

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670884

研究課題名(和文) SASPによる歯周炎の慢性化と発がんの分子機構

研究課題名(英文) Analysis of SASP in chronic periodontal disease

研究代表者

山下 元三 (YAMASHITA, MOTOZO)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90524984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：老化ヒト歯根膜細胞を、初代培養歯根膜細胞から複製老化を誘導することで樹立した。得られた老化ヒト歯根膜細胞は、細胞増殖を停止し、肥大化した形態を示した。p16、p53、Rb の発現量並びに、SA- β -gal 酵素活性、ROS蓄積量の増加が認められた。老化ヒト歯根膜細胞はIL-6、IL-8、GRO α 、MMP1、MMP9の高産生を示した。老化ヒト歯根膜細胞の培養上清の添加は、歯根膜細胞の走化性、運動性を抑制した。老化歯根膜細胞並びにSASP因子は、高齢者における慢性炎症や歯周組織の破壊を促進することが示唆された

研究成果の概要(英文)：Senescent human periodontal ligament (HPDL) cells were established from the primary culture of periodontal ligament cells by the induction of replicative exhaustion in vitro system. Character of the senescent HPDL cells was confirmed by the enlarged cell shape and arrest of cell growth rate. Enhanced senescence associated beta-galactosidase activity, reactive oxygen species (ROS) activity, increased expressions level of p16, p53, and Rb were detected in the senescent HPDL cells. Senescent HPDL cells showed the senescent associated secretory protein (SASP) phenotype characterized by the robust production of IL-6, IL-8 and expression of GRO α , MMP1 and MMP9. Addition of conditioned medium from the senescent HPDL cells retarded the migration velocity for the HPDL cells. Senescent HPDL cells and SASP factors could exacerbate the chronic inflammation and destruction of aged periodontal tissues in elderly populations.

研究分野：歯周病治療学

キーワード：歯周病 老化 歯根膜細胞 SASP

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体を構成する体細胞は細胞分裂の回数に限界があり、細胞分裂回数の限界に到達すると、細胞死(アポトーシス)並びに細胞老化(セネッセンス)が誘導される。生体は、これらのメカニズムにより、異常な細胞の増殖を抑制し、細胞レベルでのがん化を防ぎ恒常性を維持している。老化細胞は細胞増殖を停止し拡大した細胞形態をとるものの、一定期間は除去されずに体内に蓄積されることから、個体の“老化”への関与が注目されている。近年、これらの老化細胞が慢性炎症、発がん、組織幹細胞能の維持に関連する炎症性サイトカイン、ケモカインや細胞外マトリックス分解酵素などの様々な分泌蛋白を高産生する現象(SASP)が明らかとなった。歯周病は加齢に伴い進行する慢性炎症性疾患であり、歯周組織を構成する細胞は、細菌感染、メカニカルストレス、活性酸素などの環境ストレス、すなわち細胞老化誘導刺激に絶えず暴露されている。そこで申請者は、歯周組織に集積した老化細胞のSASP蛋白質産生が中高年以降の口腔内の炎症反応の重篤化や発がんに関与しているのではないかと仮説をたてた。

2. 研究の目的

慢性炎症は発がんの大きな影響因子の一つである。しかしながら、慢性炎症性疾患と発がんの関連を検討する多くの研究は疫学研究であり、老化に伴う歯周病の慢性化と発がんについて検討された報告はきわめて少ない。近年、加齢に伴い老化細胞(senescent cell)が体内に蓄積されること、これら老化細胞が炎症性サイトカイン、ケモカインや細胞外マトリックス分解酵素などを高産生するSASPという現象が明らかとなり、慢性炎症、発がんにおける関与が注目されている。本研究では、老化細胞(SASP)産生蛋白に着目し、歯周炎の慢性化、発がん、組織修復における生理学的役割を明らかにすることで、慢性歯周炎-発がんにおける細胞間コミュニケーションの解明のための新たな知見を与えることを目指した。

3. 研究の方法

歯周組織構成細胞として歯根膜細胞を用いた *in vitro* 細胞老化誘導モデルを樹立する。

顕微鏡学的な形態観察並びに FACS による細胞サイズ、密度(FSC/SSC)の解析を行う。

トリパンブルー染色或は *BrdU* 取り込み試験にて細胞増殖能を解析するとともに、細胞周期調節蛋白質の遺伝子並びに蛋白質レベルの発現を検討する。

老化細胞に特異的な SAHF (Senescence associated hetero chromatin foci) 並びに、ライソゾームの肥大を伴う SA-beta GAL 活性を検討する。

電子顕微鏡にてミトコンドリアの形態並びに細胞内 ROS の蓄積量を検討する。

老化歯根膜細胞から採取したフルゲノム、mRNA、蛋白試料並びに培養上精中の分泌蛋白について発現プロファイル

老化歯根膜細胞の分泌蛋白質の生理活性を検討する。

4. 研究成果

複製老化法を用いて、初代培養歯根膜細胞をからの *in vitro* 老化誘導モデルの樹立に成功した。継代培養数 30 以上の歯根膜細胞において、以下の細胞老化に特徴的な形質を認めた。

顕微鏡学的な形態観察並びに FACS による細胞サイズ、密度(FSC/SSC)の解析により、老化歯根膜細胞は正常細胞の約 2 倍の大きさで非薄した特徴をとることが示された。

NIH3T3 プロトコールを改良した細胞継代により、継代培養数 30 以上の歯根膜細胞において増殖能の低下が認められた。これらの老化歯根膜細胞において、不可逆的な細胞分裂停止状態へ誘導されたことを、トリパンブルー染色或は *BrdU* 取り込み能に基づいた増殖能の FACS 解析により確認した。

老化歯根膜細胞においては、ライソゾームの肥大を伴う SA-beta GAL 活性が上昇していた。

透過型電子顕微鏡にて老化歯根膜細胞におけるミトコンドリアの形態を検討した結果、異常ミトコンドリアが核周囲多く存在する像並びに細胞内 ROS の蓄積量の増加が蛍光試薬による発色の増強により確認された。

老化歯根膜細胞から採取したフルゲノム、mRNA、蛋白試料について発現プロファイル解析を行った結果、老化歯根膜細胞においては、細胞周期制御に関わる p16INK4a-Rb 経路、p53-p21WAF1 経路が活性化された状態にあることが明らかとなった。

老化歯根膜細胞が産生する SASP 分泌蛋白について real-Time PCR と ELISA 法にて定量、定性解析をおこなった結果、SASP 蛋白として IL-6, IL-8, MMPs, PAI-1 が確認された。また、老化歯根膜細胞においては、炎症性サイトカイン産生に関与する NF-kappa B の恒常的な活性化がルシフェラーゼレポーター解析により明らかとなった。

老化歯根膜細胞の分泌蛋白質の培養上精に含まれる SASP 蛋白が歯周組織幹細胞の細胞増殖能を抑制すること、慢性炎症を伝播することが共培養した標的細胞における遺伝子の発現解析により明らかとなった。老化歯根膜細胞の培養上精の添加により、歯根膜細胞の *in vitro* 組織修復治癒能が阻害されることを Wound healing assay により確認した。

DNA micro array 並びに Western blot 法による生化学的な解析により、ヒト老化歯根膜細胞においては細胞周期制御に関わる p16INK4a-Rb 経路を中心として p53-p21WAF1 経路が活性化されることで、非可逆的な細胞増殖の停止となることが示された。

細胞分裂の停止となった老化歯根膜細胞は、代謝機能は停止せずに、活発な蛋白質の生合成を行っていること、SASP 蛋白として IL-6, IL-8, MIF, MMPs, PAI-1 を高産生する。これらの分泌蛋白質はオートクライン、パラクラインで老化歯根膜細胞自身或は周囲細胞に作用することにより、臓器特異な細胞老化を伝播することが示唆される。加齢に伴って出現する老化細胞が、高齢者における歯周組織局所の慢性的な自然炎症の発現に関与すること、口腔領域の発がんに寄与することが強く示唆された。本研究課題における研究をさらに発展させ、老化ヒト歯根膜特異的な SASP 蛋白生成の分子メカニズム解明に取り組む予定である。

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 1 件)

TGF-beta negatively regulates the BMP2-dependent early commitment of periodontal ligament cells into hard tissue forming cells.

Takanori Kawahara, Motozo Yamashita, Kuniko Ikegami, Tomomi Nakamura, Manabu Yanagita, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
PLOS ONE May 13, 2015

DOI: 10.1371/journal.pone.0125590

〔学会発表〕(計 3 件)

池上久仁子、山下元三、中村友美、柳田学、野崎剛徳、山田聡、北村正博、村上伸也
老化歯根膜細胞における細胞外基質蛋白の発現変動、第 142 回日本歯科保存学会 2015 年度春季大会、2015/06、福岡

池上久仁子、山下元三、柳田学、野崎剛徳、北村正博、村上伸也
老化歯根膜細胞における炎症性サイトカイン(SASP 蛋白)の産生、第 36 回日本炎症・再生医学会、2015/07、東京

Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Tomomi Nakamura, Mikiko Kubota, Kenta Mori, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami

Analysis of cellular senescence in aged human periodontal ligament cells. AAP 100th Anniversary Annual Meeting. 2014/09 San Francisco, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 元三 (YAMASHITA MOTOZO)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：90524984

(2) 研究分担者

山田 聡 (YAMADA SATORU)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：40359849

研究分担者

野崎 剛徳 (NOZAKI TAKENORI)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号：30263304

(3) 連携研究者：なし