

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18532

研究課題名（和文）歯周組織におけるミトコンドリアダイナミクスの解析

研究課題名（英文）Analysis of mitochondria dynamics in periodontal ligament

研究代表者

中村 友美（Nakamura, Tomomi）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：00807589

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： 老化ヒト歯根膜細胞では損傷ミトコンドリアの増加とマイトファジーの低下が観察され、損傷ミトコンドリアの標識に関するPARK2遺伝子発現の低下が認められた。PARK2を老化ヒト歯根膜細胞に導入するとマイトファジーが部分的に賦活化した。さらに、老化と酸化ストレス応答に関連するmiR-137やmiR-181aなどのmiRNAが老化ヒト歯根膜細胞で高発現しており、これらの模倣合成オリゴを正常細胞に導入するとROSは蓄積し、阻害オリゴを老化細胞に導入するとROSが減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は慢性炎症性疾患であり、そのリスク因子の一つに酸化ストレスが考えられている。高齢患者の歯周組織においては、口腔内細菌やメカニカルストレスなどの環境ストレスに対する適応能力が減少する一方で、酸化ストレスの増大が報告されている。本研究成果により、環境ストレスが増大した老化ヒト歯根膜細胞においては、損傷ミトコンドリアの標識システムとオートファジーによるクリアランスの異常が、損傷ミトコンドリアの蓄積の要因の一つであることが示唆された。これらの結果は、ミトコンドリアの機能維持とROS制御に基づく、新規の歯周病予防・治療法開発のための分子基盤の構築につながるものである。

研究成果の概要（英文）： Senescent human periodontal ligament cells (HPDLs) showed an increase of damaged mitochondria and a decrease of mitophagy. Furthermore, PARK2 gene expression, which is associated with damaged mitochondrial labeling, was decreased in senescent HPDLs, and mitophagy was partially activated by introducing PARK2 gene into senescent HPDLs. miRNAs involved in senescence and oxidative stress response, such as miR-137 and miR-181a, were highly expressed in senescent HPDLs, and introduction of these mimics into normal HPDLs caused ROS accumulation, while introduction of inhibitors into senescent HPDLs decreased ROS.

研究分野：歯周病学

キーワード：ミトコンドリア マイトファジー 歯根膜細胞 歯周病 老化

1. 研究開始当初の背景

歯周組織は通常時においても、口腔内細菌やメカニカルストレス、低酸素、浸透圧などの様々な環境ストレスに曝されている。そのため健康な歯周組織では恒常性を維持するために、様々な環境ストレスに適応した生体システムが備えられていると考えられる。歯周病の発症により、歯肉溝浸出液中での活性酸素種 (ROS) 代謝産物の増加が報告されており、歯周病の病態形成への ROS の関与が強く示唆されている。また、歯周病との強い関連が報告されている糖尿病や心筋梗塞の病態形成には、酸化ストレスの関与が大きいとされている。ROS の大部分はミトコンドリアの ATP 合成時に産生されるが、とりわけ、ダメージを受けた損傷ミトコンドリアより産生される過剰な ROS は、DNA、タンパクの酸化傷害を介して、細胞のアポトーシス、炎症を誘導することが明らかとされている。近年、このような損傷ミトコンドリアを選択的に分解・排除する恒常性維持機構としてオートファジーの一種類である、マイトファジーが注目されている。ミトコンドリアは細胞応答や分化に際して、融合と分裂によりダイナミックに形態が変化することが知られている。この融合により変異ミトコンドリア DNA や酸化タンパクが希釈されることで、ミトコンドリア活性が維持されるが、深刻なダメージを受けたミトコンドリアは、障害部位が分裂により切り離され、マイトファジーにより排除される。パーキンソン病においても、神経細胞におけるオートファジーの機能低下が損傷ミトコンドリアの蓄積を惹起し、過剰な ROS の産生を介して病態発症の一因となることが報告されている。

研究代表者は、*in vitro* の実験モデルより、オートファジーの機能低下が歯周組織、特に歯根膜細胞の ROS 増加に関与している可能性を蛍光イメージング解析より明らかとしている。歯周組織は様々な環境ストレスに常に曝されており、損傷ミトコンドリアの排除機構であるマイトファジーが、正常な歯周組織細胞の機能維持に重要な役割を担っていると考えられる。さらに、老化した歯根膜細胞ではオートファジーの機能が低下していることを明らかとしてきたが、これは老化細胞では『ミトコンドリアダイナミクス』が破綻していることを示唆するものである。したがって、歯周組織に特異的な ROS 制御機構を解明するために、歯根膜マイトファジーが損傷ミトコンドリアを選択的に排除するための標識メカニズムを明らかにすることが極めて重要であると考へた。

2. 研究の目的

老化細胞においては、オートファジー活性および代謝能の低下が報告されている。これらの低下は高齢患者の歯周組織において、口腔内細菌やメカニカルストレスなどの環境ストレスに対する適応力の減少を示唆する要因である。これまでに、オートファジーが口腔内細菌の上皮細胞への侵入排除に関与することは報告されているが、歯周病の病態形成や歯周組織の恒常性維持に果たすその役割については、未だ詳細な検討はなされていない。また、口腔内の細菌種や咬合ストレスなどの環境ストレスがミトコンドリアの融合・分裂に及ぼす影響を検討した報告はなされていない。

歯根膜細胞は、通常時も様々な環境ストレスに曝露されているのみならず、歯根膜-弾性線維組織の構築のためコラーゲンなどの細胞外基質タンパクを大量に産生する必要があり、エネルギー ATP 産生の中心であるミトコンドリアの恒常性の維持は極めて重要である。損傷ミトコンドリアが蓄積し過剰な ROS が産生されることは、歯周病の炎症に大きな影響を及ぼすものと考えられる。本研究では、ミトコンドリアの融合・分裂の分子機構に着目することで、歯根膜マイトファジーの引き金となる、歯周組織に特異的な「損傷ミトコンドリアの標識機構」と、歯周組織特異的なマイトファジーを解析することで、ミトコンドリアの機能維持と ROS 制御に基づく、新規の歯周病予防・治療法開発のための分子基盤の構築を目指した。

3. 研究の方法

歯周組織における損傷ミトコンドリアの標識機構を明らかにするため、環境ストレスが増大し ROS の蓄積が認められる老化ヒト歯根膜細胞を用いて解析を行った。

(1) 初代ヒト歯根膜細胞の *in vitro* 複製老化の誘導と、得られた老化ヒト歯根膜細胞を用いたイメージング解析

MitoTracker 染色による標識化および Timm22 抗体による細胞免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いてミトコンドリアの形態の観察を行い、膜透過性 JC-1 色素染色により、ミトコンドリア膜電位の変化を解析した。さらに、透過型電子顕微鏡解析により、ミトコンドリアの微細構造の観察を行った。また、pH 感受性蛍光プローブである mKeima-Red にミトコンドリア局在配列を連結

した mt-mkeima-Red を用いて、マイトファジーの評価を行った。

(2) 老化ヒト歯根膜細胞における損傷ミトコンドリアの標識機構の解析

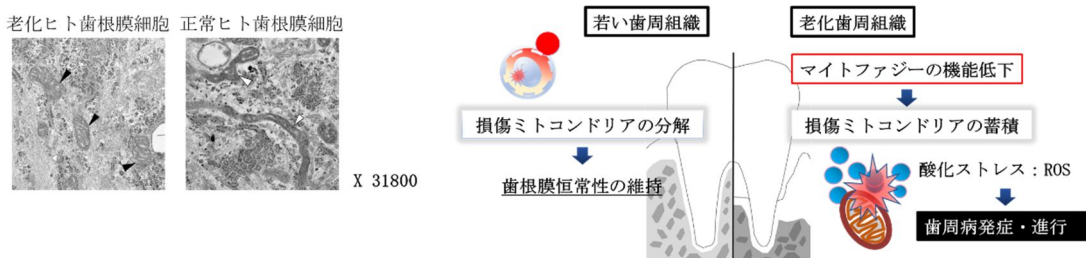
老化ヒト歯根膜細胞のマイトファジー関連遺伝子群の mRNA 発現を、qRT-PCR 法を用いて評価した。さらに、発現の低下した遺伝子を老化ヒト歯根膜細胞に導入して、マイトファジー機能の変化を評価するとともに、細胞内 ROS の変化を観察した。

老化ヒト歯根膜細胞の micro RNA(miRNA) 網羅解析により発現の増加を認めた miRNA の解析を行った。老化ヒト歯根膜細胞で発現量の増加が大きかった miRNA のうち、標的遺伝子 *FUNDC1* ならびに *PARK2* の制御を介してマイトファジーへの関与が報告されている miR-137 と miR-181a の模倣合成オリゴ(mimic)を正常ヒト歯根膜細胞に導入し、標的遺伝子の発現と、細胞内 ROS の解析を行った。一方、老化ヒト歯根膜細胞に miR-137 と miR-181a の阻害オリゴ(inhibitor)を導入して同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 初代ヒト歯根膜細胞の *in vitro* 複製老化の誘導により老化ヒト歯根膜細胞を得た。Timm22 抗体と MitoTracker 染色を用いたイメージング解析により、細胞老化が促進した老化ヒト歯根膜細胞においては、断裂ミトコンドリアが細胞核から離れて分布していることを明らかとした。また、共焦点イメージングにより、正常歯根膜細胞でみられた数珠状形態のミトコンドリアは老化歯根膜細胞では減少し、断片化して膨潤した異常形態のミトコンドリアが増大していることが観察された。さらに、透過型電子顕微鏡解析により、多くのミトコンドリアにおいてクリステ構造の異常が観察されるとともに、JC-1 標識によりミトコンドリア膜電位が脱分極した損傷ミトコンドリアの増加が確認された。これらの結果より、老化ヒト歯根膜細胞においては、膜電位が脱分極状態の異常ミトコンドリアの蓄積により、過剰な ROS が発生している可能性が示唆された。これらに一致して、老化ヒト歯根膜細胞の蛍光プローブを用いたイメージング解析により、シングルセルレベルでのマイトファジーの低下が明らかとなった。

以上より、マイトファジーの機能低下によって損傷ミトコンドリアが蓄積していることが示唆された。



(2) 老化ヒト歯根膜細胞では、損傷ミトコンドリアの標識に関する PINK1/Parkin 経路の Parkin をコードする *PARK2* 遺伝子発現の低下が観察され、*ATG5* などのオートファジー関連遺伝子群の発現の減少も確認された。

PARK2 を老化ヒト歯根膜細胞に導入することにより、マイトファジーが部分的に賦活化し、細胞内 ROS が減少することを確認した。

以上の結果より、ミトコンドリアの標識システムとオートファジーによるクリアランスの異常が、損傷ミトコンドリアの蓄積の要因の一つであり、老化ヒト歯根膜細胞における過剰な ROS 産生を引き起こすことが示唆された。

miR-137、miR-181a の mimic を正常ヒト歯根膜細胞に導入することにより、それぞれの標的遺伝子である *FUNDC1*、*PARK2* の発現減少と、ROS の蓄積が観察された。*FUNDC1* はマイトファジーへの関与が報告されている。反対に、miR-137、miR-181a の inhibitor を老化ヒト歯根膜細胞に導入することにより ROS の減少が観察された。

以上の結果より、老化ヒト歯根膜細胞における過剰な ROS 産生には、miRNA によるマイトファジー関連因子の制御機構が重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Tomomi, Yamashita Motozo, Ikegami Kuniko, Suzuki Mio, Yanagita Manabu, Kitagaki Jirouta, Kitamura Masahiro, Murakami Shinya	4. 巻 11
2. 論文標題 Autophagy facilitates type I collagen synthesis in periodontal ligament cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80275-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 康樹, 山下 元三, 池上 久仁子, 中村 友美, 西川 有彩, 森川 竜也, 北村 正博, 村上 伸也
2. 発表標題 NAD+依存性のミトコンドリアの異常が老化歯根膜における酸化ストレスに及ぼす影響
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------