸化ストレス負荷時における葉酸の細胞機能回復効果について解析を行った。ピオシアニン添加による酸化ストレス誘導下にて葉酸を 0-80 μM 添加し、細胞増殖能と細胞遊走能を解析した。酸化ストレス負荷により低下した細胞増殖能は、葉酸の濃度依存的に回復し、80 μM で最大値を示した (図 2A)。さらに、酸化ストレス負荷により低下した細胞遊走能も、葉酸添加により回復した (図 2B, C)。

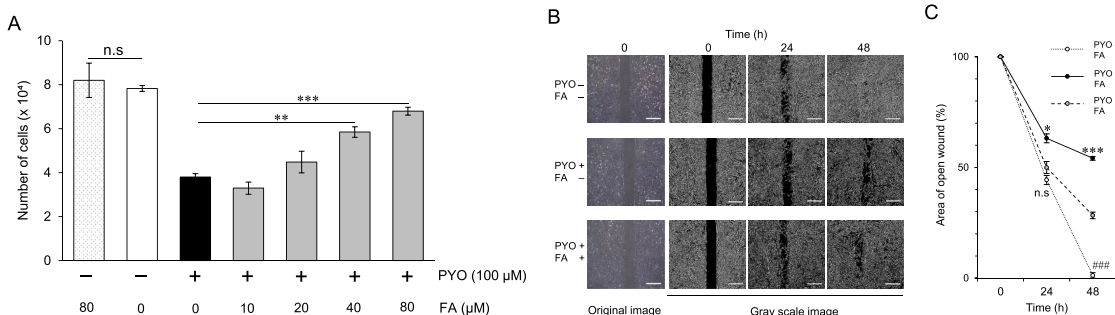


図 2. 酸化ストレス負荷時における葉酸による細胞機能の回復 (A) 細胞増殖能、(B, C) 細胞遊走能、PYO: ピオシアニン、FA: 葉酸、Zhang, Kato et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019 から引用

酸化ストレスの制御にミトコンドリアは中心的な役割を果たす。葉酸の抗酸化ストレス作用機序を解明するため、mtROS 産生、ミトコンドリア生合成、ATP 量について解析を行った。ピオシアニン添加により上昇した mtROS は、葉酸添加により有意に減少した (図 3A)。ミトコンドリアの生合成に重要な *PGC-1 α* 遺伝子の発現は、ピオシアニン添加により減少したが、葉酸添加により有意に回復した (図 3B)。ATP 量はピオシアニン添加により減少したが、葉酸の添加により有意に回復した (図 3C)。

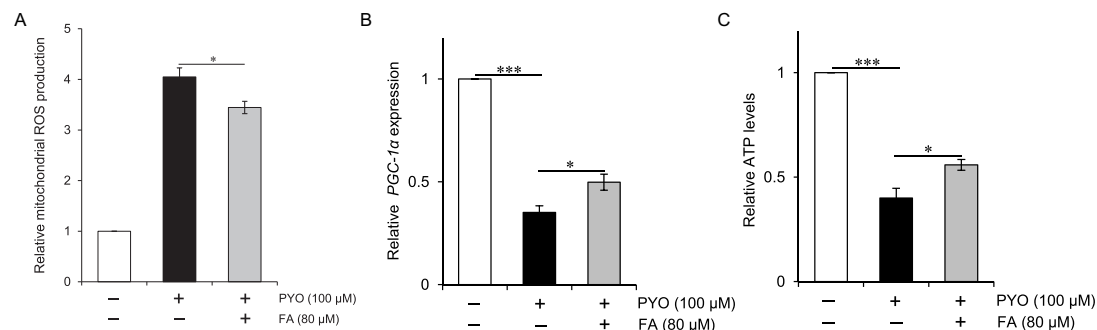


図 3. 葉酸添加による mtROS 産生低下とミトコンドリア活性の回復 (A) mtROS 産生、(B) *PGC-1 α* mRNA 発現、(C) ATP 量、PYO: ピオシアニン、FA: 葉酸、Zhang, Kato et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019 から引用

さらに、ミトコンドリア機能と密接に関係するミトコンドリア形態の解析を行った。ピオシアニン添加によりミトコンドリアの断片化頻度は上昇したが、葉酸の添加により断片化頻度は有意に低下した(図 4A, B)。

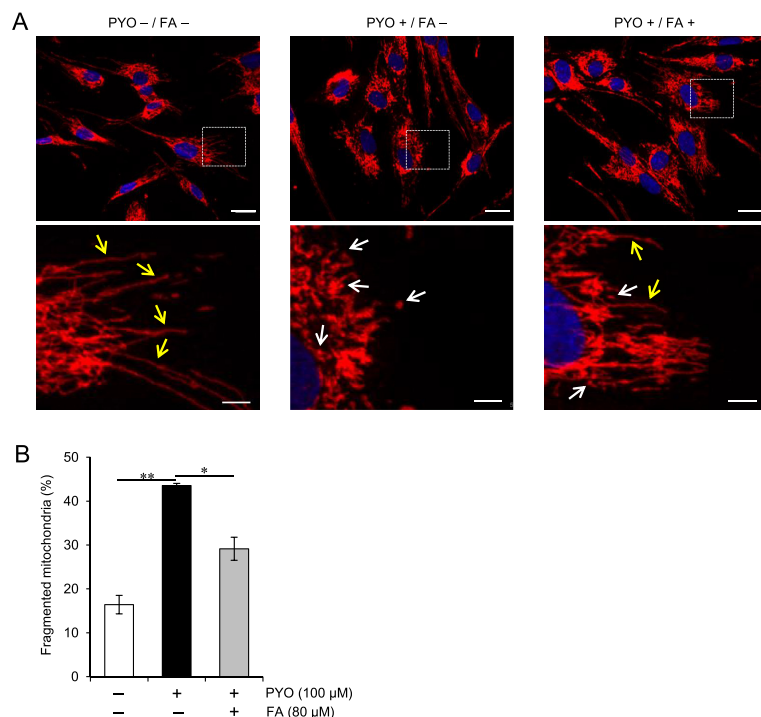


図 4. 葉酸によるミトコンドリア形態異常の回復 (A) SHED のミトコンドリア形態、赤:Tom20(ミトコンドリア)、青: DAPI(核)、黄色矢印: 伸長したミトコンドリア、白色矢印: 断片化したミトコンドリア、(B) ミトコンドリア断片化の頻度、PYO: ピオシアニン、FA: 葉酸、Zhang, Kato et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019 から引用

以上の結果より、葉酸はミトコンドリア機能を改善することで、抗酸化ストレス作用を持つと考えられる。さらに口唇裂口蓋裂患児由来 SHED に対しても葉酸の効果を調べた結果、健常児と同様に葉酸による抗酸化ストレス作用を確認することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Zhang, Y., Kato, H., Sato, H., Yamaza, H., Hirofuji, Y., Han, X., Masuda, K., Nonaka, K. Folic acid-mediated mitochondrial activation for protection against oxidative stress in human dental pulp stem cells derived from deciduous teeth. (2019) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508: 850-856

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Zhang, Y., Kato, H., Yamaza, H., Hirofuji, Y., Han, X., Masuda, K., Nonaka, K. Folic acid-mediated mitochondrial activation for protection against oxidative stress in human dental pulp stem cells derived from deciduous teeth. (2019) 第 57 回小児歯科学会大会、6 月、札幌

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 野中 和明

ローマ字氏名: Kazuaki Nonaka

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 歯学研究院

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 90128067

研究分担者氏名: 佐藤 浩

ローマ字氏名: Hiroshi Sato

所属研究機関名：九州大学
部局名：歯学研究院
職名：助教
研究者番号（8桁）：00421313

研究分担者氏名：山座 治義
ローマ字氏名：Haruyoshi Yamaza
所属研究機関名：九州大学
部局名：歯学研究院
職名：准教授
研究者番号（8桁）：30336151

研究分担者氏名：増田 啓次
ローマ字氏名：Keiji Masuda
所属研究機関名：九州大学
部局名：大学病院
職名：臨床准教授
研究者番号（8桁）：60392122

(2)研究協力者

研究協力者氏名：目野 主税
ローマ字氏名：Chikara Meno

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。