

令和元年6月6日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11898

研究課題名(和文) 低濃度フッ化物による間葉系幹細胞老化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Effect of low concentration fluoride in senescence of mesenchymal stem cells

研究代表者

那須 郁夫 (NASU, Ikuo)

日本大学・松戸歯学部・客員教授

研究者番号：80112952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：3ヶ月齢および15ヶ月齢のSenescence-Accelerated Mouse (SAM)マウスを使用し、トータルRNAを大腿骨組織から分離した。それらの遺伝子発現およびmiRNA発現所見は、GeneSpringおよびIngenuity Pathways Analysisと組み合わせ、DNAマイクロアレイおよびmiRNAアレイを用いて解析した。加齢の制御転写因子が、miR-223-3p、miR-744-5p、miR-3103-5p、miR-4723-5pおよびmiR-6825-5pの制御に関与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回用いるSAMP6系は、若齢期の最大骨密度が低いために加齢に伴い早期に骨粗鬆症に至りやすい老人性骨粗鬆症モデル動物である。当該研究において老化細胞マスター転写因子が制御している標的遺伝子による老化細胞の制御機構を明らかにするため、SAMP6マウスを用いてゲノムワイドにスクリーニングを展開し老化細胞制御遺伝子を同定、骨組織への影響を明らかにすることで、老化幹細胞の生理的機能の解明のみならず、異常活性および機能不全で誘発される代謝性、自己免疫性骨疾患のメカニズム解明し、再生医療の発展に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the influence of microRNAs and their target genes on bone tissue to elucidate physiological function of aging in term of bone metabolism and autoimmunity. Total RNA was isolated from femoral tissue using 3-month-old and 15-month-old SAM mice of the aging model. Their gene expression and miRNA expression findings were analyzed using DNA microarrays and miRNA arrays in combination with GeneSpring and Ingenuity Pathways Analysis. Gene ontology (GO) analysis revealed that it incorporates critical transcription-related processes and intracellular signaling of genes targeted to miRNA. Further analysis by RT-qPCR indicates that aging regulatory transcription factors are involved in the regulation of miR-223-3p, miR-744-5p, miR-3103-5p, miR-4723-5p and miR-6825-5p. Comprehensive analysis of mRNAs and miRNAs in which numerous combinations were identified suggested that aberrant expression of miRNAs is important in bone aging.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：老化 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フッ化物 (F) は、齲蝕や歯周疾患に対して抵抗性の高い歯と丈夫な骨を作り、それらを維持していくうえで生体にとって必要不可欠な微量元素である。F の細胞への影響として、 μM レベルの低濃度では、骨芽細胞 (Burgener et al, *J Bone Miner Res*, 1995) やエナメル芽細胞 (Yan et al, *J Dent Res*, 2007) の増殖を促進する報告がある。また、申請者らは、角化歯肉上皮細胞(以下:NHOK)に対して、低濃度 F では増殖・移動を促進することを明らかにした (Arakawa et al., *Biomedical Research*, 2009)。加えて、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、線維芽細胞増殖因子 FGF2、FGF7 の発現が上昇することで、上皮移動、増殖が強く見られ、上皮の形態発育、再生を促進することを明らかにした。さらに、間葉細胞マーカー Twist1 発現が上昇することで、上皮間葉相互作用を刺激し、上皮間葉相互作用においても、上皮の形態発育、再生を促進した(He et al. *Journal of Hard Tissue Biology* 22, 59-66, 2012)。申請者らの最近の研究により、歯周病感染モデルラットを用いた実験で、低濃度 F 摂取群では非摂取群に比べ、有意に歯槽骨吸収を抑制することを見出した(Bhawal UK, Arikawa K, Nasu I et al. *International Journal of Oral Science* 7(4), 242-249, 2015)。歯周病は老化とともに進行する歯周組織を破壊する慢性炎症性疾患である。また、老化した細胞は細胞周期を停止しているだけでなく、炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼなどの生理活性因子を分泌することが報告されており、この現象を SASP (senescence -associated secretory phenotype) と呼んでいる。老化細胞はこの SASP 因子を放出することによって周辺細胞に炎症を誘発させる。申請者らは、増殖中 NHOK 細胞と老化 NHOK 細胞をもちいて DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、老化関連遺伝子を同定した(Jang and Bhawal et al, *The Journal of Gerontology, Series A: Biological Sciences* 70, 20-32, 2015)。

2. 研究の目的

申請者らの最近の研究では、低濃度 F による 2 型糖尿病モデル動物 Goto-Kakizaki (GK) ラットの歯周組織の修復とインスリン様増殖因子(IGF)シグナル伝達のみならず、メカニズムを示唆した。(Lee HJ, Arikawa K. *Journal of Hard Tissue Biology* 24, 2015)。IGF-1 は PI3K を介して心筋梗塞部位に局所注入した間葉系幹細胞の生着を促進し、ホスト心筋細胞のアポトーシスの抑制、血管の新生といった MSC 移植の効果をより促進させ、心機能および生存率を改善させた。また、骨基質の IGF-1 は間葉系幹細胞での mTOR 活性化により骨量を維持する。IGF-1 が加齢性骨粗鬆症を治療するための治療標的となることが論理的に示されており(Xian et al. *Nature Medicine* 18, 1095-1101, 2012)、歯槽骨吸収や骨粗鬆症等の骨密度が低下する老化関連疾患と関係する。近年、京都大学胸部疾患研究所で開発された老化促進モデルマウス(Senescence Accelerated Mouse; SAM)は成熟後の老化速度が速く、ヒトの老齢期に高頻度に観察される老化病態と共通の病態を自然発症する実験動物である。今回用いる SAMP6 系は、若齢期の最大骨密度が低いために加齢に伴い早期に骨粗鬆症に至りやすい老人性骨粗鬆症モデル動物である。当該研究において低濃度 F による老化細胞マスター転写因子 が制御している標的遺伝子による老化細胞の制御機構を明らかにするため、SAMP6 マウスを用いてゲノムワイドにスクリーニングを展開し老化細胞制御遺伝子を同定、さらに低濃度 F による間葉系幹細胞、骨組織への影響を明らかにすることで、老化幹細胞の生理的機能の解明のみならず、異常活性および機能不全で誘発される代謝性、自己免疫性骨疾患のメカニズム解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Flow cytometry 法にて低濃度 F 添加後増殖中の間葉系幹細胞、 β -ガラクトシダーゼ染色に

て老化間葉系幹細胞をそれぞれ評価する。低濃度 F 添加後増殖中の間葉系幹細胞および老化間葉系幹細胞を DNA マイクロアレイおよび microRNA マイクロアレイ解析にて網羅的遺伝子発現解析を行う。

- (2) SAMP6 マウスから骨髄細胞を採取し、低濃度 F 添加による骨芽細胞および破骨細胞の評価をリアルタイム PCR 法、ウェスタンブロットティング法、SEM 法および TRAP 染色法を用いて解析する。
- (3) SAMP6 マウスを用いて低濃度 F 摂取による歯周組織に及ぼす影響をマイクロ CT、ヘマトキシリン・エオジン染色法および免疫組織科学染色法を用いて解析する。

4. 研究成果

低濃度 F を添加した増殖中の細胞はトリプシン処理し分離され、DNA と細胞周期の解析は FACS 解析にて評価した。間葉系幹細胞の細胞老化の評価には SA- β gal 染色を用いた。倒立顕微鏡にて間葉系幹細胞を確認した。低濃度 F を添加した増殖中の間葉系幹細胞と老化間葉系幹細胞から RNA 画分を回収し、GeneSpring GX software を用いてデータ解析を行なった。マイクロアレイデータ分析の促進や、特異遺伝子の発現量の変化を関連づける IPA 解析を行なった。近年、京都大学胸部疾患研究所で開発された老化促進モデルマウス (Senescence Accelerated Mouse; SAM) は、成熟後の老化速度が速く、ヒトの老齢期に高頻度に観察される老化病態と共通の病態を自然発症する実験動物である。また、SAMP6 系は、若齢期の最大骨密度が低いために、加齢に伴い早期に骨粗鬆症に至りやすい老人性骨粗鬆症モデル動物である。本研究では、12 週齢マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を、10% PBS、50 ng/mL M-CSF、15 ng/mL RANKL を含む α -MEM 培地で 7 日間培養し、低濃度 F 添加の有無による影響を解析した。また、骨芽細胞の活性化は、分化マーカーである 1 型コラーゲン、Alkaline Phosphatase、Osteopontin、Osteocalcin、Bone sialoprotein、そして、破骨細胞分化制御因子として receptor activator of nuclear factor- κ B ligand、osteoprotegerin、macrophage colony-stimulating factor の発現をリアルタイム PCR 法より評価した。破骨細胞の分化は、酒石酸抵抗性フォスファターゼ (TRAP) 染色および Pit Formation Assay 法 (SEM 法) より解析した。また、破骨細胞活性化はウェスタンブロットティング法よりカテプシン K、MMP2、MMP9 の発現、ゼラチンゼイモ電気泳動より MMP2、MMP9 の活性化を評価し、低濃度 F 添加物の骨芽細胞および破骨細胞における分化誘導や活性化に及ぼす影響を明らかにした。3 ヶ月齢および加齢モデルの 15 ヶ月齢の老化促進モデルマウス (senescence accelerated mouse, SAM) マウスを使用し、トータル RNA を大腿骨組織から分離した。それらの遺伝子発現および miRNA 発現所見は、GeneSpring および Ingenuity Pathways Analysis と組み合わせ、DNA マイクロアレイおよび miRNA アレイを用いて解析した。遺伝子オントロジー (GO) 分析は、miRNA を標的とした遺伝子の極めて重要な転写関連プロセスと細胞内シグナル伝達を組み込んでいることを明らかにした。シグナル経路で、cAMP 媒介シグナル、上皮接着結合シグナル、タイトジャンクションシグナル、ギャップジャンクションシグナル、カルシウムシグナル、およびサーチュインシグナルが骨老化に関与していることも明らかにした。RT-qPCR によりさらに解析したところ、加齢の制御転写因子が、miR-223-3p、miR-744-5p、miR-3103-5p、miR-4723-5p および miR-6825-5p の制御に関与していることを示した。多数の組み合わせが識別された mRNA と miRNA の網羅的解析は、miRNA の異常発現は骨加齢において重要であることを示唆した。そして、その機能は関連シグナル上の特定遺伝子の転写を通して誘導されることが考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. 有川量崇, 谷野 弦, 田口千恵子, 竹内麗理, 小林良喜, 内山敏一, Ujjal K. Bhawal, 那須郁夫. 高齢者の口腔環境に対する中鎖脂肪酸とビタミンDを含有するオイルの効果の検討. 日本口腔ケア学会雑誌 12(2), 11-16, 2018 査読有
2. 田口千恵子, 小林良喜, 加藤志奈, 有川量崇, 内山敏一, 那須郁夫. 歯科診療室内の浮遊微粒子群が細胞に与える影響. 日大口腔科学 43(1), 35-40, 2017 査読有
3. Gotouda H, Tamamura R, Kono T, Ootani Y, Kanno T, Kuwada-Kusunose T, Suzuki K, Sakae T, Okada H, Nasu I. Immunohistological Study of the Major Salivary Glands in the Gray Short-Tailed Opossums (*Monodelphis domestica*). Journal of Hard Tissue Biology 26(1), 75-80, 2017 査読有
4. Gotouda H, Nasu I, Kono T, Ootani Y, Kanno T, Tamamura R, Kuwada-Kusunose T, Suzuki K, Hirayama T, Hirayama T, Sakae T, Okada H. Erosion by an acidic soft drink of human molar teeth assessed by X-Ray diffraction analysis. Journal of Hard Tissue Biology 26(1), 81-85, 2017 査読有
5. 那須 郁夫, 中村 隆. 日本人永久歯歯数の Age-Period-Cohort 分析歯科疾患実態調査による. 老年歯科医学 31(1), 39-50, 2016 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Bhawal UK, Yu Fujita Y, Nasu I, Arakawa H. Insights into the mechanisms of low-level fluoride in preventing periodontal disease: current status and future expectations. 13th International Conference of the Asian Academy of Preventive Dentistry, Khon Kaen, Thailand. 2018.11.21 - 2018.11.23
2. Zhang F, Bhawal UK, Taguchi C, Arikawa K, Nasu I, Arakawa H, Shibutani K. Role of stromal cell-derived factor 1 alpha and CXCR4 in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal inflammation. 第 67 回日本口腔衛生学会・総会、札幌市教育文化会館 2018.5.18 – 2018.5.20
3. Bhawal UK, Uchiyama T, Arikawa K, Oka S, Hiratsuka K, Arakawa H, Nasu I, Shibutani K. The effects of low-power laser irradiation in submandibular glands of diabetes-induced rats. IUPS 38th World Congress, Rio de Janeiro, Brazil. 2017.8.1 – 2017.8.5
4. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Uchiyama T, Hiratsuka K, Arakawa H, Nasu I. Micromolar levels of sodium fluoride promote osteoblast differentiation through Runx2 signaling. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会、山形テルサ 2017.5.31 – 2017.6.2
5. 後藤田 宏也, 田口 千恵子, 生田 明敏, 桑原 紀子, 松根 健介, 平塚 浩一, 河野 善治, 松村 淳, 那須 郁夫. う蝕リスク診断におけるハイリスク者選別の評価法の比較検討. 第65回日本口腔衛生学会・総会; The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry : AAPD. 東京医科歯科大学 M&Dタワー 鈴木章夫記念講堂、東京 2016.5.27 – 2017.5.29
6. 田口 千恵子, 小林 良喜, 有川 量崇, 中山 竜司, 落合 智子, 那須 郁夫. マウスにおける分泌型IgA抗体産生の概日リズム. 第65回日本口腔衛生学会・総会; The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry : AAPD. 東京医科歯科大学 M&Dタワー 鈴木章夫記念講堂、東京 2016.5.27 – 2017.5.29
7. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Nakayama R, Nasu I, Arakawa H, Hiratsuka K. Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) is a novel negative regulator of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21) in aging mice. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会; The 12th International Conference of

Asian Academy of Preventive Dentistry : AAPD. 東京医科歯科大学 M&D タワー 鈴木章夫
記念講堂、東京 2016.5.27 – 2017.5.29

8. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Nakayama R, Nasu I, Arakawa H, Hiratsuka K. MicroRNA expression profiling and inhibition of inflammation of Korean red ginseng extract in rats on kanamycin-induced hearing loss. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会; The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry : AAPD. 東京医科歯科大学 M&D タワー 鈴木章夫記念講堂、東京 2016.5.27 – 2017.5.29
9. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Nakayama R, Nasu I, Arakawa H, Hiratsuka K. DNA microarray and MicroRNA analysis in low-level laser therapy (LLLT)-treated diabetic rat salivary glands. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会; The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry : AAPD. 東京医科歯科大学 M&D タワー 鈴木章夫記念講堂、東京 2016.5.27 – 2017.5.29
10. 竹内 麗理, 有川 量崇, 田口 千恵子, 中山 竜司, 平塚 浩一, 那須 郁夫. 口内炎モデルラットによる水素水の治療および予防効果の検討. 第65回日本口腔衛生学会・総会; The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry : AAPD. 東京医科歯科大学 M&Dタワー 鈴木章夫記念講堂、東京 2016.5.27 – 2017.5.29

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：有川 量崇

ローマ字氏名：ARIKAWA, kazumune

所属研究機関名：日本大学

部局名：松戸歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50318325

研究分担者氏名：パワー ウジャー

ローマ字氏名： BHAWAL, ujjal

所属研究機関名：日本大学

部局名：松戸歯学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：50433339

研究分担者氏名：田口 千恵子

ローマ字氏名： TAGUCHI, chieko

所属研究機関名：日本大学

部局名：松戸歯学部

職名：助手（専任扱）

研究者番号（8桁）：80434091

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。