

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23109

研究課題名（和文）内在性MSCsの免疫調節能障害メカニズムの解明とインプラント周囲炎の新規治療戦略

研究課題名（英文）Elucidation of the Immune Regulatory Dysfunction Mechanisms of Intrinsic MSCs and Novel Therapeutic Strategies for Peri-implantitis

研究代表者

黄野 頂策（Kohno, Teisaku）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：60882644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、急性の歯周炎症を惹起させるマウス結紮モデルを用いて、免疫系が未成熟である5週齢と中高齢である50週齢を比較したところ、加齢によって歯槽骨破壊が重症化することが分かった。本研究の結果より加齢に伴うMSCs機能の低下が、マクロファージのオートファジー活性を抑制できずに歯槽骨破壊進行を助長させる可能性が示唆された。本研究では、加齢に伴うマクロファージのオートファジー活性亢進と間葉系幹細胞機能の低下が歯周病を重症化させる可能性を示す新しい知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、急性の歯周炎症を惹起させるマウス結紮モデルを用いて、免疫系が未成熟である5週齢と中高齢である50週齢を比較したところ、加齢によって歯槽骨破壊が重症化することが分かった。本研究の結果より加齢に伴うMSCs機能の低下が、マクロファージのオートファジー活性を抑制できずに歯槽骨破壊進行を助長させる可能性が示唆された。本研究では、加齢に伴うマクロファージのオートファジー活性亢進と間葉系幹細胞機能の低下が歯周病を重症化させる可能性を示す新しい知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, using a mouse ligature model that induces acute periodontal inflammation, we compared 5-week-old mice with immature immune systems to 50-week-old mice with aged immune systems and found that age-related exacerbation of alveolar bone destruction occurs. Our results suggest that the decline in MSCs function with age may contribute to the progression of alveolar bone destruction by inhibiting macrophage autophagy activity. We obtained new insights indicating that the age-related increase in macrophage autophagy activity and the decline in mesenchymal stem cell function may exacerbate periodontal disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：マクロファージ オートファジー 間葉系幹細胞 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

近年、加齢に伴う内在性間葉系幹細胞 (MSCs) の機能変化が、老化関連疾患の形成や重症化に関与する可能性が示唆されるようになった。しかし、その詳細はほとんど明らかにされていない。

我々の研究グループでは、これまで、加齢に伴い中高年で、歯周炎に関連した歯周組織破壊の頻度が高いことに着目し、内在性 MSCs の機能低下と歯周組織破壊の関連性について検討してきた。すなわち、高齢マウス骨髄由来 MSCs では、細胞走化性、骨芽細胞分化能、Fas・Fas リガンドによる細胞死誘導能が著しく低下しており、炎症局所への MSCs の集積能の低下と免疫調節不全をもたらす、歯周組織破壊を進行させるという可能性が示唆されてきた。

一方で、細胞内消化システムの一つであるオートファジーは、全身性エリテマトーデスなどの炎症性自己免疫疾患でその活性が上がることで知られており、特に T 細胞やマクロファージ、破骨細胞におけるオートファジー活性の抑制が、新たな治療ターゲットとして研究が進められている。我々の研究グループでも実験的マウス歯周炎モデルにおいて、歯周組織でのオートファジーの活性化、ならびに、オートファジー抑制ペプチド投与による歯槽骨破壊の抑制を報告してきた (Akiyama et al. 2022)。しかし、宿主の加齢による歯周炎の重症化とオートファジー活性の関わりや、加齢による内在性 MSCs 機能の変化がこれらにどのように関連するかについては、いまだ推測の域を出ない。

2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴う歯周炎の重症化、特に歯周組織破壊の進行に、オートファジー活性や内在性 MSCs 機能がどのように関わるかを明らかにするために、マクロファージと内在性 MSCs の炎症局所への集積状況を、若齢と高齢マウスを用いた実験的マウス歯周炎モデルを用いて組織学的に検討した。また、若齢と高齢の歯周炎モデルマウスから採取した顎骨由来マクロファージのオートファジー活性の差を検討し、マクロファージの実験的極性変化や MSCs との間接共培養が、マクロファージのオートファジー関連遺伝子の発現にどのように影響するかを *in vitro* にて検討した。

3. 研究の方法

既報 (Aung et al., 2020) に従い、若齢と高齢のマウス (C57BL/6J, メス, 5 および 50 週齢) の下顎第一臼歯に 5-0 絹糸を結紮して実験的歯周炎モデルを作製し、非結紮群を対照群とした (各群 n=3~5)。実験群は、結紮 3, 7, 10, 14 日後に屠殺し、 μ CT 解析による骨組織破壊の評価、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ [TRAP] 染色、マッソントリクローム染色にて組織形態学的解析を行った。また、1 型マクロファージ (M1)、2 型マクロファージ (M2)、および、内在性 MSCs の経時的な集積を、蛍光免疫染色にて検出した。さらに、各週齢マウスの下顎骨から単離した F4/80 陽性マクロファージのオートファジー関連遺伝子 (*Beclin1*, *Lc3*, *P62*) の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて評価するとともに、5 週齢および 50 週齢の骨髄由来 MSCs と 5 週齢骨髄由来マクロファージを共培養し、MSCs がマクロファージのオートファジー関連遺伝子発現 (*Beclin1*, *Ulk 1*, *Lc3*, *P62*) に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 法にて比較・検討した。各データの統計学的有意性は、一元配置分散分析および Tukey の多重比較検定にて

解析した。

4 . 研究成果

マイクロ CT 解析の結果, 5 週齢, 50 週齢の両群で, 結紮した下顎第一臼歯の歯根分岐部関心領域におけるエックス線不透過性領域の面積割合は, 結紮直後から結紮 14 日後にかけて減少傾向にあり, 7 日後および 10 日後では, 5 週齢と比較して, 50 週齢群でそれぞれ有意に低い結果であった。マッソントリクローム染色においても, マイクロ CT 解析結果と同様に, 下顎第一臼歯の歯根分岐部関心領域における歯槽骨組織は結紮後, 少しずつ吸収し, 残存した面積の割合は, 結紮 7 日後, 10 日後において, 5 週齢と比較して, 50 週齢群で, 有意に低いことが示された。

M1 マーカーである CD80 蛍光免疫染色では 5 週齢, 50 週齢の両群ともに, 誘導開始後 0 日目から 10 日目にかけて経時的に陽性細胞数が増加し, 10 日目にピークを迎え, 14 日目に減少した。観察期間中, 全てのタイムポイントで, 50 週齢群における CD80 陽性細胞数が高い傾向にあり, 特に, 結紮 3, 7, 10 日後では 5 週齢群と比較して 50 週齢群で有意に高かった。同様に, MSCs マーカーである PDGFR α 蛍光免疫染色においても, 5 週齢群では結紮直後から結紮 10 日後にかけて陽性細胞数が増加し, 10 日目でピークを迎えた。その一方で, 50 週齢群では, 陽性細胞数がわずかに増加しているものの, 3 日目以降で有意な増加は認められなかった。また, 観察期間中, 結紮 3, 7, 10 日後において, 5 週齢群と比較して 50 週齢群で有意に陽性細胞数が少なかった。TRAP 染色による破骨細胞の検出では, 5 週齢, 50 週齢の両群とも, 結紮直後から結紮 10 日後にかけて, 経時的に陽性細胞数が増加し, 結紮 14 日後では減少した。観察期間中, 5 週齢群では, 50 週齢群と比較して, 陽性細胞数が低い傾向にあり, 結紮 7, 10 日後で有意に低かった。M2 マーカーである CD206 蛍光免疫染色では, 観察期間中, 全ての群間で有意な差は認められなかった。

歯周炎モデルの下顎骨由来 F4/80 マクロファージのオートファジー関連遺伝子(*Beclin1, Lc3, P62*)の発現は, 両群ともに経時的に上昇することがわかり, これらの全ての遺伝子は, 7 日目では 50 週齢群が 5 週齢群と比較して有意に高く発現していた。

宿主の加齢が, マクロファージの極性変化におけるオートファジー活性にどのように影響するのかを検討するため, *in vitro* にて骨髓由来マクロファージ単体, もしくは MSCs との間接共培養を行ない, オートファジー関連遺伝子 (*Beclin1, Ulk1, Lc3, P62*) の発現を検討したところ, 5 週齢, 50 週齢群ともに, M0 から M1 に分化することでオートファジー関連遺伝子の発現が上昇する傾向が観察され, 50 週齢における発現は, 5 週齢と比較して有意に高い結果となった。一方で, M0 から M2 への分化では, 5 週齢では発現に大きな変化は認められなかったものの, 50 週齢において *Ulk1, Lc3* 遺伝子発現が上昇し, 5 週齢と比較しても有意に高かった。さらに, マクロファージの極性変化に伴うオートファジー関連遺伝子の発現に, MSCs がどのように影響するのかを検討したところ, 5 週齢由来 MSCs と間接共培養した M1 群では, 共培養しなかった群と比較して, *Beclin1, P62* の遺伝子発現が有意に抑制されており, 50 週齢由来 MSCs と共培養した群では発現が抑制されることはなかった。また, いずれの週齢由来 MSCs と共培養した M2 群では, オートファジー関連遺伝子の発現に変化は認められなかった。

本研究では, 若齢と高齢の実験的マウス歯周炎モデルを用いて, 加齢によるマクロファージや破骨細胞, 内在性 MSCs の炎症巣への集積状況を組織学的に検討し, また, マクロファージのオートファジー活性や内在性 MSCs 機能の変化が, 歯周組織破壊進行にどう関連するのかについて検討した。その結果, 若齢, 高齢の両群ともに, 経時的な歯根分岐部残存骨面積の減少が観察され, ほとんどの場合において高齢マウスで有意に残存骨面積が減少していた。M1, MSCs の集積は, 残存骨面積の減

少が少なかった若齢群においてM1の集積が少なく、反対にMSCsが多く集積する像が観察された。

歯周炎モデル由来マクロファージのオートファジーの変化についても、高齢のマウスでオートファジー関連遺伝子である (*Beclin1*, *Lc3*, *P62*) の発現が高く、実験的に骨髄由来マクロファージをM1に極性変化させた場合においても、オートファジー関連遺伝子の発現が上昇したことから、高齢マウスでは、M1の活性化による炎症性サイトカインの過剰産生が、細胞内消化システムであるオートファジー、特にオートファゴソームの形成を促進させるのではないかと考えられた。さらに興味深いことに、*in vitro*での高齢MSCsとの間接共培養では、M1極性変化によるオートファジー関連遺伝子の発現を抑制することができなかったことから、MSCs機能の低下は、M1のオートファジー活性の抑制に失敗し、*in vivo*においても、加齢による内在性MSCsの機能低下は、炎症局所でのマクロファージのオートファジーを十分に抑制できずに歯周組織破壊を促進する可能性が考えられた。

今後は、宿主の加齢に伴うオートファジー活性の上昇メカニズムや、内在性MSCs由来のどのような液性因子が、オートファジー関連遺伝子の発現を抑制し、歯周組織破壊を抑制するのか、更なる検討を行っていきたい。

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 0件）

1. 著者名 黄野頂策	4. 巻 -
2. 論文標題 加齢が歯周病態、マクロファージのオートファジーと間葉系幹細胞に与える影響とそれらの関連	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 岡山歯学会誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔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
---------	---------