

機関番号：32622

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792130

研究課題名 (和文) 骨・歯周組織における SIRT1 の機能解明

研究課題名 (英文) The elucidation of function of SIRT1 on bone and periodontal tissue

研究代表者

高田 貴虎 (TAKADA TAKATORA)

昭和大学・歯学部・普通研究生

研究者番号：20384323

研究成果の概要 (和文) : Sirt1 は老化プロセスの regulator として知られている。今回、我々は、歯周組織を構成する歯肉上皮細胞と破骨細胞における Sirt1 の機能を検討した。歯肉上皮細胞において、LPS 処理により Sirt1 の発現は増強された。また、LPS による TNF- α の増強に Sirt1 の関与を調べた。LPS 処理により、TNF- α の産生とその下流の NF- κ B の転写活性が増加したが、Sirt1 の阻害剤である sirtinol を加えると、LPS によって誘導された TNF- α 産生が抑制された。次に、破骨細胞形成 assay における Sirt1 の機能を解明するために、Sirt1 を活性化する resveratrol を加えた。resveratrol は RANKL の誘導する破骨細胞形成数を増強した。Sirt1 の活性化が破骨細胞形成を抑制するのかを明らかにするために、破骨細胞関連遺伝子発現を網羅的に調査した。すると、Cathepsin K や NFATc1 などのいくつかの遺伝子発現が有意に抑制されていた。

研究成果の概要 (英文) : Sirt1 is known as regulator of the aging process. We examined a function of Sirt1 in gingival epithelial cells and osteoclasts which constituted periodontium. In a gingival epithelia cell, LPS increased the levels of Sirt1. We examined the role of Sirt1 for the production of TNF - α by LPS in gingival epithelial cells. Although LPS increased TNF - α and NF- κ B activation, sirtinol, sirt1 inhibitor prevented LPS-induced TNF - α . On the other hand, we treated resveratrol, Sirt1 activator in osteoclast formation assay to elucidate a function of Sirt1 in osteoclastogenesis. Resveratrol increased the number of RANKL-induced osteoclasts. We investigated osteoclast-related gene expression using microarray system to clarify whether activation of Sirt1 controlled the osteoclast formation. The levels of cathepsin K and NFATc1 gene expression were significantly decreased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

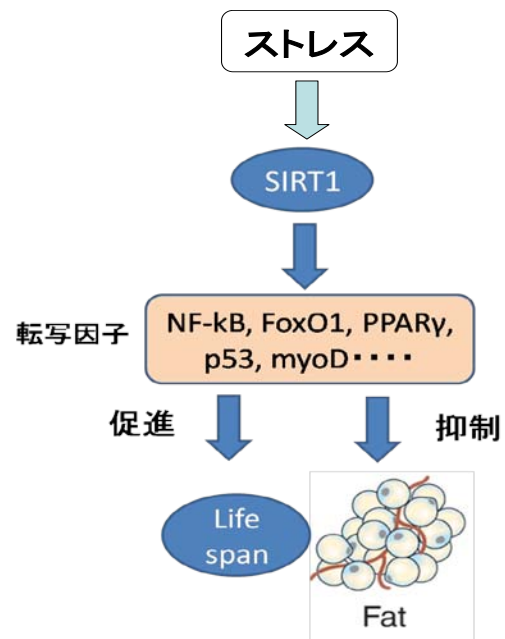
キーワード：①SIRT1 ②骨代謝 ③歯周組織

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯槽骨の吸収による歯牙の欠落を主症状とする骨疾患である。現在、成人の約80%が罹患しており、国民病の観を呈してきている。また、複数の遺伝子的要因・並びに環境的要因が重なり合い発症することから生活習慣病としてもとらえられている。なかでも肥満は歯周病に罹患しやすくなる要因の一つと知られている。BMI値21.9以下の集団を基準にした場合、BMI値が25~29.9の集団（軽度肥満）は3.4倍、BMI値が30以上の集団（重度肥満）は8.6倍歯周病に罹患しやすいことが知られている(Saito T et al., New England Journal of Medicine, 1998)。また、血中のコレステロール値との相関も数多く報告されている。歯周病に罹患している患者では血中のLDL (low density lipoprotein)やトリグリセリド（中性脂肪）値が歯周病に罹患していない者に比較して有意に高値を示した(Lowsche W et al, Journal of Clinical Periodontology, 2000)。さらに、最近、これらの疫学的研究に加え、ラットに高脂肪食を摂取させると標準食を摂取させるのラットに比べ歯周病を発症しやすく、加えて、細菌の内毒素を投与した場合には歯周病の診断基準である付着の喪失が著しく起こることが報告されている。

サーチュインは、バクテリアからヒトまで広く保存されているNAD依存性脱アセチル化酵素で、寿命延長作用を持つことが知られている。最初に発見されたものは酵母のSir2で、ヒトのサーチュインは7種類（SIRT1~SIRT7）知られており、ヒトのSIRT1は、酵母のSir2に高い相同性を示す。サーチュインは細胞における栄養状態やストレスに反応して様々なタンパク質を脱アセチル化する。例えば、遺伝子保護物質であるヒストン（DNA結合制御たんぱく質）のアセチル化：分解を防ぐのである。その他にサーチュインにより脱アセチル化されるものとして、アセチルCoA合成酵素、 α -チューブリン、myoD、p53、FOXO3などが知られており、これらのタンパク質・転写因子のアセチル化状態を調節することによってその働きを制御している。また、サーチュインの寿命延長作用はインスリン/IGFシグナル伝達系を介していることが分かっているが、どのタンパク質にどのように作用しているのかは明らかになっていない。酵母や線虫、ショウジョウバエにおいてサーチュインを過発現させると寿命が延長することから、サーチュインは老化プロセスのregulatorとして重要な働きをしている

ことが推察される。サートリス薬品（米国マサチューセッツ州）によりSIRT1を強力に活性化させる化合物SIRT1720が製作された。遺伝的肥満体質のマウス、高脂肪食餌で飼育された肥満マウス、ヒトのI I型糖尿病に見られるようなインスリン代謝に異常のある変異マウスにSIRT1720を4週間投与したところ、マウスのインスリン応答、血中グルコースの濃度低下、細胞内ミトコンドリアの数や活性に著しい改善が見られた。すなわち、SIRT1720が糖尿病だけではなく、コレステロール代謝疾患の治療薬となる可能性が示唆された。(C. H. Westphal et al., Nature, 2007)



先述した通り、高コレステロールは歯周病を憎悪させることから、これを抑制するSIRT1の活性化は歯周病の進行・憎悪を抑制する可能性も考えられる。しかし、骨代謝を制御する骨芽細胞・破骨細胞におけるSIRT1の発現は認められるものの、その機能に関しては不明である。また、さらに歯周組織におけるその発現・機能並びに歯周病病態における役割も全く不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は本研究の目的は骨・歯周組織におけるヒストン脱アセチル化酵素サーチュイン(SIRT1/Sir2)の発現・機能について調査し、歯周病病態におけるその役割並びに治療方法手段としての可能性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1. SIRT1の強制発現、並びに siRNA を用いたノックダウンを行うことにより破骨細胞における SIRT1 の機能を解明する

①破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞、並びにマウス脾臓から採取した脾臓細胞を M-CSF で3日間培養し、マクロファージにまで分化させ RANKL, M-CSF 存在下で破骨細胞に分化する細胞株 RAW264.7 細胞並びに破骨細胞前駆細胞から得られた破骨細胞より RNA、蛋白質を抽出し、SIRT1 の発現を real time PCR 並びに western blotting にて確認する。

②骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞、並びにマウス脛骨から採取した骨髄細胞を M-CSF で3日間培養し、マクロファージにまで分化させた細胞(破骨細胞前駆細胞)に SIRT1 を強制発現、もしくは siRNA により SIRT1 の発現をノックダウンし、M-CSF, RANKL 存在下での破骨細胞分化に対する影響を検討する。また、形成された破骨細胞の機能に対する影響を評価するために、デンティンスライス上に SIRT1 を強制発現もしくはノックダウンした細胞を播種し破骨細胞を形成させ、形成された吸収の大きさを顕微鏡下で計測する

③Sirt1 による破骨細胞分化の制御機構を解明する。AP-1, c-Fos, NFATc1, NF-kB などの代表的な破骨細胞分化に関連する転写因子との結合を promoter assay 並びに免疫沈降法にて確認する。

2. LPSによる Sirt1 の制御の解明

歯肉上皮細胞を LPS で処理し、Sirt1 の発現の挙動を観察する。LPS 処理による炎症性サイトカインの産生に Sirt1 が関与するか否かを検討し、そのメカニズム・下流についても詳細に調べる。

4. 研究成果

①歯肉上皮細胞における Sirt1 の機能

歯肉上皮細胞株 Ca9-22 に LPS(lipopolysaccharide)で処理し、Sirt1, Sirt2 遺伝子の発現挙動を観察した。LPS 処理により Sirt1, Sirt2 の mRNA 発現はコントロール群に比較して有意に減少した。また、LPS 投与により NF-kB の活性化を経て、Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α)の産生が増強されることが知られている。歯肉上皮細胞においても同様な事象が生じるかを検討した。最初に、ELISA 法にて TNF α の産生量を測定した。LPS10 μ g/ml 投与により、TNF α 産生量は有意に増加した。次に、Ca9-22 細胞に NF-kB luc をトランスフェクションし、

そのルシフェラーゼ活性を測定することにより、NF-kB の転写活性を評価した。LPS にて刺激したところ、NF-kB 転写活性は TNF α と同様に有意に上昇した。この TNF α 産生の増加に Sirt 分子が関与しているか否かを検証するために、Sirt1 の阻害剤である sirtinol を処理し、その効果を観察した。Sirtinol の添加により、LPS によって誘導された TNF α 産生の増加と NF-kB の転写活性の上昇が阻害された。以上のことより、LPS に誘導される NF-kB 活性化を介した TNF α の産生増加は Sirt1 分子の発現低下によって生じている可能性が示唆された。

②破骨細胞における Sirt1 の機能

Sirt1 の活性化することが知られている resveratrol を破骨細胞形成 assay に使用した。Resveratrol は予想通り破骨細胞前駆細胞 Raw264.7 細胞における Sirt1 の発現を増強した。さらに、RANKL 添加による破骨細胞形成 assay に resveratrol を加え、その影響を観察した。その結果、対照群に比較して、resveratrol 処理群では有意に破骨細胞形成が抑制されていた。マウスの骨髄細胞を用いた破骨細胞形成 assay においても、resveratrol で処理することにより、破骨細胞形成は抑制された。どのような機序で Sirt1 の活性化が破骨細胞形成を抑制するのかを明らかにするために、破骨細胞関連遺伝子発現を網羅的に調査した。すると、Kathepsin K や NFATc1 などのいくつかの遺伝子発現が有意に抑制されていた。以上の結果より、Sirt1 は破骨細胞関連遺伝子発現を低下させることにより、破骨細胞形成を抑制することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Nojima J, Kanomata K, Takada Y, Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Takada T, Tsukui T, Yamamoto TS, Sasanuma H, Yoneyama K, Ueno N, Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T, Katagiri T Journal of Biological Chemistry 査読有 285(20) 2010 15577-86

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]
ホームページ等
<http://www10.showa-u.ac.jp/~perio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 貴虎 (TAKADA TAKATORA)
昭和大学・歯学部・普通研究生
研究者番号：20384323

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し