The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	オートファジーによる歯根膜細胞の機能制御
Author(s)	中村, 友美
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52356
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（中村　友美）	
論文題名	オートファジーによる歯根膜細胞の機能制御

論文内容の要旨

【研究目的】

オートファジーは細胞内の大規模タンパク分解機構であり、栄養状態に適応して自己の細胞内成分をアミノ酸などへ分解し、分解産物を再利用することで細胞レベルでの自律機構を担っている。近年、定常状態においてもオートファジーが誘導され、不要なタンパク質や傷害を受けた細胞小器官を積極的に除去することで、細胞の新陳代謝を担うことが報告されている。また、オートファジーが細菌感染や外的ストレス刺激時に作動することで、細胞レベルのみならず臓器、個体レベルでの生体の環境適応機構のひとつとして機能することが明らかとなっている。歯根膜細胞は細胞外基質（ECM）を大量に産生することで、歯根膜の弾性組織としての機能を保持している。また、硬組織形成細胞へと分化することで、歯周組織の修復・再生において中心的な役割を担っている。さらに、歯周組織は細菌感染やメカニカルストレスなどの環境ストレスに絶えず曝露されており、歯根膜が環境ストレスに対する生体バリアーとしての機能を果たすためには、これらの環境ストレスにより惹起される活性酸素種（ROS）等の酸化ストレスに細胞レベルで適応する必要がある。オートファジーの機能不全が病態形成に関与する糖尿病や心筋梗塞、関節リウマチと歯周病との間には病態としての類似点が多く、これらの疾患の相互関係は分子レベルにおいても示唆されている。しかしながら、オートファジーが、歯根膜の機能維持に果たす役割については未だ十分に解明されていない。

本研究では、培養ヒト歯根膜細胞を用いて歯根膜細胞におけるオートファジーの生理的役割について検討した。さらに酸化ストレス応答の調節制御に関わるオートファジーの役割を解析した。また、歯根膜細胞の特徴的な形質であるコラーゲンの代謝と、硬組織形成細胞への分化における歯根膜オートファジーの役割を解析した。

【材料および方法】

初代培養ヒト歯根膜細胞（ScienCell Research Laboratoriesより購入。以下HPDLと略す）の継代8代目までのものを実験に供した。

1）*in vitro*でのHPDLにおけるオートファジーの誘導

血清とアミノ酸を含まないHanks' Balanced Salt Solution（HBSS）を用いて培養することでHPDLに栄養飢餓を誘導した。栄養飢餓条件下でのHPDLのオートファジーの膜動態の変化を、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて観察した。オートファジーのマーカーとしてLC3-I / IIならびにp62を用い、経時的変化をウエスタンブロッティング（WB）法を用いて生化学的に解析した。LC3-Iはオートファジーの誘導によりLC3-IIとなり、オートファゴソームならびにオートリソソームの膜部位に特異的に局在する。また、p62はLC3-IIと結合し、オートファジーにより特異的に分解される基質である。さらに、エレクトロポレーション法によりGFP標識LC3発現ベクターをHPDLに遺伝子導入し、薬剤処理により安定発現株を樹立後、GFP-LC3の細胞内局所における集積を蛍光顕微鏡で観察した。リソソームはLysoTracker（Life Technologies）を用いて染色した。

2）オートファジーがHPDLの酸化ストレス応答とROS生成に与える影響

HPDLを酸化ストレス刺激、H_2O_2（250 μM）にて刺激し、オートファジーの誘導をWB法ならびに蛍光顕微鏡を用いて解析した。一方、オートファジーがHPDLのROS生成と消去に及ぼす影響を検討するため、オートファジー誘導剤あるいは阻害剤処理下での細胞内ROS蓄積量を、ROS検出用試薬（CellROX, Life Technologies）を用いて蛍光顕微鏡観察ならびにマイクロプレートリーダーを用いた定量解析を行った。本研究では、オートファジー誘導剤としてRapamycin（250 nM）を、オートファジー阻害剤として3-Methyladenine（1 mM）、Chloroquine（10 μM）、E-64d（10 μg/ml）ならびにPepstatin A（10 μg/ml）を用いた。また、ミトコンドリアの形態変化を、MitoTracker（Life Technologies）による染色ならびにTEM観察にて評価し、ミトコンドリアROSをMitoSOX（Life Technologies）を用いて染色した。ミトコンドリアROSのスカベンジャーとしてMito-TEMPO（10 μM）を用いた。

3）オートファジーがHPDLのコラーゲン代謝と硬組織形成細胞への分化に与える影響

オートファジーの誘導あるいは阻害によるコラーゲン量の変化は、HPDLをAscorbic acid（50 μg/ml）およびβ-glycerophosphate（5 mM）含有培地にて長期培養後、Picrosirius red染色を行うことで検討した。また、抗I型ならびに抗III型コラーゲン抗体を用いた細胞免疫染色を行い、コラーゲンの細胞内局在について詳細に検討した。リソソームのマーカーであるLAMP-1あるいはオートファジーのマーカーであるLC3と、I型コラーゲンとの免疫二重染色を行うことで、オートファゴソームならびにオートリソソームとI型コラーゲンとの局在の重なりを検討した。さらに、ELISA法を行うことで、細胞外へ分泌された成熟型I型コラーゲン量を定量的に解析した。I型ならびにIII型コラーゲンのmRNAおよびタンパク発現をReal-Time PCR法、WB法にてそれぞれ解析した。HPDLの硬組織形成細胞への分化については、アルカリホスファターゼ活性の測定ならびにReal-Time PCR法による石灰化関連遺伝子発現の変化を解析することで評価した。オートファジー阻害剤を用いた実験結果においては、薬剤処理による非特異的なアーティファクトの可能性が否定できないため、オートファジー特有の膜形成開始に必須であるATG5タンパクをRNAiによりノックダウンした細胞を用いて同様の検討を行った。

【結果】

1）HPDLはHBSSでの培養により、オートファゴソームならびにオートリソソームの明らかな増加がTEMによって観察された。WB法では、LC3-IIの経時的な発現量の増加と、p62の発現量の減少が認められた。また、GFP-LC3安定発現HPDLのHBSSでの培養はGFP-LC3の集積を惹起し、その一部はリソソームとの共局在を認めたことから、オートファゴソームとオートリソソームが形成され、オートファジーが誘導されることが示された。これらの結果より、オートファジーがHPDLにおいて生理的に機能していることが確認された。

2）H_2O_2刺激によりHPDLのオートファジーは誘導された。一方、オートファジーの阻害は細胞内ROSの増加を惹起した。細胞内の最大のROS生成の場であるミトコンドリアについては、オートファジー阻害下では異常形態を呈するミトコンドリアが観察され、ミトコンドリアROSの増加を認めた。Mito-TEMPO処理下では、オートファジー阻害による細胞内ROS蓄積量の増加は抑制された。以上の結果から、オートファジーは、HPDLにおけるROS生成の一部を調節制御していることが示唆された。

3）HPDLはオートファジー阻害下では、Picrosirius Red染色陽性のコラーゲン量の増加を示した。抗コラーゲン抗体を用いた細胞免疫染色によって、オートファジーの阻害が細胞内のコラーゲンの蓄積を惹起し、細胞外へのコラーゲン分泌を阻害することが示唆された。E-64dとPepstatin A存在下で培養したHPDLでは、LAMP-1ならびにLC3とI型コラーゲンとの共局在を示し、オートリソソーム内にI型コラーゲンタンパクが含まれていることが示唆された。オートファジー阻害剤ならびにATG5ノックダウンによるオートファジー抑制下では、培養上清中に分泌された成熟型I型コラーゲン量は有意に減少した。さらに、オートファジー抑制によりコラーゲンの転写レベルは抑制され、WB法では成熟型I型コラーゲンの発現量の減少を認めた。また、オートファジーの抑制により長期培養下におけるHPDLの石灰化関連遺伝子発現とアルカリホスファターゼ活性は抑制された。

【結論および考察】

本研究により、オートファジーが歯根膜細胞の酸化ストレス応答を制御し歯周組織の恒常性維持に関与していること、さらに正常なECMの生合成にはオートファジーが必須であること、さらにオートファジーは歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御することが明らかとなった。

歯根膜細胞では酸化ストレスによりオートファジーが活性化することで、過剰なROSの細胞内への蓄積を回避する適応機構が存在することが示唆された。また、オートファジーが定常状態のみならず、細菌感染やメカニカルストレス刺激などの環境ストレス下において、障害ミトコンドリアを浄化し、細胞内の過剰なROS蓄積を抑制していることが示唆された。

HPDLにおけるオートファジーの抑制はコラーゲンのmRNA発現をも抑制した。これは細胞内に大量のコラーゲンが蓄積したことによるネガティブフィードバック機構によるものと考えられる。他の線維芽細胞と比較し、歯根膜細胞はコラーゲンの代謝活性が非常に高く、正常なコラーゲンの生合成を維持するためにオートファジーがより重要である可能性が高い。

老化細胞においてはオートファジー活性が低く、代謝機能の低下が報告されているが、これは高齢患者の歯周組織において、細菌感染やメカニカルストレスなどの環境ストレスへの適応力が低下していることを示唆するものである。すなわち、歯根膜細胞のオートファジーの低下は、ECM産生の異常や細胞内酸化ストレスの蓄積を惹起することで、細胞機能を障害し、幹細胞能の機能低下を伴う歯周病の病態悪化の一助となっている可能性が想定される。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（中村　友美）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	村上　伸也
	副 査	教授	野田　健司
	副 査	准教授	中田　匡宣
	副 査	講師	村上　智彦

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜細胞におけるオートファジーの生理的役割を培養ヒト歯根膜細胞を用いて検討したものである。歯根膜細胞の酸化ストレスへの適応機構に果たすオートファジーの役割と、歯根膜の代表的な細胞外基質タンパクであるコラーゲンの代謝調節ならびに硬組織形成細胞への分化過程における歯根膜オートファジーの機能を解析した。

その結果、オートファジーが歯根膜細胞の酸化ストレス機構の制御に関与すること、定常的なオートファジーが障害ミトコンドリアを消去し、過剰な活性酸素種の産生を回避することにより恒常性維持を担うことが示された。また、オートファジーが歯根膜細胞における正常な細胞外基質タンパクの生成、代謝調節に必須であること、その結果として同細胞の硬組織形成細胞への分化を制御することを見いだした。以上の研究成果は、歯周組織の恒常性維持や同組織の修復・再生の中心となる歯根膜細胞に特異的な自律機構を理解する上で重要な知見と考えられ、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。