

令和 4 年 5 月 27 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：20K18534

研究課題名(和文) 歯周組織の細胞老化におけるFerritinの病態生理学的意義

研究課題名(英文) Physiological and pathophysiological roles of ferritin for cellular senescence in periodontal tissue

研究代表者

池上 久仁子 (Ikegami, Kuniko)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80779116

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)：加齢は歯周病の進行における重要なリスク因子の一つと考えられている。一般に加齢に伴う疾患の増悪には、「細胞老化」が関与しており、歯周組織においても加齢に伴う老化細胞の増大が観察される。申請者らは歯周組織の老化細胞において、有害な二価鉄を無害な三価鉄に還元するタンパクである、Ferritinの発現増加を見出した。生体内の鉄は、エネルギーの生産など恒常性維持にとり重要であるが、過剰な鉄は活性酸素を過産生し、組織障害をもたらすことが知られている。本研究では、歯周組織におけるFerritin-鉄代謝の生理的役割を検討し、高齢者に特有の歯周病の病態生理に及ぼす影響を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜は、歯周組織の修復・再生にとり重要な組織である。老化ヒト歯根膜細胞ではFerritinの発現異常により、細胞内の貯蔵鉄の恒常性維持が破綻することで活性酸素(ROS)が増加している可能性が示唆された。また、老化ヒト歯根膜細胞ではミトコンドリアにおけるクリステの形態異常を認めた。鉄の一部はミトコンドリア内膜に局在することから、マイトファジーに異常をきたした老化細胞内では異常ミトコンドリアが蓄積し、過剰なROSを産生している可能性が示唆された。Ferritin異常を原因とする歯根膜細胞の酸化ストレスは、高齢者の歯周病の有用な治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aging is considered one of the most important risk factors in the progression of periodontal disease. Generally, "cellular senescence" is involved in the progression of age-related diseases, and an increase in the number of senescent cells is observed in periodontal tissue with aging. We found increased expression of ferritin, a protein that reduces toxic divalent iron to harmless trivalent iron, in senescent cells of periodontal tissues. Iron in the body is important for homeostasis, such as energy production, but excess iron is known to overproduce reactive oxygen species (ROS) and cause tissue damage. In this study, we investigated the physiological role of ferritin-iron metabolism in periodontal tissues and revealed its influence on the pathophysiology of periodontal disease in the elderly ones.

研究分野：保存治療系歯学関連

キーワード：歯周病 細胞老化 歯根膜細胞 Ferritin 鉄

1. 研究開始当初の背景

超高齢化が急速に進行する日本においては、平均寿命の延長とともに、難治性の老化関連疾患の罹患率が急上昇し、老化関連疾患を治療する新薬、治療法開発による健康寿命の延長は社会的な課題である。実際に、申請者は、伊丹市における高齢者 2000 人の健康長寿研究(SONIC)の疫学調査を通じて、歯周病との関連が考えられている、糖尿病や心筋梗塞、関節リウマチ等の病態の相関係数が高齢者において顕著に増加することを経験した。そこで、各々の病気に特異的に対処するのではなく、加齢性の臓器機能障害に共通の基盤病態となる生物学的な「老化」が、老化関連疾患の克服には必要との着想に至った。

加齢に伴い機能不全に陥った各種の臓器において、細胞増殖の停止した老化細胞の蓄積が認められる。そして細胞レベルでの老化である「老化細胞」が生体の加齢に伴う臓器の機能低下の原因として、有力視されている。糖尿病や冠動脈疾患、関節リウマチなどの加齢性の慢性疾患においては、原因となる肝臓、血管、軟骨組織において臓器の老化が認められる。申請者は、老化歯根膜細胞のプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析を行い、高齢者の歯周組織に老化細胞が存在すること、さらには歯周病重篤化の病因論として細胞老化が関与していることを示唆する研究報告をしている。また、歯周組織の老化関連分子のスクリーニングにより、ヒトの老化歯根膜細胞における Ferritin の顕著な発現増加を自ら見出ししている。Ferritin は、血清中に多く含まれ、肺や肝臓などに広く分布するタンパクである。Ferritin Light Chain(FTL)、Ferritin Heavy Chain(FTH)からなる 24 個のシェル構造を呈し、細胞質内の有害な二価鉄を無害な三価鉄に還元し貯蔵する役割を担う。哺乳類の細胞は、鉄過剰時には Ferritin の発現を増加させ、余剰な鉄を安全に貯蔵することで鉄の細胞毒性を回避している。興味深いことに、申請者の所属する研究室で実施した歯根膜細胞の遺伝子の網羅解析により、Ferritin は発現上位の遺伝子であったことから (Ozaki N. et al., J Dent Res, 2016)、Ferritin が歯周組織の恒常性維持に重要であると考えられる。また、Ferritin-鉄代謝は、活性酸素 (Reactive Oxygen species: ROS) の産生をはじめとした細胞老化機構を担うことから、老化歯根膜細胞における Ferritin の病態生理学的意義を解明することは、高齢者の歯周組織の恒常性維持、歯周病病態形成を理解する上で極めて重要である、との問いを得た。また、レッドコンプレックスに分類される *Porphyromonas gingivalis*(P.g.)は鉄要求性の歯周病原性細菌であるため、歯周組織における鉄の蓄積は感染の増大につながると予想された。また、P.g.は病原細菌の分解処理過程である、オートファジーから脱出する機構を備えているため、老化に伴いオートファジーが低下すると歯周病の病態形成および増悪に影響を及ぼす可能性も高いと予想された。したがって、歯周組織の細胞老化、および細菌感染を、Ferritin-鉄に注目して解明する本研究課題に着想した。

2. 研究の目的

Ferritin は歯根膜細胞の硬組織形成 (Hou J. et al., BBRC, 2012)、炎症性サイトカイン産生 (Huang W. et al., Clin Sci, 2019)への関与の報告がなされているが、歯周組織の ROS 代謝ならびに他の機能、とりわけ細胞老化に関しての Ferritin の生理作用は未だ不明である。そこで本研究では、老化歯根膜細胞における Ferritin の発現制御機構、分解機構、生理作用について解析を行い、歯周病の病態形成における役割について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ヒト歯根膜細胞の老化が Ferritin に与える影響についての解析
- (2) Ferritin が老化ヒト歯根膜細胞の細胞性機構に与える影響についての解析
- (3) 老齢の実験的歯周炎動物モデルにおける Ferritin-鉄の生理作用の *in vivo* 解析
- (4) 老齢の実験的歯周炎動物モデルにおいて、Ferritin-鉄制御による治療薬開発のための *in vivo/vitro* 実験

4. 研究成果

2020 年は、Ferritin-鉄の制御機構をヒト歯根膜細胞の *in vitro* 複製老化過程において検討した。初代ヒト歯根膜細胞(HPDL)の複製老化の誘導により、老化 HPDL を得た。誘導した老化 HPDL は、継代数の少ない正常 HPDL (継代数<10)と比較し、Ferritin の構成タンパクである FTL と FTTH の遺伝子発現ならびにタンパク発現が増加していることを確認した。

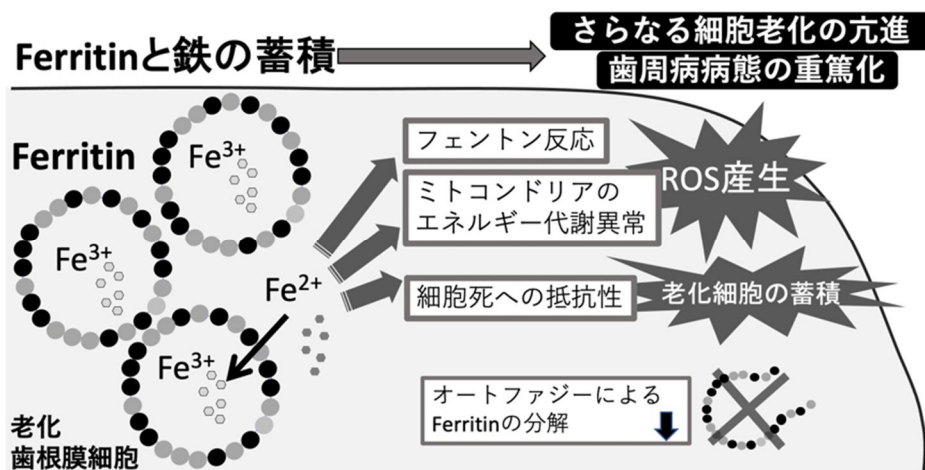
次に、他の鉄代謝に関わる分子の発現を検討した。細胞内への鉄の取り込みを担うトランスフェリンレセプター (TfR1) の遺伝子発現ならびにタンパク発現は、正常 HPDL と比較し老化 HPDL において増加を認めた。鉄の排出に関わるフェロポーチン (FPN) の遺伝子発現は、正常 HPDL と比較し老化 HPDL において増加を認めた。生体内では TfR1 と Ferritin の発現を細胞の鉄存在量に応じて変化させ、鉄不足・鉄過剰状態を生じないように調整している。本来、鉄

過剰状態であれば TfR1 が減少し、Ferritin が増加するが、老化 HPDL では、TfR1 と Ferritin の両方が逆説的に増加している。これらの結果より、HPDL の老化が鉄の蓄積ならびに代謝に関連する恒常性タンパク質の発現変動に関連していることが示唆された。

次に、Ferritin が老化ヒト歯根膜細胞の細胞性機構に与える影響についての解析を行った。鉄の蓄積量が低い正常 HPDL に鉄の添加を行ったところ、FTH のタンパク発現が増加し、鉄キレート剤である Deferoxamine(DFO)の添加によりその発現は低下した。また、TfR1 のタンパク発現は鉄の添加により減少し、DFO の添加によりその発現は増加した。以上のことから、老化に伴う Ferritin の変動の原因は、細胞質中の鉄の変動のみが原因ではなく、他の機構が関与する可能性が示唆された。

2021 年は、前年度に引き続き、Ferritin-鉄の制御機構を HPDL の *in vitro* 複製老化モデルを用いて検討した。老化 HPDL における Ferritin の発現の上昇の原因の一つに、Ferritin の分解機構の低下が考えられた。Ferritin の分解機構の一つにオートファジーが報告されている (Asano T. et al., Mol Cell Biol, 2011)。そこで、正常 HPDL にオートファジー阻害剤 Bafilomycin A1(BafA1)を添加したところ、Ferritin のタンパクレベルでの発現増加を認めた。故に老化 HPDL においてはオートファジー機能が低下し、Ferritin の分解が抑制された結果、発現上昇している可能性が示唆された。細胞老化にともなう Ferritin - 鉄 - 酸化ストレスの関係を明らかにするために、まず、細胞質内 ROS 検出試薬の CMH2DCFDA を用いて染色し検討したところ、老化 HPDL は正常 HPDL と比較し ROS の発現増強を認めた。このことから、老化 HPDL は酸化ストレス負荷状態であることが明らかとなった。HPDL の老化に伴い IL-6 などの老化関連分泌(Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP)タンパクが増加することはすでに報告しているが、正常 HPDL に鉄を添加すると、IL-6 の遺伝子発現は増加し、それは鉄のキレート剤である DFO の添加により抑制された。このことから、老化 HPDL においては細胞質内における貯蔵鉄の増加が、ROS の発現のみならず、IL-6 などの SASP タンパク発現といったさらなる老化形質の出現に関与していることが示唆された。また、ミトコンドリアの透過型電子顕微鏡を用いた画像解析の結果より、老化 HPDL ではミトコンドリアにおけるクリステの形態異常を認めたことから、老化 HPDL においては異常ミトコンドリアが除去されずに蓄積している、すなわちマイトファジー機能が低下している可能性が考えられた。そこで、細胞質内の鉄の局在を解析するため、ミトコンドリア内の鉄を染色する試薬 Mito-Ferro Green と、ミトコンドリアを染色する試薬 Mito Bright LT Red で共染色したところ、鉄の一部はミトコンドリア内に局在する傾向を認めた。以上のことより、老化歯根膜細胞ではマイトファジーに異常をきたすことで、異常ミトコンドリアが蓄積し、さらに過剰な鉄が触媒になって ROS の発生が助長される可能性が示唆された。

次に、高週齢マウスを用いた実験により、*P.g.*細菌非感染性に歯槽骨吸収を伴う歯周病の *in vivo* 老化性炎症の歯周病病態モデルの構築を行った。実際に、高週齢マウスは若齢マウスと比較し、micro CT を用いた解析により歯槽骨吸収が進行していること、組織切片を用いた免疫組織学的解析により老化マーカーである SA-beta GAL と p16 が上昇していることを確認した。次にマウスの第二臼歯に絹糸を結紮することで咬合性外傷モデルを構築し、micro CT を用いて歯槽骨の吸収を計測すると、高週齢マウスは若いマウスと比較し、有意な歯槽骨吸収を認めた。現在、*in situ hybridization* にて、Ferritin、p16 の発現をモニタリングするプローブを設計し、歯周組織における Ferritin の発現と鉄代謝の関連について検討している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 池上 久仁子, 山下 元三, 三木 康史, 久留島 悠子, 高阪 貴之, 鈴木 美麻, 榎木 香織, 松田 謙一, 北村 正博, 池邊 一典, 大阪ツインリサーチグループ, 村上 伸也	4. 巻 63
2. 論文標題 高齢双生児の歯周病病態と遺伝・環境要因の影響度	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 236 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shikahozon.63.236	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 -

1. 著者名 沢田啓吾 北村正博 長谷川詩織 森本千晶 平井麻絵 今井昂 川寄公輔 橋本康樹 麻生桃子 辻井翔一 野田亜利紗 花田滉輔 政近健司 藤田翔子 鈴木美麻 八木寛子 池上久仁子 山本智美 森健太 中村友美 小笹匡雄 北垣次郎太 岩山智明 柏木陽一郎 藤原千春 三木康史 竹立匡秀 山下元三 野崎剛徳 村上伸也	4. 巻 63
2. 論文標題 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) 製剤を用いた歯周組織再生療法の治療成績	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 219 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shikahozon.63.219	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 -

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池上久仁子, 山下元三, 三木康史, 鈴木美麻, 西川有彩, 橋本康樹, 森川竜也, 竹下登, 池邊一典, 北村正博, 村上伸也
2. 発表標題 高齢者双生児研究に基づく歯周病病態に関連する遺伝・環境要因の解析
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Koji Miki, Arisa Nishikawa, Kouki Hashimoto, Tatsuya Morikawa, Noboru Takeshita, Kazunori Ikebe, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami.
2. 発表標題 Genetic and Environmental Factors on Periodontitis in Elderly Twins.
3. 学会等名 第106回アメリカ歯周病学会共催 日本歯周学会・日本臨床歯周病学会2020年大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池上久仁子 沢田啓吾 長谷川詩織 三木康史 竹立匡秀 山下元三 野崎剛徳 北村正博 村上伸也
2. 発表標題 大阪大学歯学部附属病院における塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）製剤を用いた歯周組織再生療法の臨床成績
3. 学会等名 特定非営利活動法人 日本臨床歯周病学会 第8回JACP関西支部・大学合同研修会
4. 発表年 2020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
---------	---------