

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21061

研究課題名（和文）Heat-shock Proteinsが歯根膜コラーゲンの恒常性維持に果たす役割

研究課題名（英文）The roles of Heat-shock Proteins on collagen synthesis in periodontal ligaments

研究代表者

西川 有彩（Nishikawa, Arisa）

大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員

研究者番号：70910181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、老化が歯周組織の病態生理に及ぼす影響を検討するために、歯根膜のECMタンパク産生制御におけるHeat-Shock Proteins(HSPs)の役割に焦点をあて解析した。老化ヒト歯根膜細胞ではコラーゲン特異的なHSP47の発現が低下し、三次元構造が変性したコラーゲンの生成の増加が明らかとなった。老化ヒト歯根膜細胞においては、変性コラーゲンの小胞体からゴルジへの細胞内輸送が障害されており、成熟コラーゲンの分泌が低下し小胞体ストレスが誘導されていた。さらにシャペロン活性化薬剤によりHSP47を含むHSPsの活性化が可能であり、老化ヒト歯根膜細胞のコラーゲン産生が回復することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢が歯周組織の病態生理に及ぼす影響は、細胞、分子レベルで十分に明らかとなっていない。本研究成果により、老化歯根膜のコラーゲン異常の原因の一端として、細胞内HSP47の減少による変性コラーゲンの生成、集積が明らかとなった。そして、変性コラーゲンによってもたらされる細胞内輸送の障害が成熟コラーゲンの分泌を抑制し小胞体ストレスを誘導することが示唆された。本研究成果は、HSP47がヒト歯根膜細胞の成熟コラーゲン産生に重要な役割を果たすことを明らかにするとともに、高齢者の脆弱な歯周組織の賦活化において、老化歯根膜細胞とHSP47が有用な治療標的となることを示唆する重要な知見と考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the role of Heat-Shock Proteins (HSPs) in the regulation of ECM protein production in the periodontal ligament to examine the effects of aging on the pathophysiology of periodontal tissue. The expression of collagen-specific HSP47 was decreased and the production of collagen with a denatured three-dimensional structure was increased in aged human periodontal ligament (HPDL) cells. Intracellular transport of denatured collagen from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi was impaired in aged HPDL cells, resulting in decreased secretion of mature collagen and induction of ER stress. Furthermore, we found that chaperone-activating drugs could activate HSPs, including HSP47, and ameliorate collagen production in aged HPDL cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：Heat-shock Proteins コラーゲン 歯根膜 老化

## 1. 研究開始当初の背景

歯根膜が結合組織として歯と歯槽骨を堅固に連結し、歯周組織の修復・治癒の場としての重要な役割を担うためには、歯根膜を構成する細胞から産生される細胞外基質 (ECM) タンパクが重要な役割を果たす。我々は、これまでにオートファジーによる異常コラーゲンの細胞内クリアランスが歯根膜細胞の硬組織細胞への分化には必要であることを報告している。しかしながら、メカニカルストレス、細菌種など様々な環境ストレスが蓄積していると考えられる高齢者の歯周組織の病態生理についての理解は十分に進んでおらず、その解明は高齢者を対象とした新規の歯周病予防・治療法の開発にとり喫緊の課題となっている。

## 2. 研究の目的

口腔内の環境ストレスが、歯根膜細胞の細胞外基質 (ECM) タンパクの恒常性に及ぼす影響は分子レベルでは詳細に明らかにされていない。本課題では、細胞老化の歯根膜の病態生理における役割を明らかにするために、Heat-shock Proteins (HSPs) に焦点をあて、細胞老化が ECM タンパク合成に及ぼす影響をコラーゲンの変性、分泌並びに小胞体ストレス応答について検討することとした。

## 3. 研究の方法

(1) 老化に伴う歯根膜細胞のコラーゲン産生と歯根膜細胞および歯周組織の変性コラーゲンの局在

初代ヒト歯根膜細胞 (HPDL) に *in vitro* で複製老化を誘導することで老化 HPDL を樹立し、そのコラーゲンの発現をタンパク、mRNA レベルで比較、検討した。培養上清中に分泌された成熟コラーゲン (PIP) 量を ELISA 変法による定量解析により検討した。

また、三重らせんが変性したコラーゲンに特異的に結合する蛍光プローブである CHP を用いて HPDL の変性コラーゲンを染色、標識した。

さらに、歯周組織における *in vivo* の変性コラーゲンの発現を検討するために 6 週齢および、100 週齢を超えるマウスの歯周組織からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、CHP にて変性コラーゲンを標識することで組織学的な評価を行なった。

(2) 老化が歯根膜細胞における type I collagen、HSP47 の局在に及ぼす影響

近年、高分子であるコラーゲンに特異な HSP47 が明らかとされている。そこで、正常 HPDL および老化 HPDL の type I collagen、HSP47、小胞体の細胞内局在について、特異抗体、小胞体については ER-Tracker で標識し、共焦点顕微鏡による観察を行い、細胞内局在を検討した。

(3) 歯根膜細胞における HSPs 誘導薬並びに阻害薬の効果

HSPs 誘導薬として、その誘導活性が報告されている GGA、阻害薬として、HSP70 や HSP90 の機能阻害が報告されている VER-155008、さらに HSP47 特異的な阻害薬である Col003 処理が HPDL に及ぼす影響をそれぞれのタンパク発現を指標にウエスタンブロッティ

ング法と細胞免疫染色により検討した。さらに、培養上清中に分泌された成熟 type I collagen 量を ELISA 変法にて定量評価した。

(4) siHSP47 が歯根膜細胞 type I collagen 産生に及ぼす影響

SiRNA を用いて HPDL の HSP47 をノックダウンし、細胞外の type I collagen の発現を細胞免疫染色、ELISA 変法により評価した。

(5) HSPs が歯根膜細胞における type I collagen の細胞内局在に及ぼす影響

HPDL を HSPs 誘導薬並びに阻害薬を用いて処理し、type I collagen の細胞内分布を小胞体、ゴルジ体への局在を指標に検討した。さらに、VER-155008、Col003 処理した正常 HPDL の変性コラーゲンと小胞体を CHP 並びに ER-Tracker 標識し、変性コラーゲンの発現と細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

(1)

老化 HPDL は、正常 HPDL と比較して細胞外の type I collagen の発現、産生量が有意に減少していた。また、老化 HPDL においては、正常 HPDL と比較して、CHP で標識される変性コラーゲンが増加していること、その変性コラーゲンの一部は、小胞体に局在していることが共焦点顕微鏡により観察された。

さらに、高週齢のマウスにおいては、低週齢マウスと比較して、歯根膜における CHP 発現の増加が観察された。

(2)

老化 HPDL において、正常 HPDL と比較して type I collagen と HSP47 発現の低下が観察された。正常 HPDL においては、type I collagen と HSP47 の共局在が観察される一方で、老化 HPDL においてはその共局在は減少していた。さらに、老化 HPDL においては、type I collagen の小胞体への局在が観察された。また、老化 HPDL においては、HSP47 の小胞体への局在は減少していた。

(3)

GGA 処理は、HSP70、HSP90 のみならず、HSP47 においても、その発現量を薬剤濃度依存的に有意に増加することが明らかとなった。また、細胞免疫染色により、GGA 処理は、老化 HPDL の HSP47、HSP70、HSP90 の発現を増強することが認められた。老化 HPDL においては HSP47 の発現が減少していたが、GGA 処理は、その発現量を部分的に回復した。

GGA 処理により、細胞外 type I collagen の発現量が増加する一方で VER-155008 および Col003 処理、とりわけ Col003 処理により顕著に type I collagen の発現量が低下することが明らかとなった。さらに、GGA 処理により、老化 HPDL の type I collagen 産生量は有意に増加した。正常 HPDL の type I collagen 産生は VER-155008、Col003 処理により有意に減少した一方で、mRNA レベルでの抑制は認めなかった。

(4)

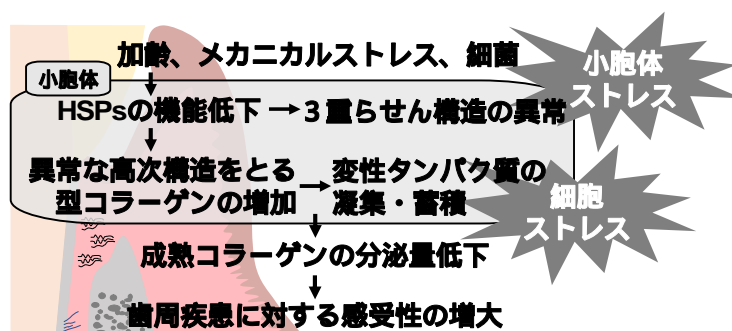
SiHSP47 導入 HPDL においては、著明に細胞外の type I collagen の発現が低下していることが観察され、成熟 type I collagen 産生が有意に低下していることが認められた。また、siHSP47 導入 HPDL においては、CHP で標識される変性コラーゲンが増加していること、その変性コラーゲンの一部は、小胞体に局在していることが共焦点顕微鏡により観察された。

(5)

正常 HPDL においては、VER-155008 並びに Col003 処理により、type I collagen の発現増加が輝点として観察され、その一部については ER-Tracker 標識された小胞体への局在が観察された。また、GGA 処理により、老化 HPDL で認められた type I collagen の輝点と小胞体への局在が減少した。正常 HPDL においては、type I collagen の一部にゴルジ体への局在が観察されたが、VER-155008 並びに Col003 処理により増加した type I collagen はゴルジ体には重ならず、その近傍、周囲での集積が観察された。

老化 HPDL においては、正常 HPDL よりも CHP の発現が増加していること、とりわけ小胞体への CHP の集積が観察された。VER-155008、Col003 処理した正常 HPDL においては、CHP の発現増強と小胞体への集積が観察された。老化 HPDL においては、GGA 処理により部分的に変性コラーゲンの減少が認められた。

これらの結果より、加齢による環境ストレスの蓄積は、歯周組織の生物学的老化を促進することが明らかとなった。その分子メカニズムの一端として、老化によりコラーゲンタンパクの恒常性維持に重要な HSP47 が歯根膜細胞で減少し、変性コラーゲンの増加、成熟コラーゲン産生の低下により歯根膜の機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Arisa Nishikawa*, M. Yamashita and S. Murakami
2. 発表標題 HSP47 causes the denatured collagen in aged periodontal ligament.
3. 学会等名 第69回 国際歯科研究学会 日本部会学術大会(JADR) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arisa Nishikawa*, M. Yamashita and S. Murakami
2. 発表標題 Decreased HSP47 Expression Causes Denatured Collagen in aged Periodontal Ligament.
3. 学会等名 The 100th General Session of International Association for Dental Research (IADR) (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
---------------------------	-----------------------	----

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