

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03131

研究課題名（和文）M オートファジー異常から見た歯周病やインプラント周囲炎の新規治療戦略

研究課題名（英文）New treatment strategies for periodontal disease and peri-implantitis from the point of Macrophage autophagy abnormality

研究代表者

秋山 謙太郎 (Akiyama, Kentaro)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70423291

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病の歯槽骨破壊形成メカニズムを、M のオートファジー異常の観点から捉えるとともに、オートファジー正常化ペプチドであるP140による炎症性サイトカイン産生抑制メカニズムを検討したところ、実験的マウス歯周病モデルにおいて、歯周病誘導後10日で著明な炎症性マクロファージM1、TNF- α の蓄積とともにオートファジーの亢進が認められた。P140投与によってM1、TNF α 、オートファジー活性の全てが抑制された。また、*in vitro*でのオートファジー活性化により炎症性サイトカイン遺伝子の発現が亢進したことから、オートファジー関連遺伝子によるTNF α 産生の制御機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病の悪化メカニズムとして、体内に存在するマクロファージの活性化の観点から検討したところ、マウス歯周病モデルではマクロファージの細胞内消化システムであるオートファジーが異常に活性化されていることが明らかになった。オートファジーを抑制する薬剤の投与によって、マクロファージのオートファジーと炎症性物質の産生が抑制され、歯周病症状が改善された。この成果は、これまで歯周病治療の大原則とされてきた感染源の除去だけでなく、生体の免疫細胞の異常活性化を制御することで治療効果が期待できる新しい治療法の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to understand the mechanism of alveolar bone destruction formation in periodontitis through host-parasite interactions, from the perspective of autophagy abnormalities in macrophages (M), and to elucidate the mechanism of suppression of inflammatory cytokine production by the autophagy-normalizing peptide P140. In an experimental mouse periodontitis model, significant accumulation of inflammatory macrophages M1 and TNF- α , along with increased autophagy, was observed 10 days after induction of periodontitis. Administration of P140 suppressed all of M1, TNF- α , and autophagy activity. Additionally, *in vitro*, autophagy activation led to increased expression of inflammatory cytokine genes, suggesting the existence of a mechanism for regulating TNF- α production via autophagy-related genes.

研究分野：幹細胞生物学

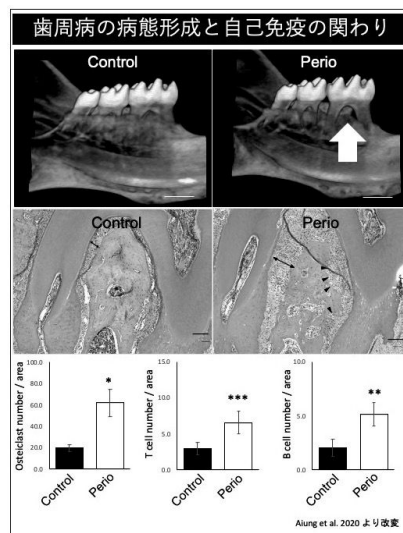
キーワード：歯周病 マクロファージ オートファジー 炎症性サイトカイン 歯槽骨破壊

1. 研究開始当初の背景

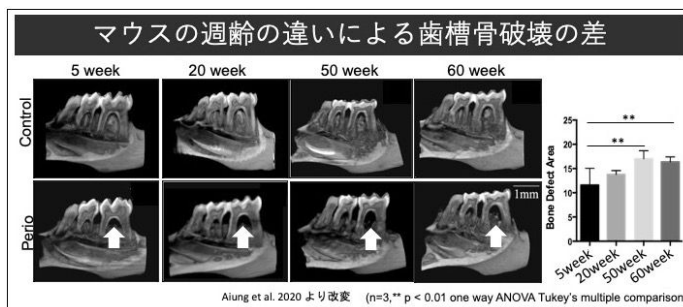
これまで、補綴装置を支持する支台歯やインプラント体は、歯周病やインプラント周囲炎によりその予後の予知性が著しく低下するため、これらの炎症疾患による歯周組織破壊の進行を抑制する方法について世界中の研究者が研究を進めてきた。これらの疾患の発症は、攻撃因子(細菌感染、メカニカルストレス等)が生体の防御機能を上回った際に発症するというホスト・パラサイト相互作用モデルにより理解され、感染源の徹底的な除去を基本理念に治療が進められてきた。その一方で、この疾病が呈する急激な組織破壊や、他の自己免疫疾患との併発、加齢との関係等を考えた場合、ホスト・パラサイト相互作用だけでは病態の説明がつかず、免疫トレランスの破綻による免疫異常が関与するのではないかと、強く推測されるようになった。しかしながら、生体の防御機能の一つである免疫反応が歯周病においてどのように異常活性化し、組織破壊を引き起こすのか、その詳細なメカニズムはこれまで明らかにされてこなかった。そのため、深刻な歯槽骨破壊に対する有効な治療方法はいまだに確立されておらず、抜歯やインプラント体の撤去に至るケースが臨床現場で散見され、大きな社会問題となっている。

歯周病やインプラント周囲炎における自己免疫の関与について、我々はこれまでに、炎症局所における T 細胞や B 細胞などの免疫細胞の集積が破骨細胞形成に関連すること、また、宿主の加齢に伴う間葉系幹細胞(MSCs)の免疫トレランス誘導機能の低下が歯槽骨破壊の深刻化を招く事を解明した(Aung et al., 2020; 右図)。しかしながら、加齢や先天的、後天的影響によって引き起こされる、この MSCs 免疫トレランス誘導機能の低下は、臨床的にコントロールが難しい点が課題として挙げられ、より簡便で副作用の少ない免疫トレランス誘導法の開発が世界的に切望されている現状である。

一方、我々の共同研究者であるフランス・ストラスブール大学のミューラー教授の研究室では、自己免疫疾患のひとつである全身性エリテマトーデス(SLE)患者におけるシャペロン介在型オートファジー(CMA)の過剰な活性化を発見し、抗体産生 B 細胞や、T 細胞の活性化を阻止する新規ペプチド(P140)を開発した。この研究結果は新たな免疫トレランス獲得戦略として、世界的に大きな注目を浴び、臨床治験も進行している。我々は、この新規ペプチドである P140 を応用して、実験的歯周病モデルマウスの歯槽骨破壊の阻止に成功し、歯周病やインプラント周囲炎がオートファジー関連疾患である可能性を示唆することに成功した。しかしながら、「オートファジー異常が、どのように歯周病やインプラント周囲炎の発症や、歯槽骨破壊の深刻化に関与しているのか」という本申請研究の核心をなす学問的問いの解明には至っておらず、さらに、効果的な臨床応用を目指すには、P140 のオートファジー正常化が免疫トレランス獲得にどのように関与するのか、その分子メカニズムの解明が必須である。



一方、我々の共同研究者であるフランス・ストラスブール大学のミューラー教授の研究室では、自己免疫疾患のひとつである全身性エリテマトーデス(SLE)患者におけるシャペロン介在型オートファジー(CMA)の過剰な活性化を発見し、抗体産生 B 細胞や、T 細胞の活性化を阻止する新規ペプチド(P140)を開発した。この研究結果は新たな免疫トレランス獲得戦略として、世界的に大きな注目を浴び、臨床治験も進行している。我々は、この新規ペプチドである P140 を応用して、実験的歯周病モデルマウスの歯槽骨破壊の阻止に成功し、歯周病やインプラント周囲炎がオートファジー関連疾患である可能性を示唆することに成功した。しかしながら、「オートファジー異常が、どのように歯周病やインプラント周囲炎の発症や、歯槽骨破壊の深刻化に関与しているのか」という本申請研究の核心をなす学問的問いの解明には至っておらず、さらに、効果的な臨床応用を目指すには、P140 のオートファジー正常化が免疫トレランス獲得にどのように関与するのか、その分子メカニズムの解明が必須である。



2. 研究の目的

本申請研究は、これまでホスト・パラサイト相互作用によって理解されてきた歯周病やインプラント周囲炎における歯槽骨破壊形成メカニズムを、宿主免疫細胞のひとつである M のオートファジー異常の観点から捉えるとともに、P140 によるオートファジー正常化の分子メカニズムを解明し、歯周病やインプラント周囲炎における免疫トレランス獲得への関わりを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

① 実験的マウス歯周病モデルにおける M の活性化とオートファジー正常化による歯槽骨破壊抑制効果の検討。

1) 実験的マウス歯周病モデルおよびインプラント周囲炎モデルの作製

既報 (Abe et al., 2013) に従い、マウス(C57BL/6)の下顎第一臼歯に5-0絹糸を結紮し、実験的歯周病を誘導する。結紮後、10日目で屠殺し、下顎骨を回収する。歯槽骨破壊はマイクロCTおよび組織学的解析にて行う。尚、それぞれのモデルにおいて、絹糸を結紮しない群をコントロール群とする。

2) M の活性化およびオートファジーの評価

歯周病ならびにインプラント周囲炎誘導後10日で回収した下顎骨において、組織学的に1型M

の分布 (F4/80, CD80 二重陽性細胞) を確認する。さらに歯根周囲の肉芽組織を回収し、オートファジー関連遺伝子 (Atg5, Atg7, Atg16L1 等) および、炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) の発現をリアルタイム RT-PCR にて確認する。

3) P140 投与によるオートファジー正常化と歯槽骨破壊抑制効果の検討

上記モデルで P140 投与後の歯槽骨破壊の抑制をマイクロ CT ならびに組織学的に検討するとともに、Atg 関連遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR にて検討する。

② オートファジーによる炎症性サイトカイン産生経路を特定する。

- 1) 上記実験①でオートファジー関連遺伝子の発現の変動を確認し、変動のあった候補遺伝子を、RAW264.7 M 細胞株にウイルスベクターを用いて遺伝子導入もしくは siRNA を用いて阻害し、*in vitro* にて炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α) の遺伝子発現 (リアルタイム RT-PCR) , や産生された炎症性サイトカインレベルを ELISA 法などを用いて確認する。さらには、免疫トランスに重要な役割を果たす Tregs の誘導に必要な TGF- β の産生・分泌の変化についても確認する。

4. 研究成果

実験的マウス歯周病誘導モデルにおける P140 の歯槽骨破壊進行抑制効果

5-0 絹糸結紮による実験的マウス歯周病誘導モデルにおいて、オートファジー正常化ペプチドを腹腔投与する (100 μ g/マウス) ことで歯槽骨吸収が抑制された (図 1)。

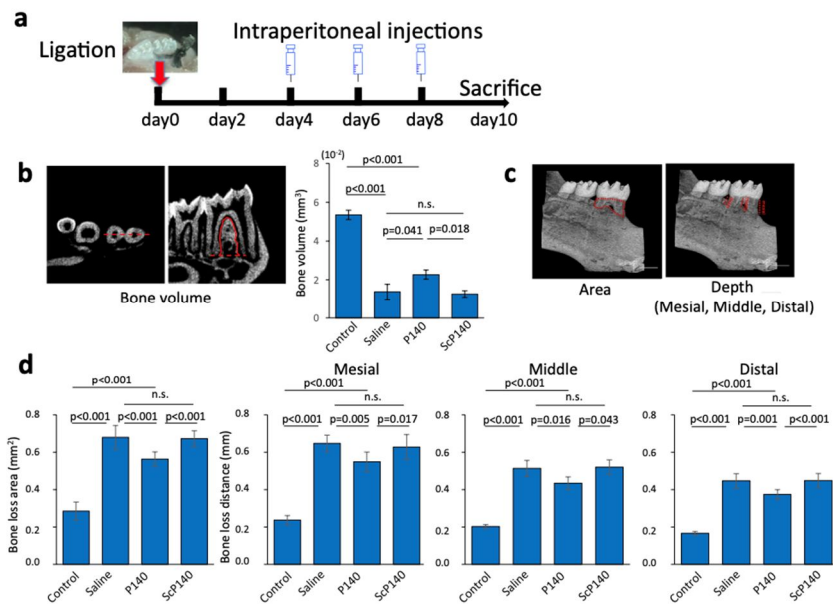


図 1 : 実験的マウス歯周病誘導モデルと P140 投与による歯槽骨破壊

また、組織学的検討においても、歯周病誘導モデルで活性化していた破骨細胞や炎症性細胞 (T 細胞, B 細胞) も、P140 投与によって有意に抑制された (図 2, 3)。

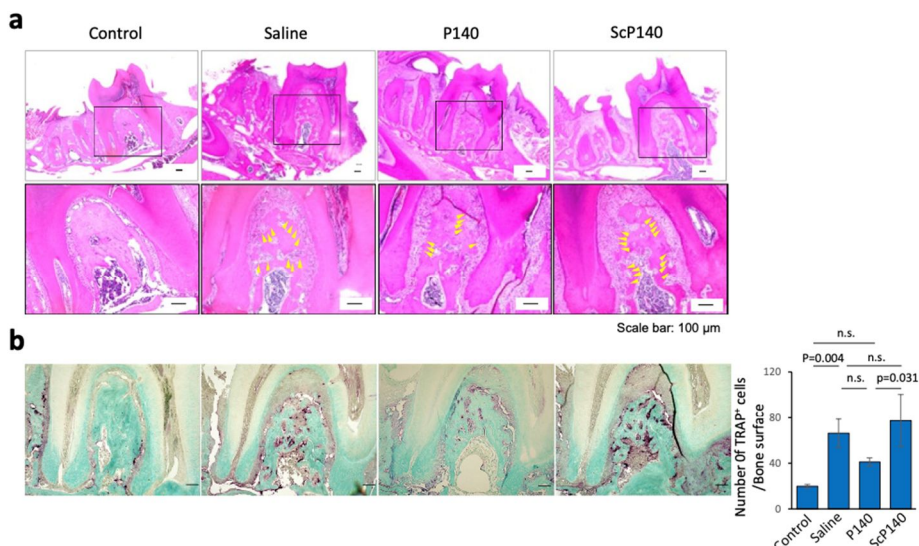


図 2 歯周病モデルにおける破骨細胞形成と P140 の抑制効果

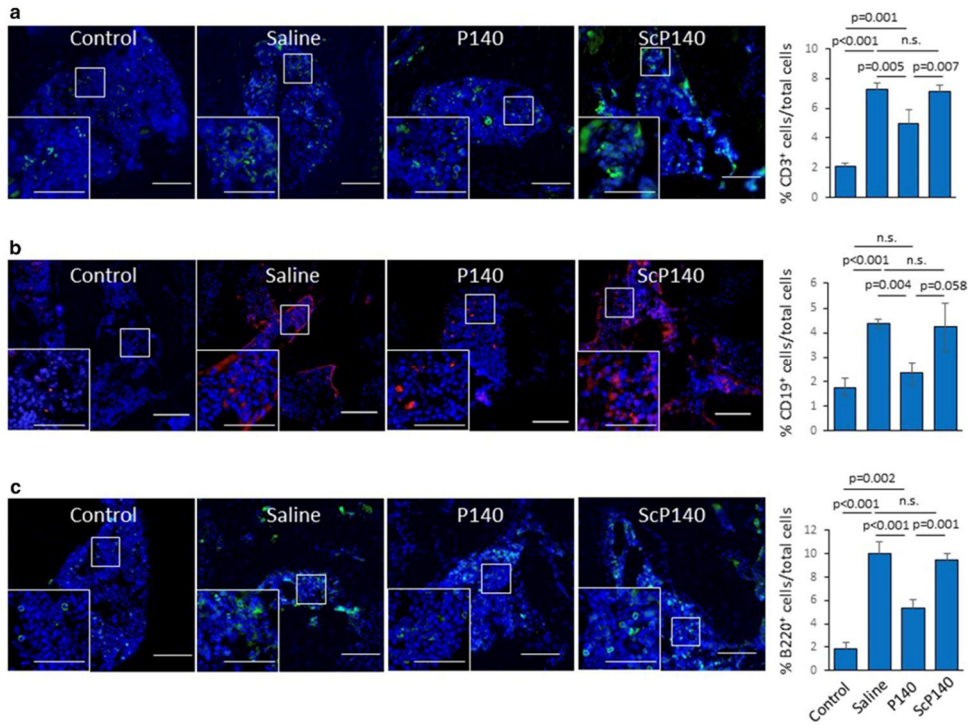


図3 歯周病モデルにおける炎症性細胞の浸潤と P140 の抑制効果

さらに、炎症性サイトカインである TNF- α 陽性細胞も P140 投与によって有意に抑制され、同時に、歯周病誘導後の歯周組織を含む下顎骨では炎症性サイトカインの遺伝子発現が抑制されていた (図4)。

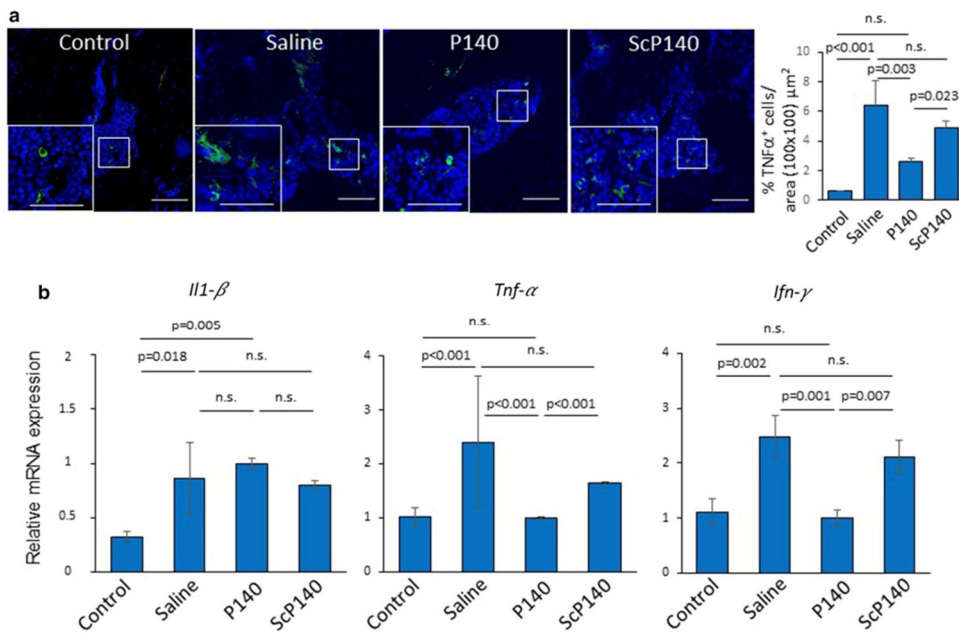


図4 歯周炎モデルにおける炎症性サイトカインの発現と P140 による抑制効果

また、P140 によるオートファジー正常化を検討したところ、Atg 関連遺伝子である Map1c3b, Sqstm1, Ulk1 の遺伝子発現が抑制されており、オートファジー活性と炎症性サイトカイン遺伝子発現の相関がみられた (図5)。

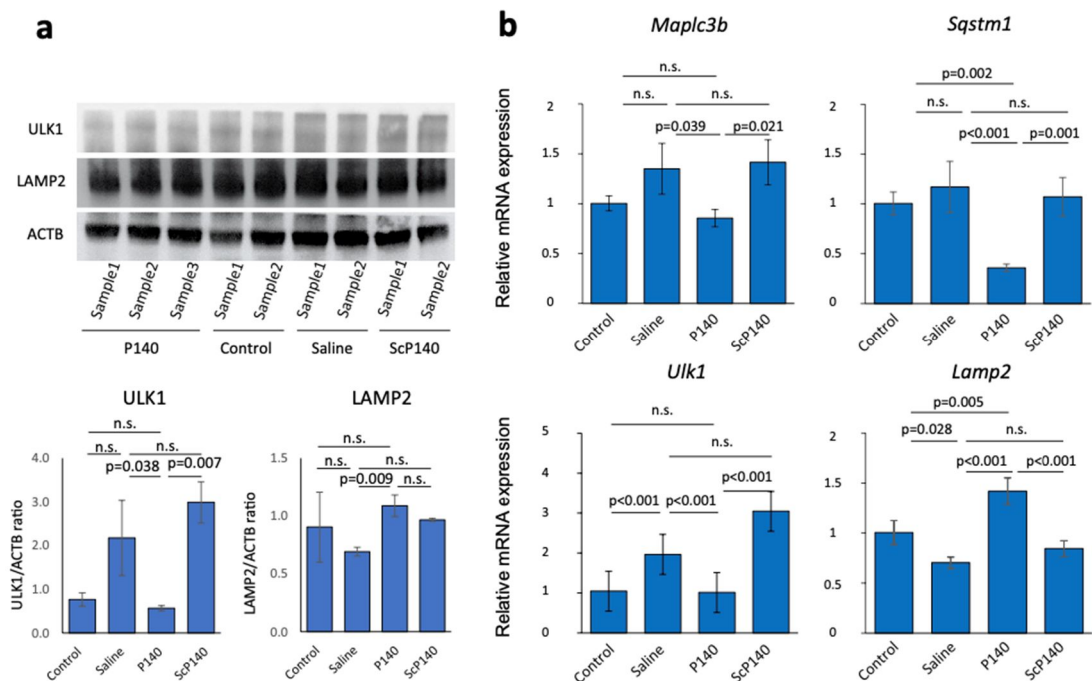


図5 歯周炎モデルにおけるオートファジー関連遺伝子の発現と P140 の抑制効果

オートファジーによる炎症性サイトカイン産生経路の特定

オートファジー活性化因子を培養液に添加し、炎症性サイトカインである TNF α の遺伝子発現を検討した結果、オートファジー関連遺伝子の上昇とともに TNF α 発現も上昇した(図6)。このことから、オートファジーによる炎症性サイトカイン産生制御がなされている可能性が強く示唆された。産生経路特定については更なる検討が必要である。

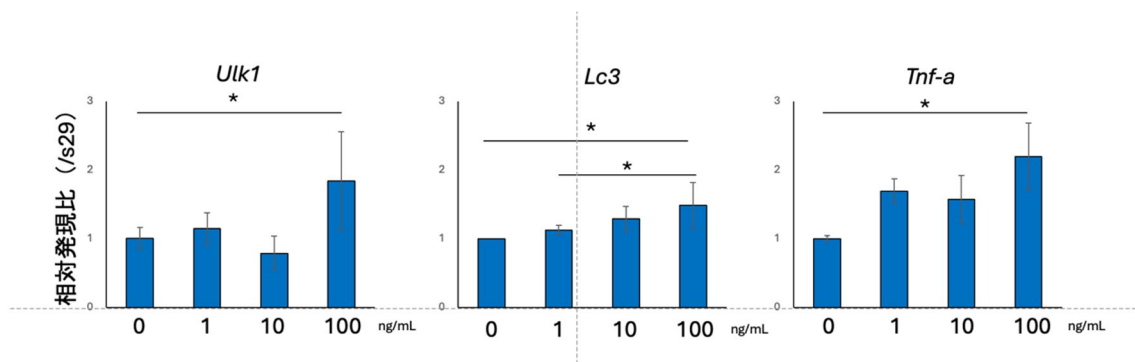


図6 オートファジー活性化による炎症性サイトカイン遺伝子の促進

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Zhang Jiwen, Akiyama Kentaro, Mun Aung Ye, Tagashira Ryuji, Zou Tingling, Matsunaga Naoya, Kohno Teisaku, Kuboki Takuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Age-Related Effects on MSC Immunomodulation, Macrophage Polarization, Apoptosis, and Bone Regeneration Correlate with IL-38 Expression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3252 ~ 3252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms25063252	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 kiyama K, Aung KT, Talamini L, Huck O, Kuboki T, Muller S	4. 巻 79
2. 論文標題 Therapeutic effects of peptide P140 in a mouse periodontitis model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Mol Life Sci	6. 最初と最後の頁 518-529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-022-04537-2	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 3件）

1. 発表者名 Zhang J, Akiyama K, Mun AY, Kuboki T.
2. 発表標題 The age-related MSCs immunomodulatory impairment affects macrophage polarization and apoptosis resulting in delayed bone regeneration.
3. 学会等名 The 8th CPS-KPS-JPS congress (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Aung YM, Akiyama K, Kitagawa W, Ono M, Kuboki T.
2. 発表標題 Macrophages modulates MSC recruitment in mice tooth-extraction model.
3. 学会等名 IADR General session 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Zhang J, Akiyama K, Kuboki T.
2. 発表標題 Mesenchymal stem cell induces macrophages apoptosis through cell-to-cell contact.
3. 学会等名 IADR/APR General session (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	窪木 拓男 (Kuboki Takuo) (00225195)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	大野 充昭 (Ono Mitsuaki) (60613156)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	

	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
研究協力者	ミュラー シルビアン (Muller Sylviane)		

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
---------	---------

フランス	ストラスブール大学			
------	-----------	--	--	--