

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670887

研究課題名(和文) 歯根膜恒常性維持機構としての細胞内ロジスティクスの役割とその制御

研究課題名(英文) The roles and regulatory factors of cellular logistics, autophagy maintaining the homeostasis of periodontal ligament.

研究代表者

春山 直人 (HARUYAMA, NAOTO)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：70359529

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)：本研究では、歯根膜恒常性維持に重要な細胞内ロジスティクス機構であるオートファジーが、歯根膜においてどのように誘導され、細胞死とどのように関連しているかについて調べた。まず、マウスの歯を矯正学的に移動させたところ、圧迫側歯根膜においてアポトーシスに先行してオートファジーが誘導された。また、その領域は歯の移動により低酸素状態になった領域と一致していた。さらに、培養歯根膜細胞において種々のオートファジー誘導因子を検索したところ、低酸素がその要因の1つであることが分かった。本研究は生体において圧迫側歯根膜にオートファジーが誘導されることを初めて示した研究であり、その誘導因子の1つを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the autophagy inducible factors in periodontal ligament (PDL), and tried to clarify the relationship between autophagy and apoptotic cell death. First, we moved the maxillary first molar of GFP-LC3 transgenic mice, and examined the localization of autophagy marker, LC3 in the PDL. Autophagy (LC3) was induced in the compression side of PDL at 6 hours after initiating the tooth movement. The autophagy was found in the hypoxic area induced by tooth movement. Furthermore, autophagy was induced prior to the PDL cell apoptosis. In order to clarify the autophagy inducible factors in the PDL cells, low oxygen partial pressure were loaded to a human PDL fibroblast cell line, and resulted in increased cellular LC3 protein levels. These results suggest that the orthodontic tooth movement induces autophagy on compression side of PDL, and hypoxia is one of the critical inducers of autophagy.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正学 オートファジー 歯根膜 線維芽細胞 アポトーシス 低酸素

1. 研究開始当初の背景

歯が健全な咀嚼機能を維持するためには、細胞増殖、タンパク合成、コラーゲンを含んだ組織吸収、歯槽骨のリモデリングなど、歯根膜を主体とした歯周組織の恒常性が保たねばならない。しかし、歯周組織は、メカニカルストレスや、ホルモン、成長因子刺激の有無、歯周病原菌感染など、外界との刺激に常にさらされており、時に歯根膜線維芽細胞は恒常性が維持できず細胞死に至ることもある。

ところで、歯根膜線維芽細胞におけるメカニカルストレスに対する反応として、オートファジー性細胞死が引き起こされるということが、古くから組織学的、電子顕微鏡学的に示唆されてきた(Scand J Dent Res 81:467-480,1973, Angle Orthod 47:1-16,1977)。しかし、近年の研究から、オートファジーは、細胞の基礎代謝に必須の現象で、古くなって不要となった細胞の構成要素を、一部の細胞質と共に小胞様構造(オートファゴソーム)によって包み込み、リソソームの酵素を受けて分解する機構である細胞内代謝と恒常性の維持に必要な「基礎的なオートファジー」と、ストレスに反応して細胞内から栄養供給を行うために急速に誘導される「反応性オートファジー」とに分類され、いずれも細胞の生存のための恒常性維持機構と考えられるようになった(J Cell Biol 169:425-434, 2005; Nature 441:880-884, 2006)。

よって、歯周組織におけるオートファジーは細胞の生存・恒常性維持のためにも引き起こされていると考えられるが、現在までにその存在と関与についての検討した報告は見当たらない。また、メカニカルストレス下の歯根膜組織にみられたオートファジー性細胞死はこの恒常性維持機構の破綻した結末像とも受け取れるが、どのように破綻まで辿り着くかに関する研究は存在せず、生存か死かを決定づける因子の存在は不明である。

2. 研究の目的

よって、本研究課題では、歯根膜線維芽細胞において、細胞が飢餓に陥ったときや、虚血などの病的状態によって誘導される恒常性維持機構としてのオートファジーについて着目する。

とくに歯根膜線維芽細胞内のロジスティクス(物流システム)の変化について、ストレス下での細胞内物流の分子応答機構と恒常性維持・細胞死との関連に着目し、歯根膜線維芽細胞を用いた invitro のオートファジー誘導実験、歯根膜特異的オートファジー欠損マウスを用いた in vivo 実験の両面から多角的にそのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

歯根膜線維芽細胞内のロジスティクス(物流システム)の変化におけるオートファジー

の役割を明らかにするため、まず歯根膜線維芽細胞を用いた in vitro でのオートファジーの実験系を確立し、その後、種々の刺激に暴露した際の歯根膜線維芽細胞のオートファジーの動態解析をおこなうこととした。

また、in vivo 解析を行うための Postn-Cre TG 作成のためにプロモータークローニングを行うこととした。クローニングした遺伝情報を元に、Postn-Cre TG マウスを作成後、オートファジーに必須な Atg5 を歯周組織特異的に欠損させたマウスを用いて低酸素負荷・歯の移動モデルを作製して解析し、歯の移動時に生じる歯根膜線維芽細胞の死が、低酸素ストレスにより過剰に誘導されるオートファジーによって引き起こされることを実証することとした。

4. 研究成果

(1) 歯根膜線維芽細胞を用いた in vitro でのオートファジーの誘導実験系を確立

培養ヒト歯根膜線維芽細胞株 (HPdLF) に対し、メカニカルストレス(種々の大きさの持続的伸展・圧縮力)、低酸素ストレス (~1% pO₂) の負荷を行う実験系を確立した。その際、オートファジーマーカーである LC3 タンパク誘導の有無を、免疫染色および Western blotting 法により検索することで、オートファジーの誘導の有無を確認した。その結果、HPdLF において、種々の大きさ、種類のメカニカルストレスによる LC3 の変化は確認できなかったが、低酸素ストレスは LC3 を有意に増加させることが判った。さらに、HPdLF に HIF-1 阻害剤を添加して低酸素ストレス下で培養したが、LC3 増加の抑制は見られなかった。よって、低酸素条件下で見られたオートファジーは、HIF-1 と独立したシグナル経路を介していると考えられた。

(2) Periostin プロモーターのクローニング実験

in vivo 解析を行うための Postn-Cre TG 作成のためにプロモータークローニングを行ったが、歯根膜細胞内で特異的かつ効果的に遺伝子発現を促進することができるプロモーターのクローニングは出来なかった。よって Postn-Cre TG マウス作成は行わなかった。

(3) in vivo において、矯正学的歯の移動が歯根膜細胞へオートファジーを誘導することを確認

LC3 と緑色蛍光タンパク(GFP) の融合タンパク(GFP-LC3) を全身に発現するトランスジェニックマウスを入手し、このマウスにおける歯の移動実験を、低酸素プローブを腹腔内注射した後におこなった。組織学的な解析の結果、歯の移動開始 3、6 時間後に歯根膜圧迫側は低酸素状態となっていたことが低酸素プローブの局在から明らかになった。また、歯の移動開始 6 時間後までに、歯根膜圧迫側において LC3 が顕著に誘導されていたことが、GFP-LC3 の局在を免

疫染色によって観察することで明らかになった。さらに歯の移動開始 24 時間後には、LC3 の局在が減少した一方で、アポトーシス(TUNEL 陽性細胞)の存在が最も顕著となることも判明した。加えて、歯根膜中のオートファジーはアポトーシスに先行して誘導される組織像を得ることができた。

以上の結果から、低酸素刺激が in vitro、in vivo とともに歯根膜においてオートファジーを誘導する主要な因子であることが示唆された。また、歯の移動時に生じる歯根膜線維芽細胞のアポトーシス性細胞死は、低酸素ストレスにより過剰に誘導されるオートファジーに引き続いて誘導される可能性が示唆された。今後は、歯の恒常性維持に重要な役割を果たしている可能性のあるオートファジーという現象が、いかにオートファジー性細胞死、さらにはアポトーシスへと繋がるのかを明らかにしていきたい。

以上、本研究課題から得られた結果は、将来的に硝子化変性・歯根吸収や骨破壊のない効率的で安全な歯の移動法開発につながる基盤情報の端緒となると考えられた。

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 5 件)

1. Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Saito K, Yamada A, Han X, Funada K, Fukumoto E, Haruyama N, Iwamoto T, Takahashi I, Fukumoto S. Nephronectin plays critical roles in Sox2 expression and proliferation in dental epithelial stem cells via EGF-like repeat domains. *Sci Rep*. 2017 Mar 27;7:45181. doi: 10.1038/srep45181 (査読有り)

2. Sato M, Baba Y, Haruyama N, Higashihori N, Tsuji M, Suzuki S, Moriyama K. Clinico-Statistical Analysis of Congenitally Missing Permanent Teeth in Japanese Cleft Lip and/or Palate Patients. *Orthod Waves*. 2016 Jun; 75(2): 41-45 (査読有り)

3. Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Yamada A, Saito K, Ishikawa M, Han X, Funada K, Haruyama N, Yamada Y, Fukumoto S, Takahashi I. Plakophilin-1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development and ameloblast differentiation. *PLoS One*. Mar 24;11(3):e0152206. doi: 10.1371/journal.pone.0152206. (査読有り)

4. Suzuki A, Nakano M, Yoshizaki K, Yasunaga A, Haruyama N, Takahashi I. A

longitudinal study of the presence of dental anomalies in the primary and permanent dentitions of cleft lip and/or palate patients. *Cleft Palate Craniofac J*. 2016 Mar 31. [Epub ahead of print] (査読有り)

5. Kobuke S, Suzuki S, Hoshino H, Haruyama N, Nishimura F, Shiba H. Relationship between length variations in Ser/Asp-rich repeats in phosphoryn and in vitro precipitation of calcium phosphate. *Arch Oral Biol*. 2015 Jun 6;60(9):1263-72. (査読有り)

[学会発表](計 10 件)

1. 古川雄亮, 春山直人, 二階堂まりこ, 中西正光, 笠法子, 大洞将嗣, 呉本晃一, 吉崎恵悟, 高橋一郎. Stim1 はマウスのエナメル質の石灰化およびエナメル芽細胞成熟期にみられる周期性を制御する. 第 12 回九州矯正歯科学会学術大会. 宮崎. 平成 29 年 3 月 18-19 日

2. 古川雄亮, 春山直人, 梅田まりこ, 中西正光, 笠法子, 大洞将嗣, 呉本晃一, 吉崎恵悟, 高橋一郎. ストア作動性 Ca²⁺流入の異常による外胚葉異形成症におけるエナメル質形成不全の発症メカニズム. 第 75 回日本矯正歯科学会大会. 徳島. 平成 28 年 11 月 7-9 日

3. 辻恭子, 春山直人, 野村俊介, 村田直久, 吉崎恵悟, 光安岳志, 高橋一郎. 口蓋裂単独群に見られる顎顔面形態の特徴とそれに影響を与える因子について. 第 74 回日本矯正歯科学会大会, 福岡, 平成 27 年 11 月 18-20 日

4. 春山直人. 九州大学病院における口唇裂・口蓋裂患者の外科的矯正治療の基本的な考え方-片側性唇顎口蓋裂症例に関して-平成 27 年度 夏の口唇裂・口蓋裂矯正治療勉強会. 横浜. 平成 27 年 8 月 27 日

5. 丸山和宏, 祐田京子, 安永敦, 下村卓弘, 吉崎恵悟, 春山直人, 鈴木陽, 高橋一郎. 口唇口蓋裂患者の矯正受診と咬合の実態-九州大学病院矯正歯科における 43 年間の臨床統計 その 1 . 第 10 回九州矯正歯科学会学術大会, 長崎, 平成 27 年 3 月 7-8 日

6. 祐田京子, 安永敦, 下村卓弘, 丸山和宏, 吉崎恵悟, 春山直人, 鈴木陽, 高橋一郎. 口唇口蓋裂患者の矯正受診と咬合の実態-九州大学病院矯正歯科における 43 年間の臨床統計 その 2 . 第 10 回九州矯正歯科学会学術大会, 長崎, 平成 27 年 3 月 7-8 日

7. 宮崎佳奈子, 吉崎恵悟, 新井智映子, 張

麗麗，韓 雪，春山直人，高橋一郎． 歯の発生における外胚葉異形成症原因遺伝子 Plakophilin 1 (Pkp1) の役割． 第 73 回 日本矯正歯科学会大会，千葉，平成 26 年 10 月 20-22 日

8. 寺尾文恵，春山直人，高橋一郎． 骨格性下顎前突患者における最大かみしめ開始から最大咬合力に達するまでの時間と顎顔面形態の関係について 第 73 回日本矯正歯科学会 日本矯正歯科学会，千葉，平成 26 年 10 月 20-22 日

9. 宮崎佳奈子，吉崎恵悟，新井智映子，張麗麗，韓 雪，春山直人，高橋一郎． 歯原性上皮細胞における Ca²⁺を介した細胞接着メカニズム及び分化に及ぼす影響について． 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会，福岡．平成 26 年 9 月 25-27 日

10. 春山直人．九州大学病院における口唇裂・口蓋裂患者のチーム医療と，顎裂部骨移植に関する現状 平成 26 年度 夏の口唇裂・口蓋裂矯正治療勉強会．東京．平成 26 年 8 月 28 日

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004941/thesisList.html>

<http://www.ortho.dent.kyushu-u.ac.jp/research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春山 直人 (HARUYAMA NAOTO)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授
研究者番号：70359529

(2) 研究分担者

寺尾 文恵 (TERAO FUMIE)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：10510018

安永 敦 (YASUNAGA ATSUSHI)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：80515990

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし