

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学位論文

オートファジーによる歯根膜細胞の機能制御

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻（歯周病分子病態学）

中村 友美

（指導教官：村上 伸也 教授）

緒言

オートファジーは、真核細胞において脂質二重膜で構成されるオートファゴソームにより細胞内成分を包み込み、同成分をリソソームへ運搬し分解する非特異的な大規模タンパク分解機構である¹。オートファジーは、細胞周囲を取り巻く環境が栄養飢餓に陥った状態で活発に誘導されることから、生物進化の過程で獲得された細胞の生存に必須の自律機構と考えられている。近年、酵母から哺乳類に至る細胞種において、定常状態のオートファジーが誘導され、傷害を受けた細胞内小器官や不要なタンパク質などを分解することで細胞を浄化し、アミノ酸や核酸として同分解産物をリサイクルすることで新陳代謝を担うことが明らかにされている^{2,3}。また、哺乳類細胞においては、オートファジーは細菌感染や外的ストレス刺激時に作動することで、細胞のみならず臓器、個体レベルでの生体の環境適応システムとして機能し^{4,5}、オートファジーの機能低下が糖尿病や心筋梗塞、関節リウマチなどの慢性疾患の病態にも影響を及ぼすことが提唱されている^{6,7}。実際に、タンパク質合成の盛んな膵β細胞ではオートファジーの低下により異常タンパク質の凝集体が生じ、膵β細胞の機能不全から糖尿病につながる⁸、神経細胞におけるオートファジーの低下が変性ミトコンドリアの蓄積を惹起し、パーキンソン病の発症の一因となることが報告されている³。

歯根膜は、セメント質を介して歯を歯槽骨に緊密に保持する、コラーゲン線維に富んだ弾性組織である。歯周組織においては、外部からの侵害刺激を遮断する生体バリアーとしての役割のみならず、咬合圧などのメカニカルストレスを緩衝する生理的役割を担っている⁹。ヒト抜去歯から得られた歯根膜組織を材料とした遺伝子網羅解析により、歯根膜細胞ではI型およびIII型コラーゲン遺伝子ならびに、タンパク翻訳の場であるリボソーム関連遺伝子の恒常的な発現が明らかとなっている¹⁰。これは、歯根膜が軟骨組織や腱組織と同様に、細胞外基質（ECM）タンパク、とりわけコラーゲンの生合成が活発な組織であることを分子レベルで示唆するものである。また近年の研究においては、歯根膜中には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在し、創傷治癒や再生の過程において増殖・分化することで歯周組織の修復・再生の中心的役割を担うことが明らかとなっている¹¹⁻¹⁴。一方、歯根膜が生体バリアーとしての機能を果たすためには、口腔内細菌や唾液のpH、O₂/CO₂変化など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¹⁵に適応した生体システムを細胞レベルで備えることが機能維持に必須であると考えられている。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、これら疾患の相互関係が疫学レベル

のみならず、分子レベルにおいても示唆されている¹⁶⁻¹⁸。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生理的役割については未だ十分には解明されていない。

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、歯根膜細胞のストレス適応機構の一端として、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

1. 試薬

過酸化水素（和光純薬工業、大阪、日本、以下H₂O₂と略す）、Mito-TEMPO（Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA）、オートファジー誘導剤ラパマイシン（SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA）、オートファジー阻害剤3-メチルアデニン（SIGMA-Aldrich）、クロロキン（SIGMA-Aldrich）、E-64d（和光純薬工業）、ペプスタチンA（SIGMA-Aldrich）を実験に供した。リソソームならびにミトコンドリアの染色にはLysoTracker（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）、MitoTracker（Life Technologies）を用いた。

2. 細胞培養

初代培養ヒト歯根膜細胞（ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA, 以下HPDLと略す）の継代8代目までのものを実験に供した。培養には10%ウシ胎仔血清（Life Technologies, 以下FBSと略す）を加えた α 変法イーグル最小必須培地（和光純薬工業、以下MEM α と略す）を用いた。栄養飢餓誘導培地にはハンクス平衡塩溶液（Life Technologies, 以下HBSSと略す）を用いた。蛍光観察ならびに蛍光測定時にはフェノールレッド不含のMEM α （Life Technologies）を培養に用いた。

3. 透過型電子顕微鏡解析

培養細胞を4°Cのダルベッコ-リン酸緩衝生理食塩水（和光純薬工業、以下D-PBSと略す）にて2回洗浄後、2%グルタルアルデヒドを用いて4°Cで一晩、前固定し、2%四リン酸オスミウムを用いて4°Cで1時間処理することで後固定した。固定後、50%、70%、90%、100%のエタノールで段階的に脱水し、エポキシ樹脂Quetol-812（日新EM、東京、日本）を浸透させて60°Cで48時間重合した。得られた包埋樹脂ブロックをULTRACUT UCT（Leica, Wetzlar, Germany）を用い、ダイヤモンドナイフで70 nmの厚さに超薄切片にした後、室温で15分間2%酢酸ウラニルで染色し、続いて室温で3分間鉛染色液（Sigma-Aldrich）を用いて二次染色した。試料の観察は透過型電子顕微鏡JEM-1400Plus（日本電子、東京、日本）を用いて加速電圧80 kVで行った。デジタル画像はCCDカメラVELETA（Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany）で撮影した。

4. ウェスタンブロッティング法

培養細胞を4°CのD-PBSにて2回洗浄した後にプロテアーゼインヒビターカク

テル錠 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)、10 mMフッ化ナトリウム (和光純薬工業)、1 mMオルトバナジン酸ナトリウム (SIGMA-Aldrich)、10 mM β -グリセロリン酸 (和光純薬工業) を加えたRIPA Lysis Buffer (Millipore, Billerica, MA, USA) を加え4°Cで20分間処理し、細胞画分を溶解した。回収した全細胞溶解液を遠心 (12,000 rpm、4°C、20分) し、上清をタンパク質溶解画分に精製した。タンパク質溶解画分についてはBradford法¹⁹にてタンパク定量を行い、濃度を各サンプル間において同値に調整した。次に2-メルカプトエタノール (和光純薬工業) 含有Laemmliの5xサンプルバッファー²⁰を用いてサンプルを還元状態に調整し、至適濃度のアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにて電気泳動を行い、タンパク質溶解画分を展開した。Native-PAGEのサンプルバッファーならびにゲルには、SDS-PAGEで用いたものからドデシル硫酸ナトリウム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ならびに2-メルカプトエタノールを除いたものを用い、泳動バッファーには25 mMトリス (Sigma-Aldrich)-塩酸 (和光純薬工業) 緩衝溶液 (以下、Tris-HClと略す)、192 mMグリシン (和光純薬工業)、pH 8.3を用いた。その後、PVDFトランスファーメンブレン (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) にブロッティング装置 (Bio-Rad Laboratories) を用いて、4°C、80 V、2時間の条件にて転写した。メンブレンは5%スキムミルク (森永乳業、東京、日本)、0.1%Tween 20 (和光純薬工業) を含むトリス緩衝生理食塩水 (50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM塩化ナトリウム (和光純薬工業)、以下TBSと略す) に室温にて1時間、振盪させブロッキングを行った。一次抗体には、マウス抗-ヒトLC3抗体 (医学生物学研究所、名古屋、日本)、ウサギ抗-ヒトp62抗体 (医学生物学研究所)、マウス抗-ヒトGFP抗体 (Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA)、ウサギ抗-ヒトI型コラーゲン抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、マウス抗-ヒトATG5抗体 (医学生物学研究所)、マウス抗-ヒト β -actin抗体 (SIGMA-Aldrich) を用いた。二次抗体にはHRP標識ヒツジ抗-マウスIgG抗体 (GE Healthcare)、HRP標識ヤギ抗-ウサギIgG抗体 (GE Healthcare) を用いた。その後、メンブレンを0.1%Tween 20含有TBSで洗浄後、基質としてECL Prime Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を加え、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いて発光を検出し画像を得た。

5. GFP-LC3安定発現株の樹立

HPDLにGFP標識LC3発現ベクター (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) とGFP発現ベクター (Cell Biolabs) をヒト間葉系幹細胞Nucleofectorキット (LONZA, Basel, Switzerland) を用い、LONZA社の推奨するプロトコールに準じて遺伝子導入した。すなわちNucleofector溶液10 μ lで懸濁した1 x 10⁶個の

HPDLに各ベクターを1 μg 添加し、さらにNucleofector溶液を加えて総量100 μl とした。これをキュベットに移し、Nucleofector装置 (LONZA) にセットし遺伝子導入を行った。細胞を10%FBS含有MEM α を入れた6穴培養用プレート (Corning Inc., Corning, NY, USA) に移し、24時間後、1穴あたり100 mm培養用ディッシュ (Corning Inc.) 3枚の割合で100 mm培養用ディッシュに播種した。さらに24時間後、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 (Life Technologies) を添加した培地に交換し、3日に1回培地交換を行った。8日後、クローニングシリンダー (日本ジェネティクス、東京、日本) を用いてキャップ法により陽性コロニーを単離し、24穴培養用ディッシュ (Corning Inc.) に移した。ウェスタンブロッティング法でGFP-LC3ならびにGFPタンパクの発現が確認できた細胞を、24穴培養用ディッシュから6穴培養用ディッシュ、100 mm培養用ディッシュへスケールアップして維持した。

6. ROSの検出

HPDLをポリ-L-リジンコート35 mmガラスボトムディッシュ (松浪硝子工業、大阪、日本) ならびに96穴ViewPlate (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) に播種し、24時間後にオートファジー誘導剤および阻害剤、Mito-TEMPOを添加して4日間培養した。ROSの検出には5 μM CellROX Orange (Life Technologies)、ミトコンドリア特異的なROSの検出には5 μM MitoSOX Red (Life Technologies) を添加し、D-PBSで洗浄後、蛍光顕微鏡 (オリンパス、東京、日本) あるいは蛍光マイクロプレートリーダー (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて蛍光を検出した。

7. コラーゲン染色

培養細胞のコラーゲン染色には Picosirius Red Stain Kit (Polysciences, Warrington, PA, USA) を用いた。すなわち2%FBS含有MEM α で6日間培養したHPDLを100%エチルアルコール (和光純薬工業) にて室温で10分間固定した後、プロトコールに準じて染色した。染色部位を光学顕微鏡 (ニコン、東京、日本) を用いて観察した。さらに染色量を定量的に評価するため、観察された染色像を画像解析ソフトウェア WinROOF (三谷商事、福井、日本) に取り込み、二酸化処理後に染色強度を数値化し、デンスITメトリック解析を行った。

8. 細胞免疫染色

HPDLをポリ-L-リジンコート35 mmガラスボトムディッシュに播種し、2%FBS含有MEM α で6日間培養した。D-PBSで洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液 (和光純薬工業) を用いて室温で15分固定した。D-PBSで

洗浄した後、0.25% Triton X-100 (和光純薬工業) あるいは100 $\mu\text{g/ml}$ ジギトニン (SIGMA-Aldrich) を用いて室温で10分間静置することで膜透過処理を行った。D-PBSで洗浄後、1.5%ウシ血清アルブミン (SIGMA-Aldrich) にて室温で1時間ブロッキングを行った。一次抗体ならびに二次抗体はブロッキング溶液で希釈した。一次抗体にはウサギ抗-ヒトI型コラーゲン抗体、ウサギ抗-ヒトIII型コラーゲン抗体 (Abcam)、マウス抗-ヒトLC3抗体 (医学生物学研究所)、マウス抗-ヒトLAMP1抗体 (Abcam) を用い、室温で1時間反応させた後D-PBSにて洗浄した。二次抗体にはAlexa Fluor 594 ロバ抗-ウサギIgG抗体 (Life Technologies)、Alexa Fluor 488 ヤギ抗-マウスIgG抗体 (Life Technologies) を用い、室温で30分間静置後D-PBSにて洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて封入した後、蛍光顕微鏡で観察した。

9. I型コラーゲンの定量解析

コンフルエント状態に達したHPDLを石灰化誘導培地として5 mM β -グリセロリン酸および50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸 (和光純薬工業) を添加した10%FBS含有MEM α にて培養し、3日後に石灰化誘導培地を交換、6日後に培養上清を回収した。培養上清に含まれるI型プロコラーゲンC末端プロペプチド (以下PIPと略す) の定量をELISAキット (タカラバイオ、大津、日本) を用いて、マイクロプレートリーダー (ThermoFisher Scientific) にて波長450 nmの吸光度を測定することにより行った。

10. 石灰化関連遺伝子の発現解析

コンフルエント状態に達したHPDLを石灰化誘導培地で培養し、3日後にRNAを回収した。RNAはPureLink RNA Mini キット (Life Technologies) を用いて全RNAを抽出し、逆転写酵素Super Script III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて逆転写反応を行いcDNAを得た。得られたcDNAを鋳型として、表1に示す各遺伝子特異的なReal-Time PCR用プライマー (タカラバイオ) を用いて発現を検討した。cDNA増幅には7300 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。

11. ATG5 siRNAの導入

抗菌剤を添加していない10%FBS含有MEM α を用い、HPDLを細胞培養用プレートあるいはポリ-L-リジンコート35 mmガラスボトムディッシュに播種した。24時間後、30~50%コンフルエントの状態、100 pmolのATG5 siRNA (Qiagen, Venlo, Netherlands) あるいはネガティブコントロールsiRNA (Qiagen) を

Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を含むOpti-MEM (Life Technologies) を用いて導入した。

12. アルカリホスファターゼ活性の測定

アルカリホスファターゼ活性の測定は、Besseyらの方法²¹に準じて行った。すなわちコンフルエント状態に達したHPDLを石灰化誘導培地で培養し、培養上清を除去した後、細胞層をD-PBSにて2回洗浄し、0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) を添加した。Handy Sonic model UR-20P (トミー、東京、日本) にて超音波破碎した後に細胞破碎液を回収し、遠心 (15,000 rpm、4°C、5分) 後に得られた上清を測定に供した。上清1 ml中に500 μ lの1 M Tris-HCl (pH 9.0)、100 μ lの5 mM塩化マグネシウム (和光純薬工業)、100 μ lの50 mMパラニトロフェニル-2-リン酸ナトリウム (和光純薬工業、以下pNPPと略す) を加え、37°Cにて30分間反応させた後、250 μ lの1 N水酸化ナトリウム (和光純薬工業) にて反応を停止させた。同溶液中の波長415 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定し、水解されたpNPP量を求めた。なお、37°C条件下で1分間に1 μ molのpNPPを水解するアルカリホスファターゼ活性を1 Uとし、総DNA量1 mg当たりのユニット値で示した。

統計処理について

実験データは3群の平均値 \pm 標準偏差で表した。有意差検定は2群比較はStudent's t検定により、多群比較はTukey検定により行い、*p*値が0.05を下回る場合を有意差があるものと判定した。

表 1 本研究で使用した Real-Time PCR 用プライマー

遺伝子	プライマー
<i>COL1A1</i>	5'- CCCGGGTTTCAGAGACAACCTTC -3'
	5'- TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC -3'
<i>COL3A1</i>	5'- CCACGGAAACACTGGTGGAC -3'
	5'- GCACATCAAGGACATCTTCAGGA -3'
<i>ATG5</i>	5'- GCTGCACTTTATTACCAAGCCTCTG -3'
	5'- AGCGTACTCAAATGGGTCAACATTC -3'
<i>ALP</i>	5'- GGACCATTCCCACGTCTTCAC -3'
	5'- CCTTGTAGCCAGGCCATTG -3'
<i>SP7</i>	5'- GCCATTCTGGGCTTGGGTA -3'
	5'- TGTGGCAGGGCCAGAGTCTA -3'
<i>RUNX2</i>	5'- CACTGGCGCTGCAACAAGA -3'
	5'- CATTCCGGAGCTCAGCAGAATAA -3'
<i>HPRT</i>	5'- GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA -3'
	5'- GTCAAGGGCATATCCTACAACAAC -3'

結果

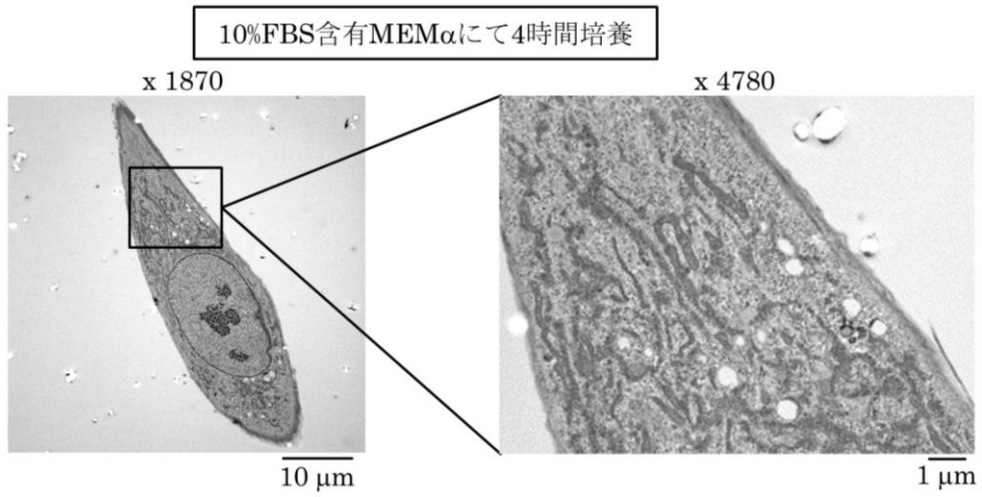
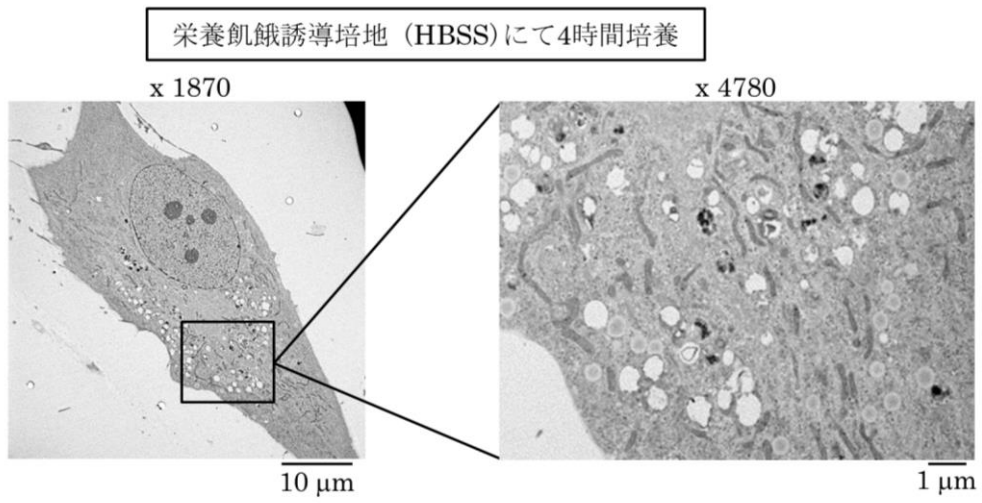
1. *in vitro*での HPDLにおけるオートファジーの誘導

哺乳類細胞においては、アミノ酸の枯渇した栄養飢餓の細胞培養条件がオートファジーを誘導する²²。そこで、FBS ならびにアミノ酸を含有しない HBSS を用いて培養することで HPDL に栄養飢餓を誘導し、オートファジーの動態を検討した。オートファジーの判定には小胞膜の観察が必要不可欠である²³ことから、透過型電子顕微鏡を用いてその微細構造の検討を行った。その結果、HBSS で 4 時間培養後の HPDL には、多数の小胞様構造を認めた (図 1A)。これらの小胞様構造について、二重膜構造の外膜と小胞内に細胞内器官が認められたものはオートファゴソームであること、一重膜構造と小胞内に分解過程の内容物が認められたものはオートリソソームであることが示唆された²³ (図 1B)。

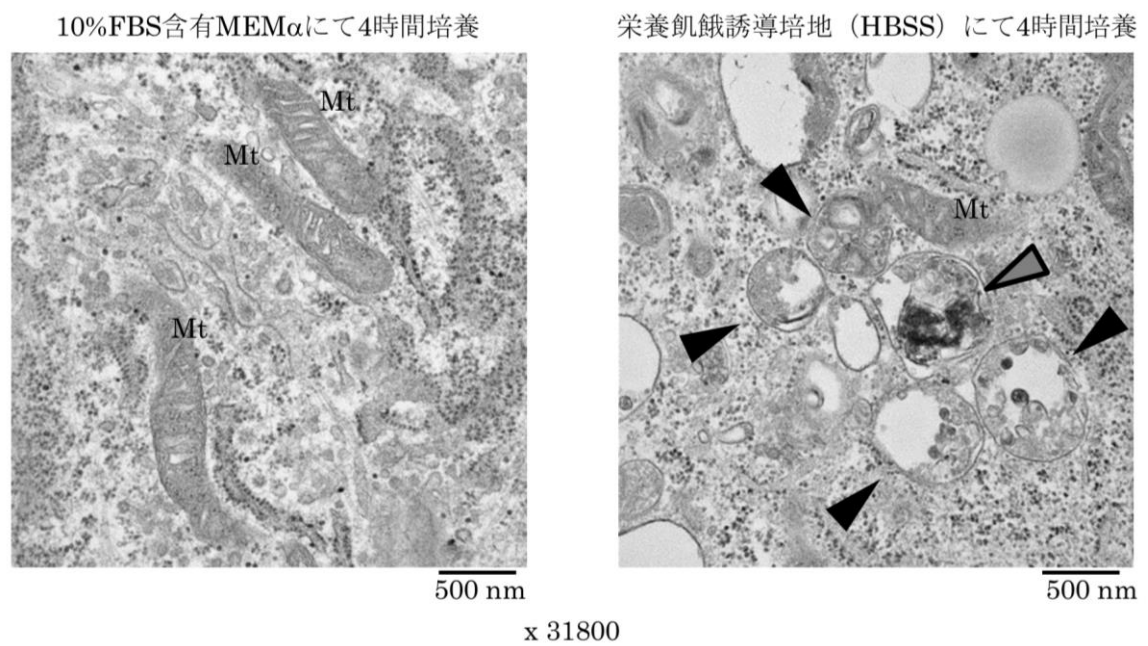
Microtubule associated protein 1 light chain 3 (以下 LC3 と略す) は通常状態では LC3-I として細胞質内に散在しているが、オートファジーが誘導されると脂質と共有結合することで LC3-II となり、オートファゴソームならびにオートリソソームの膜部位に特異的に局在することが明らかにされている²⁴。その過程において、LC3-II と結合し、特異的に分解される基質として p62 が報告されている²⁵。そこで LC3-I / II と基質である p62 の経時的な発現量の変化を、ウェスタンブロッティング法を用いて生化学的に解析した。その結果、HBSS での培養により、経時的な LC3-II の発現量の増加に伴って p62 の発現量が減少することが示された (図 1C)。

以上の結果から、他の哺乳類細胞と同様に、HPDL においても生理的条件下でオートファジーが誘導されることが *in vitro* の実験系にて示唆された。

A



B



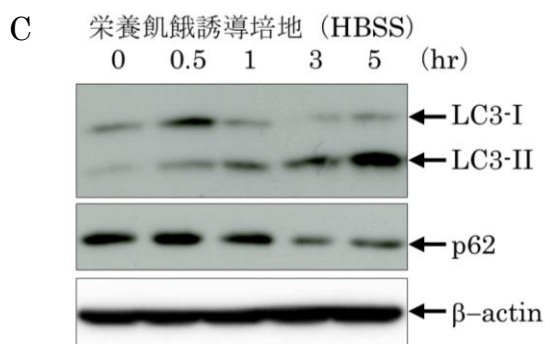


図1 栄養飢餓条件における HPDL のオートファジー動態の解析

A : 栄養飢餓誘導培地 (HBSS) で 4 時間培養後に透過型電子顕微鏡を用いて観察された、HPDL の小胞様構造を示す。

B : 図 1A の強拡大により、オートファゴソーム (黒矢頭)、オートリソソーム (灰矢頭)、ミトコンドリア (Mt) の細胞内構造物が観察された。

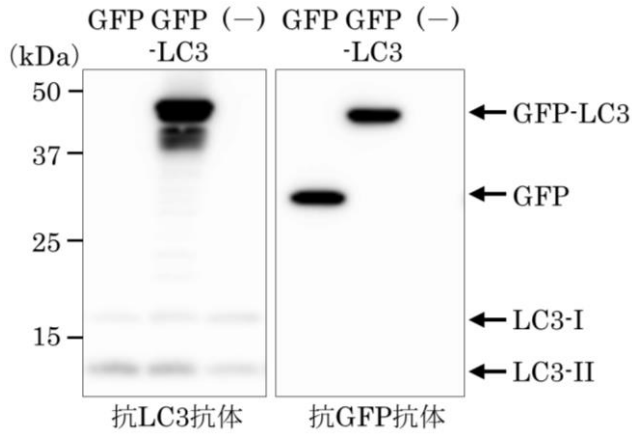
C : HPDL を栄養飢餓誘導培地 (HBSS) で培養し、LC3-I / II と p62 の経時的な発現量の変化をウェスタンブロッティング法を用いて解析した。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

2. GFP-LC3 安定発現 HPDL 細胞株の樹立と、栄養飢餓条件での GFP-LC3 の細胞内集積の観察

HPDL に GFP 標識 LC3 を遺伝子導入、発現させることで生細胞におけるオートファジーを可視化し、その動態について解析した。GFP-LC3 は一過性の強発現によりオートファジーに非依存的なタンパク凝集体を形成し、細胞内局在の識別が困難となることが報告されている²⁶。そこで GFP 標識 LC3 発現ベクターを HPDL に遺伝子導入し、薬剤処理にて GFP-LC3 安定発現株の作製を行った。樹立した GFP-LC3 安定発現株において、GFP-LC3 の発現量が GFP 単独導入の細胞と比し発現量が同レベルであることをウェスタンブロッティング法により確認し、実験に供した (図 2A)。GFP-LC3 安定発現 HPDL を HBSS で 4 時間培養し、GFP-LC3 の集積と LysoTracker で染色されたリソソームの細胞内における局在を観察した (図 2B)。10%FBS 含有 MEM α で培養した HPDL では GFP-LC3 は細胞内に散在し、HBSS 培養下では GFP-LC3 の集積が緑色の輝点として観察された (図 2B 左列、青矢頭)。さらに、一部の輝点についてはリソソームとの共局在が認められた (図 2B 右列、白矢頭) ことから、栄養飢餓条件では HPDL に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。

以上の結果より、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、透過型電子顕微鏡を用いた形態学的解析、蛍光顕微鏡によるイメージング解析、ウェスタンブロッティング法を用いた生化学的解析により確認された。

A



B

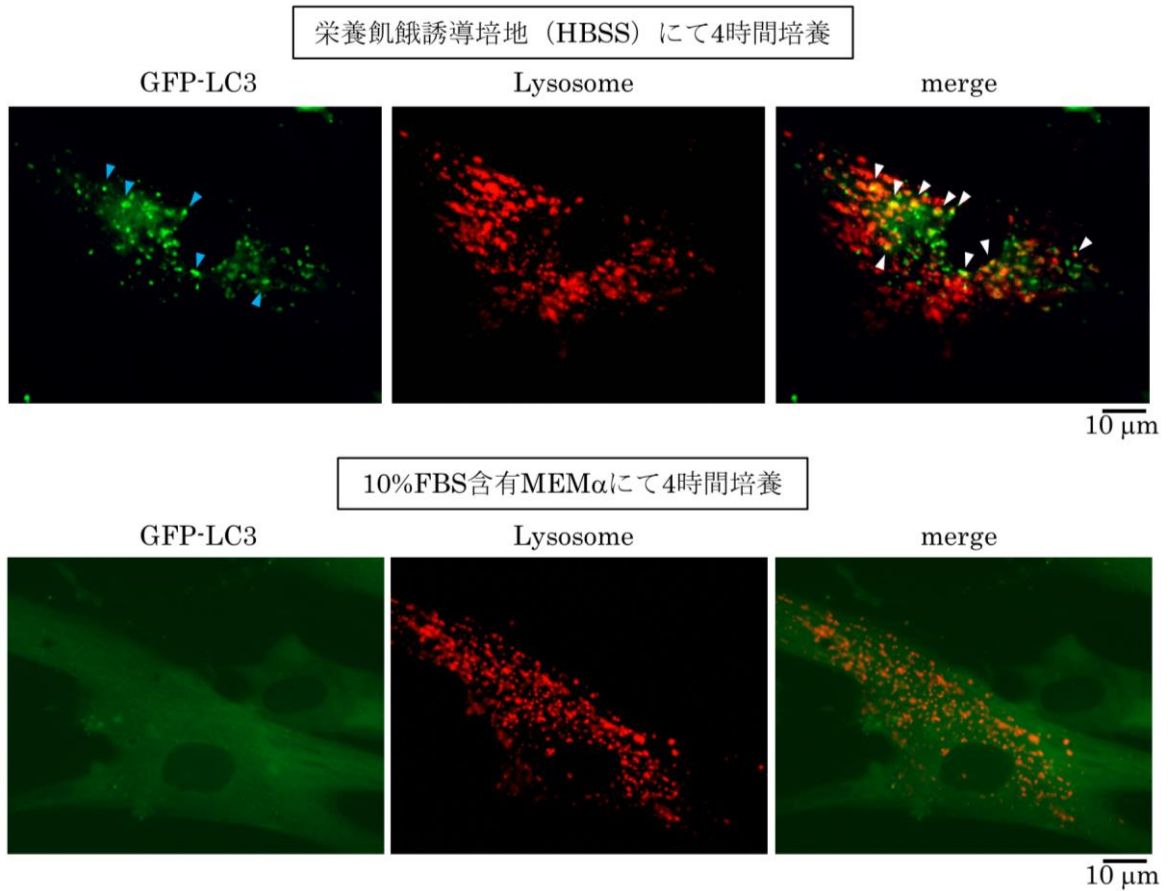


図2 GFP-LC3 安定発現 HPDL の蛍光顕微鏡解析

A : GFP-LC3 ならびに GFP 発現ベクターを遺伝子導入した HPDL のタンパク発現を、抗 LC3 抗体と抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により解析した。

B : GFP-LC3 安定発現 HPDL を栄養飢餓誘導培地 (HBSS) で培養し、4 時間後の GFP-LC3 の集積 (左列) と、リソソームの局在 (中央列) を観察した。右列には、左列と中央列を重ね合わせた像を示す。GFP-LC3 が集積して観察された輝点の一部を青矢頭で、GFP-LC3 とリソソームとの共局在部位を白矢頭で示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

3. 酸化ストレス刺激が HPDL のオートファジーに与える影響

哺乳類細胞では酸化ストレスによってオートファジーが誘導されることが報告されている⁵。そこで酸化ストレスによる HPDL のオートファジーについて検討した。GFP-LC3 安定発現 HPDL を酸化ストレス刺激として H₂O₂ (250 μM) 処理し、5 時間後には GFP-LC3 由来の輝点が観察され、一部の輝点はリソソームへの共局在を示した (図 3A)。ウェスタンブロッティング法を用いた解析では、H₂O₂ 濃度依存的に LC3-II の発現量の増加とそれに伴う p62 の発現量の減少を認めた (図 3B)。これらの結果により、酸化ストレス刺激は HPDL のオートファジーを誘導することが示唆された。

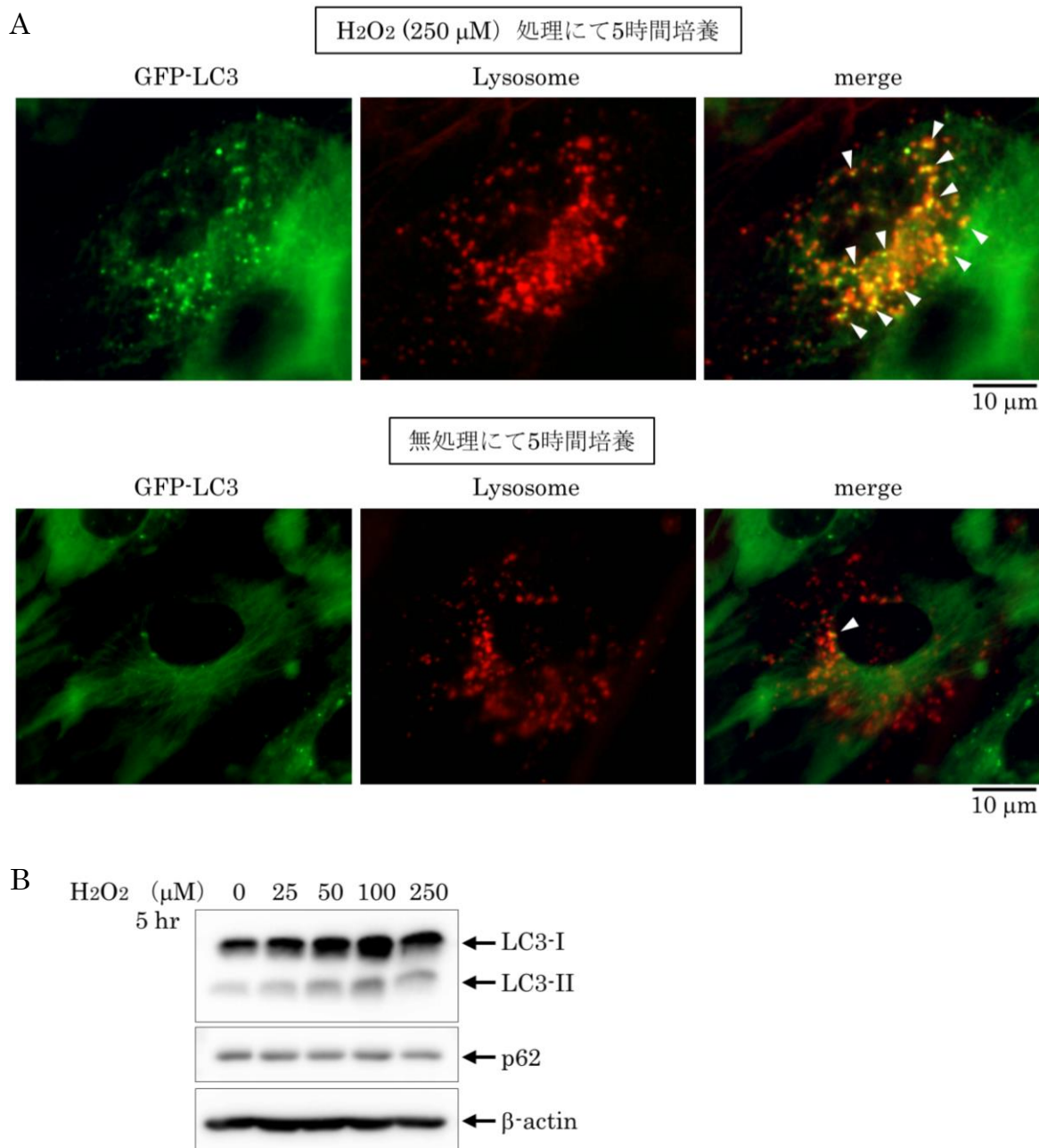


図3 H₂O₂ 処理による HPDL のオートファジーの誘導

A : GFP-LC3 安定発現 HPDL を H₂O₂ (250 μM) で処理し、5 時間後の GFP-LC3 の集積 (左列) とリソソームの局在 (中央列) を観察した。右列には、左列と中央列を重ね合わせた像を示す。GFP-LC3 とリソソームとの共局在部位を白矢頭で示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

B : 各濃度の H₂O₂ で HPDL を刺激して 5 時間後の、LC3-I/II ならびに p62 の発現をウェスタンブロットティング法を用いて解析した。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

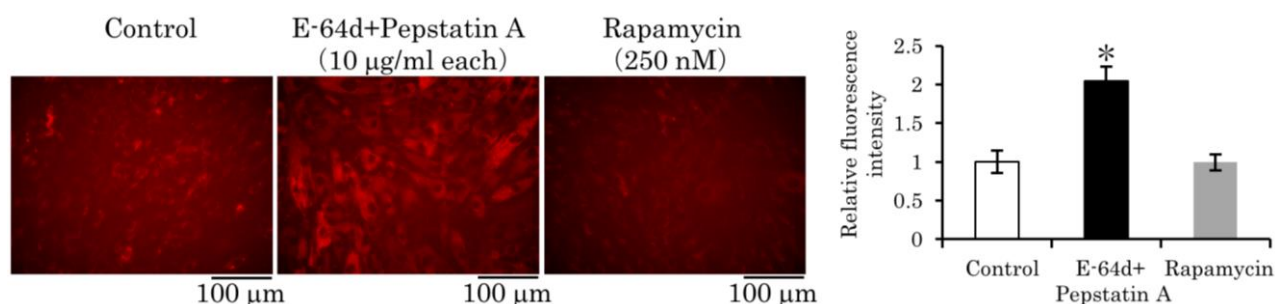
4. オートファジーが HPDL の ROS 生成と消去に与える影響

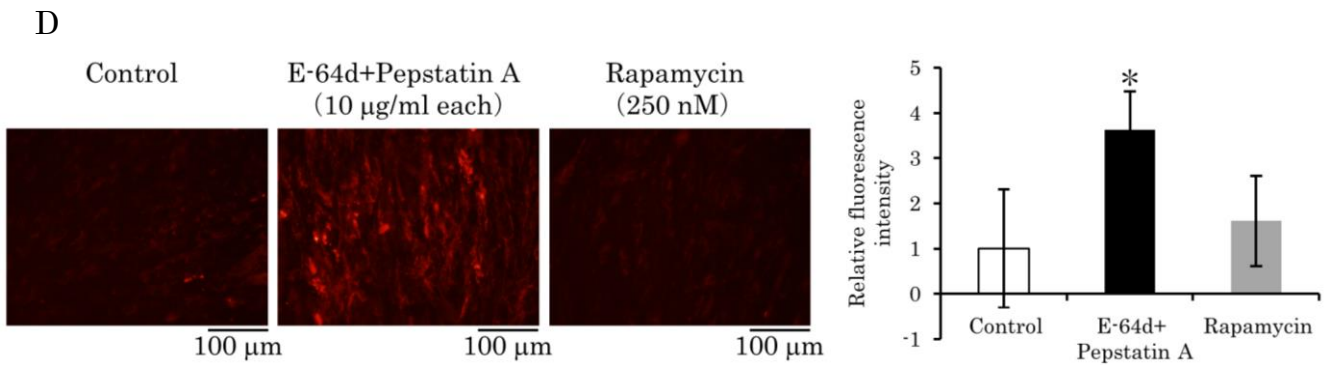
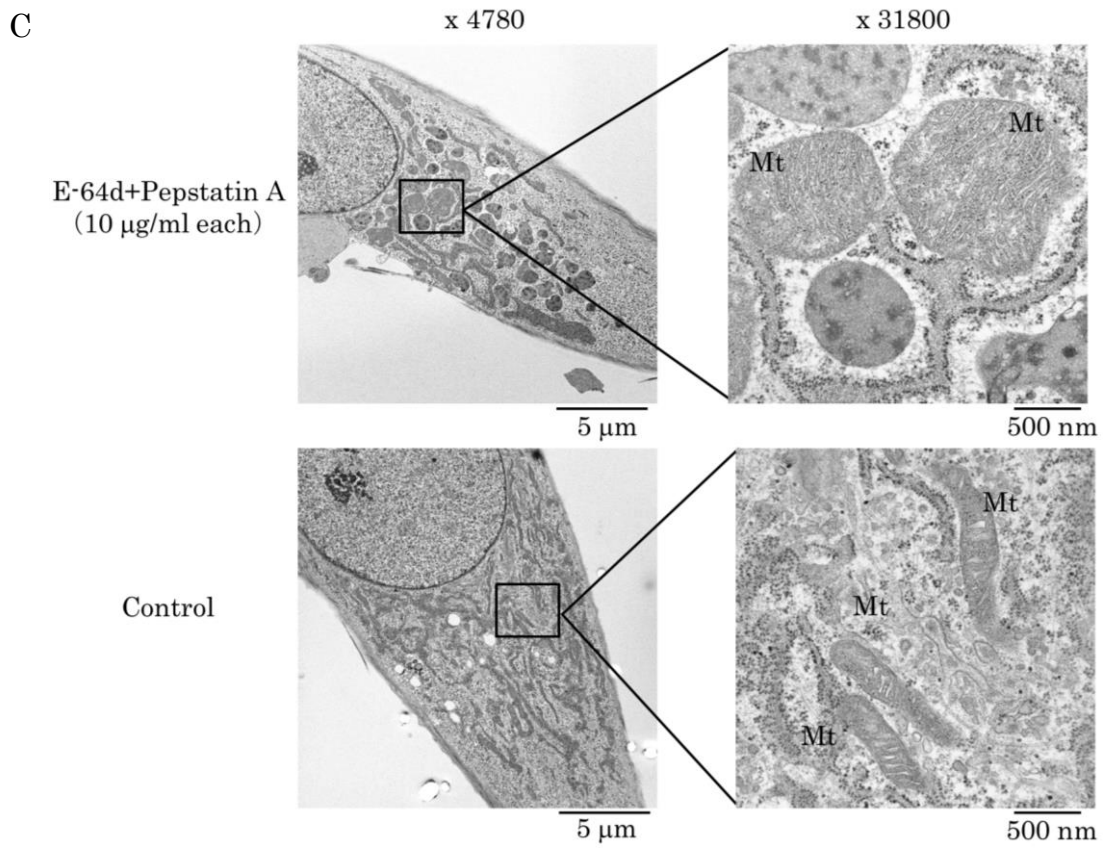
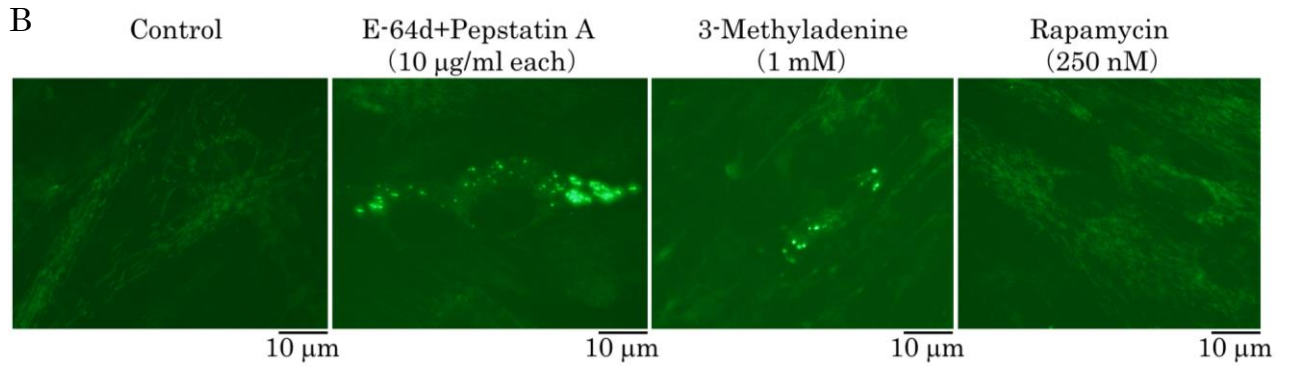
酸化ストレスは、細胞内の ROS 代謝を調節制御する。そこでオートファジー誘導剤あるいは阻害剤処理下での HPDL の ROS 蓄積量の変動を計測した。オートファジー阻害剤である E-64d とペプスタチン A の添加により HPDL の細胞内 ROS 量の著明な増加を認めた。オートファジー誘導剤であるラパマイシンの添加では ROS 量の有意な変化を認めなかった。マイクロプレートリーダーを用いた定量解析においても、E-64d とペプスタチン A 添加下では、Control 群と比較し有意な ROS 量の増加が認められた (図 4A)。

オートファジーの阻害による細胞内 ROS 蓄積のメカニズムを検討するため、細胞内の最大の ROS 生成の場であるミトコンドリア²⁷に着目し、解析を行った。E-64d とペプスタチン A ならびに 3-メチルアデニン添加によるオートファジーの阻害下では、MitoTracker で染色されたミトコンドリアの一部は、Control 群には認められないような膨張した球状の染色像を示した (図 4B)。透過型電子顕微鏡を用いて微細な形態を詳細に検討した結果、E-64d とペプスタチン A を添加し培養した HPDL では、Control と比し、不規則なクリステ構造を呈する膨化ミトコンドリアが多数存在していることが認められた (図 4C)。ミトコンドリア由来 ROS を特異的に検出する蛍光プローブを用いて解析を行ったところ、オートファジー阻害下ではミトコンドリア ROS 量の増加が観察され、マイクロプレートリーダーを用いた定量解析により有意差を認めた (図 4D)。さらに、ミトコンドリア ROS のスカベンジャーである Mito-TEMPO の処理下では、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 (図 4E)。

以上の結果から、オートファジーは、HPDL における酸化ストレス誘導性の ROS 生成の一部を調節制御していることが示唆された。

A





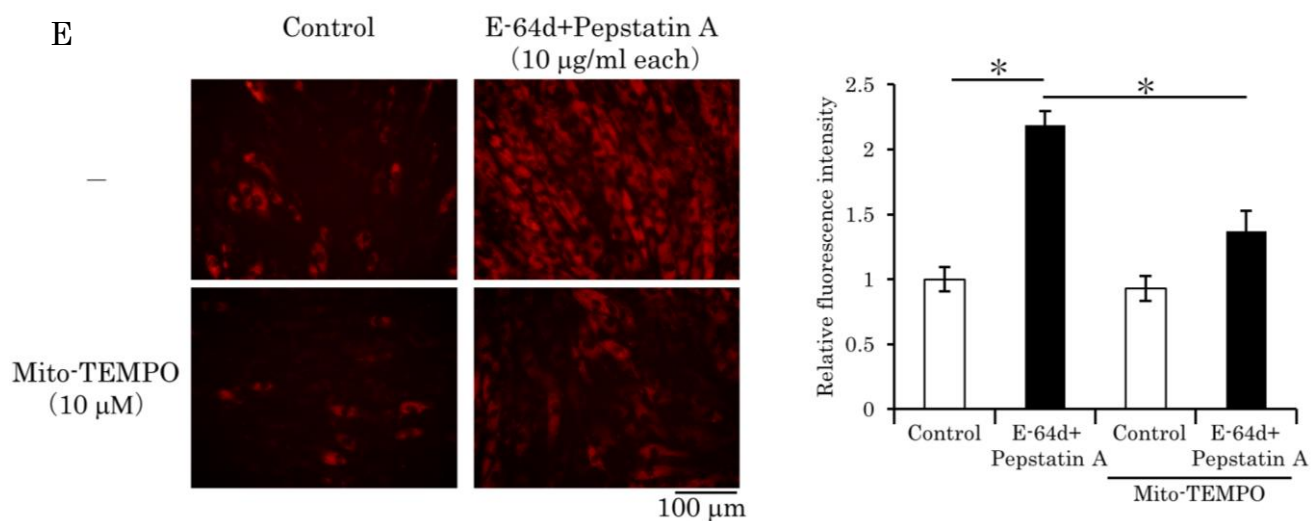


図4 オートファジーが HPDL の ROS 蓄積量とミトコンドリアに与える影響

A : オートファジー阻害剤あるいは誘導剤添加下で HPDL を 4 日間培養し、CellROX Orange により細胞内の ROS を染色した。左側に蛍光顕微鏡での観察像を、右側にマイクロプレートリーダーによる測定結果を示す (* : $p < 0.01$ vs. Control)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

B : HPDL のミトコンドリアを MitoTracker を用いて染色した後、オートファジー阻害剤あるいは誘導剤を添加して 4 日間培養後、蛍光顕微鏡で観察した。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

C : E-64d (10 µg/ml) とペプスタチン A (10 µg/ml) を添加して 4 日間培養した HPDL を透過型電子顕微鏡を用いて観察した (Mt : ミトコンドリア)。

D : オートファジー阻害剤あるいは誘導剤添加下で HPDL を 4 日間培養し、MitoSOX Red によりミトコンドリア内の ROS を特異的に染色した。左側に蛍光顕微鏡での観察像を、右側にマイクロプレートリーダーによる測定結果を示す (* : $p < 0.01$ vs. Control)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

E : Mito-TEMPO (10 µM) を E-64d (10 µg/ml) ならびにペプスタチン A (10 µg/ml) と併せて添加し、HPDL を 4 日間培養後の細胞内 ROS を CellROX Orange を用いて染色した。左側に蛍光顕微鏡での観察像を、右側にマイクロプレートリーダーによる測定結果を示す (* : $p < 0.01$)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

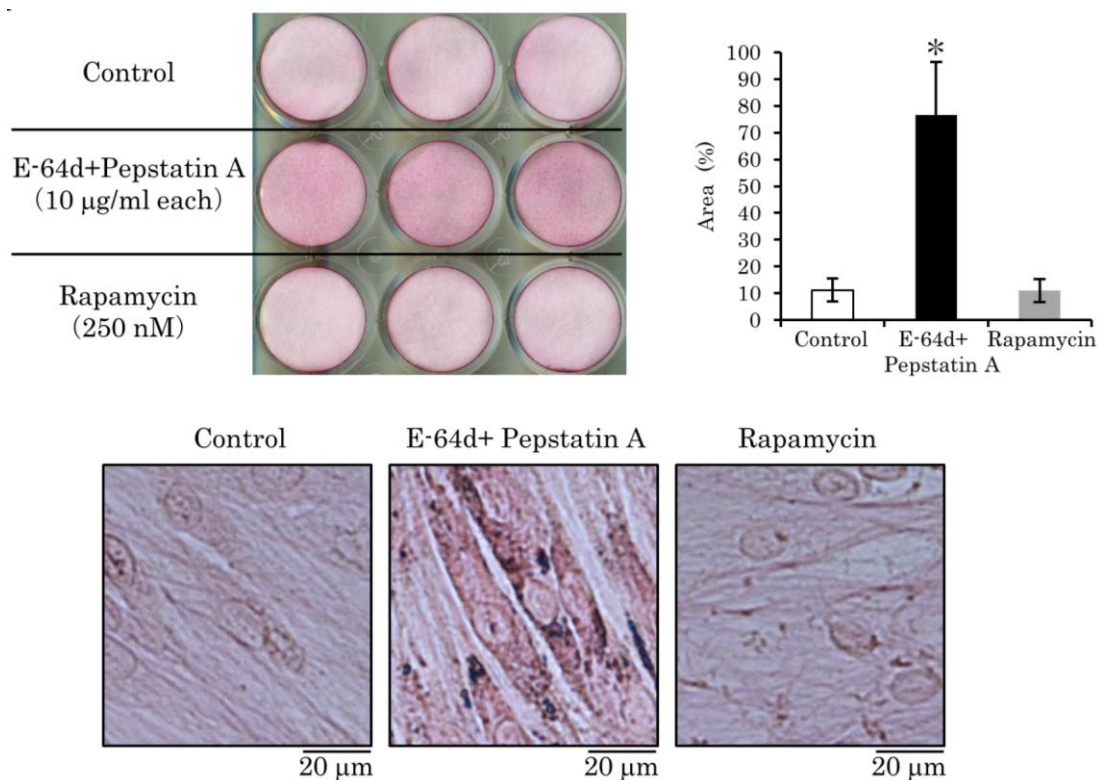
5. オートファジーが HPDL のコラーゲン蓄積に与える影響

歯根膜細胞はコラーゲンに代表される ECM タンパクを大量に産生することで、歯周組織の恒常性を維持している。そこで、オートファジーが HPDL のコラーゲン産生に及ぼす影響について検討した。HPDL はオートファジー阻害剤である E-64d とペプスタチン A 存在下では、Picrosirius Red 染色陽性のコラー

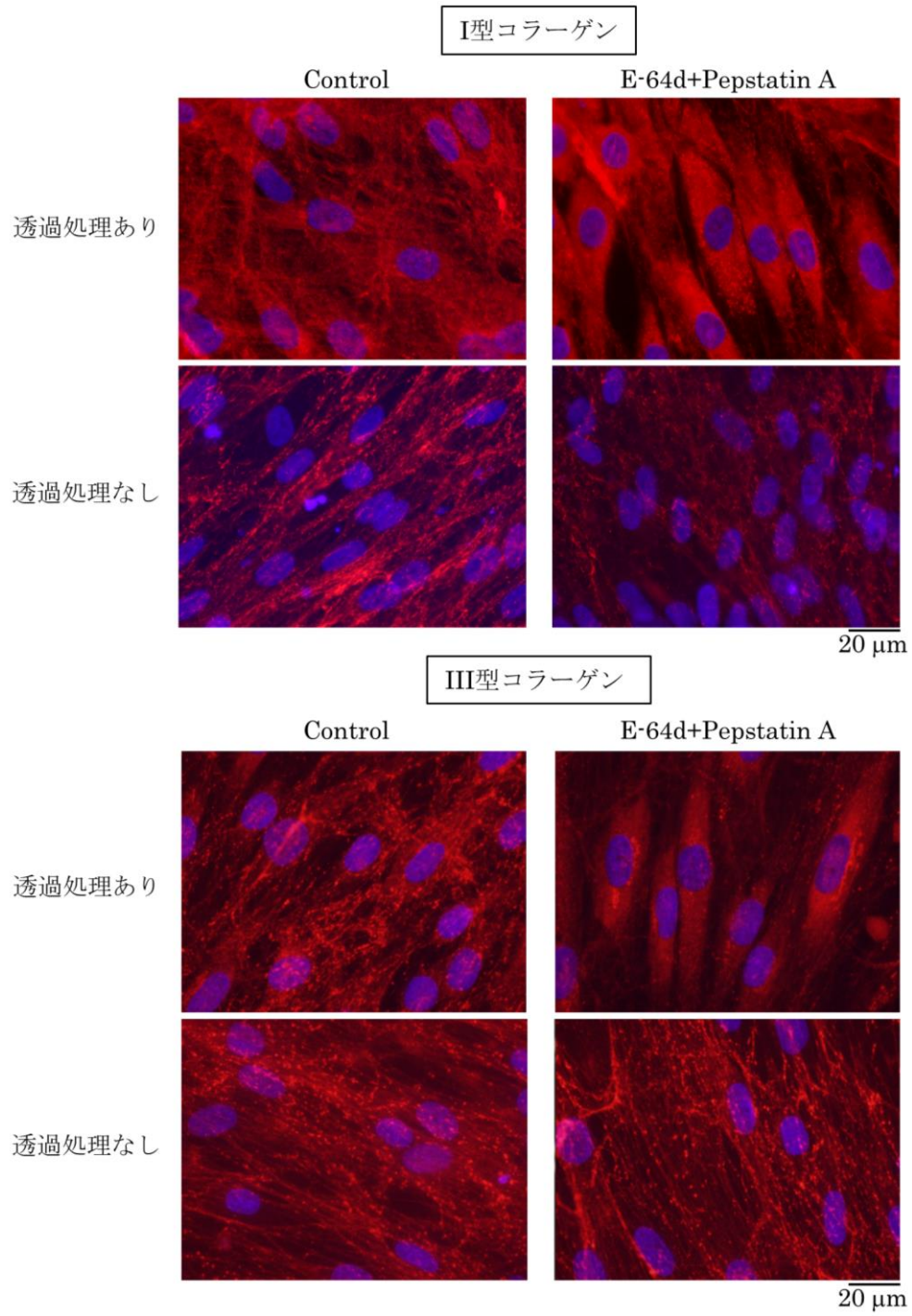
ゲンの増加を示し、定量解析にて **Control** 群と比し有意なコラーゲン量の増加を認めた。染色像の光学顕微鏡を用いた観察により、**E-64d** とペプスタチン **A** 存在下では細胞質内が強く染色されていることが認められた (図 **5A**)。さらに、蓄積したコラーゲンの細胞内分布を検討するため、抗 **I** 型ならびに抗 **III** 型コラーゲン抗体を用いた細胞免疫染色を行った。培養細胞を固定後、膜透過処理を行ったサンプルでは、オートファジー阻害によるコラーゲン染色の増加が観察された。一方、膜透過処理を行わなかったサンプルでは、コラーゲン染色の低下が認められた (図 **5B**)。これらの結果により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。さらに、**E-64d** とペプスタチン **A** 存在下で培養した **HPDL** の透過型電子顕微鏡像において、小胞構造内に内容物を含んだリソソームの増加を認めた (図 **5C**)。また、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により、**LAMP-1** ならびに **LC3** と **I** 型コラーゲンとの共局在が認められた (図 **5D**)。このことから透過型電子顕微鏡で観察されたリソソームとオートリソソームの内容物には **I** 型コラーゲン様のタンパクが含まれていることが示唆された。

以上の結果より、オートファジーが **HPDL** のコラーゲン産生を調節制御していることが示唆された。

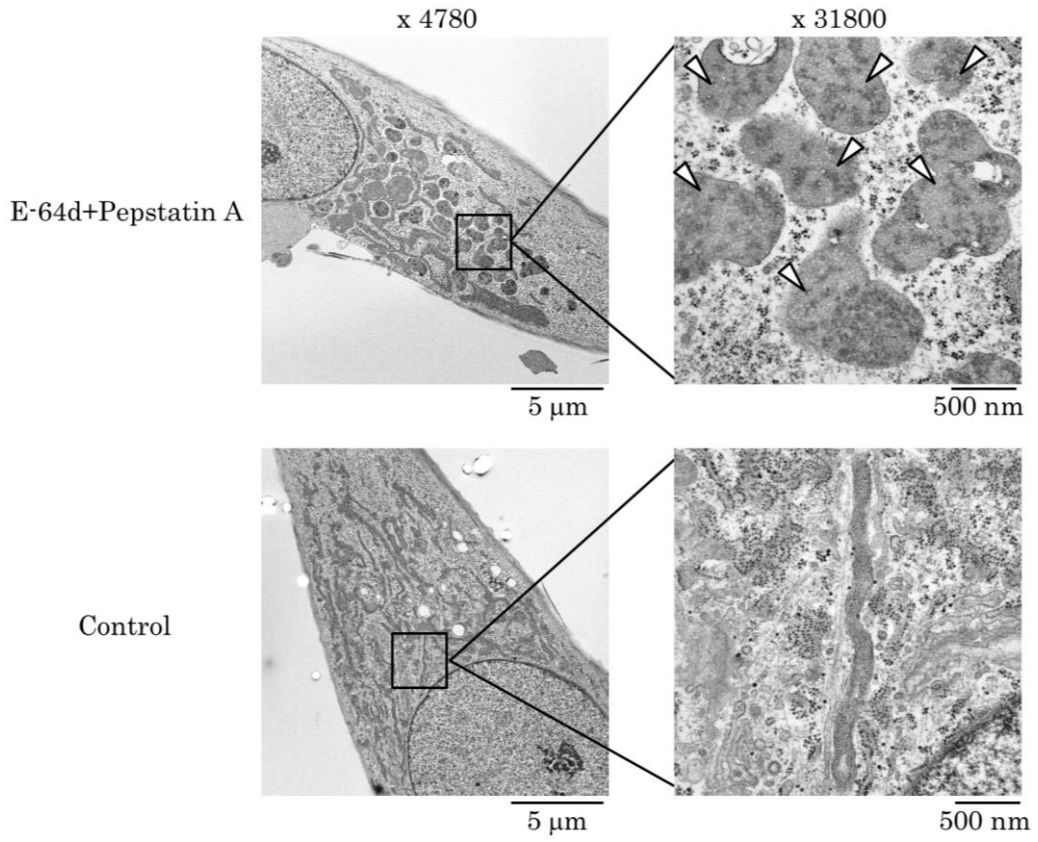
A



B



C



D

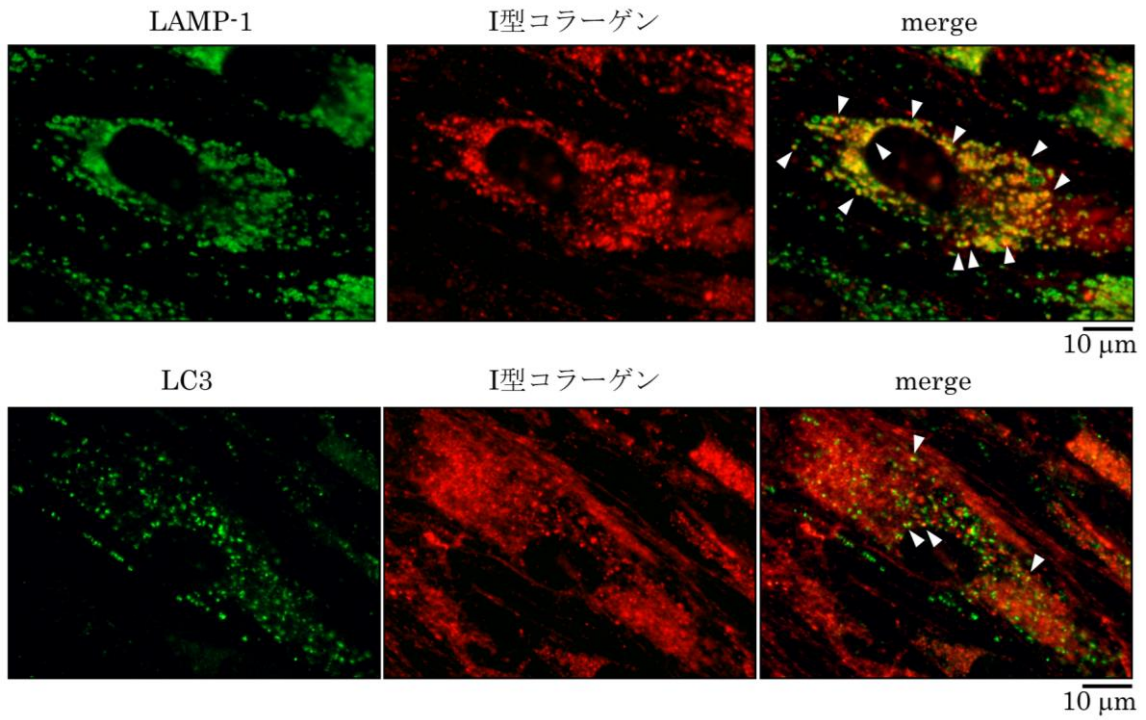


図5 オートファジーがコラーゲンの蓄積に与える影響

A : E-64d (10 $\mu\text{g/ml}$) とペプスタチン A (10 $\mu\text{g/ml}$)、ラパマイシン (250 nM) を添加して 6 日間培養した HPDL のコラーゲンを、Picosirius Red Staining Kit を用いて染色した。上段左側に染色像と右側に画像解析結果を、下段に染色の強拡大像を示す (* : $p < 0.01$ vs. Control)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

B : E-64d (10 $\mu\text{g/ml}$) とペプスタチン A (10 $\mu\text{g/ml}$) を添加して 6 日間培養した HPDL を、抗 I 型ならびに抗 III 型コラーゲン抗体を用いて細胞免疫染色を行った。上段に膜透過処理を行ったものを、下段に膜透過処理を行っていないものを示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

C : E-64d (10 $\mu\text{g/ml}$) とペプスタチン A (10 $\mu\text{g/ml}$) を添加して 4 日間培養した HPDL を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。リソソームを白矢頭で示す。

D : E-64d (10 $\mu\text{g/ml}$) とペプスタチン A (10 $\mu\text{g/ml}$) を添加して 6 日間培養した HPDL を、抗 LAMP-1 抗体ならびに抗 LC3 抗体と抗 I 型コラーゲン抗体を用いて免疫二重染色を行った。LAMP-1 あるいは LC3 と I 型コラーゲンとの共局在部位を白矢頭で示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

6. オートファジーが HPDL において、コラーゲンのタンパクならびに mRNA 発現に与える影響

次に、オートファジーが HPDL におけるコラーゲンの生合成に及ぼす影響について検討した。培養上清中に分泌された成熟型 I 型コラーゲン量を ELISA 法を用いて解析した。細胞内の I 型ならびに III 型コラーゲンの mRNA 発現量を Real-Time PCR 法を用いて定量解析した。オートファジーの阻害下では、培養上清中に分泌された成熟型 I 型コラーゲン量は Control 群と比べ有意に減少した (図 6A)。I 型コラーゲンの mRNA 発現は、オートファジー阻害下では Control 群と比し、抑制が認められた一方、オートファジー誘導剤であるラパマイシン添加では発現の亢進が認められた。III 型コラーゲンについては、E-64d とペプスタチン A、クロロキン添加では mRNA 発現の抑制を認めたが、3-メチルアデニンおよびラパマイシン添加によっては mRNA 発現の有意な変化を認めなかった (図 6B)。

オートファジー阻害剤を添加し培養した HPDL では、還元条件下での抗 I 型コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロッティング法による解析で、Control と比べ I 型プロコラーゲンの発現量の減少を認めた。E-64d とペプスタチン A を添加し培養した HPDL では、Control と比し分子量の異なるコラーゲンタンパクが検出された。非還元条件下では、オートファジー阻害剤を添加し培養した HPDL において、成熟型 I 型コラーゲンのタンパク発現量の減少を認めた。ラパマイシンを添加し培養した HPDL では Control と比べ、還元条件下では I 型

プロコラーゲンの発現量減少を認めたが、非還元条件下では成熟型 I 型コラーゲンの発現量増加を認めた (図 6C)。以上より、オートファジーが HPDL の細胞外へのコラーゲン産生を mRNA ならびにタンパク合成レベルで調節、制御していることが示唆された。

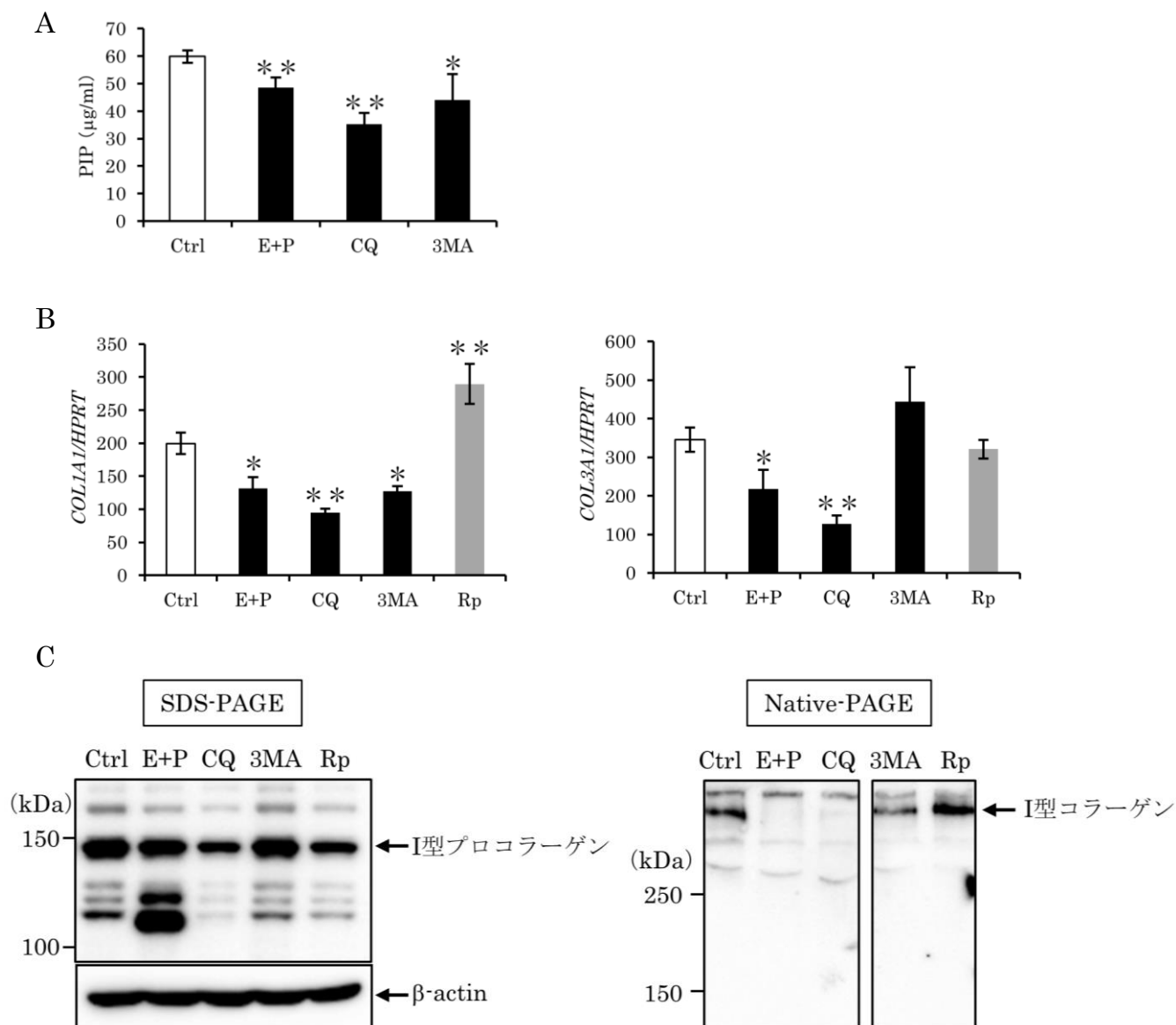


図 6 オートファジーが HPDL のコラーゲン合成に与える影響

A : HPDL をオートファジー阻害剤を添加して 6 日間培養し、培養上清中に分泌された PIP 量を ELISA 法により定量解析した (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs. Control)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。E+P : E-64d (10 µg/ml) + ペプスタチン A (10 µg/ml)、CQ : クロロキン (10 µM)、3MA : 3-メチルアデニン (1 mM)

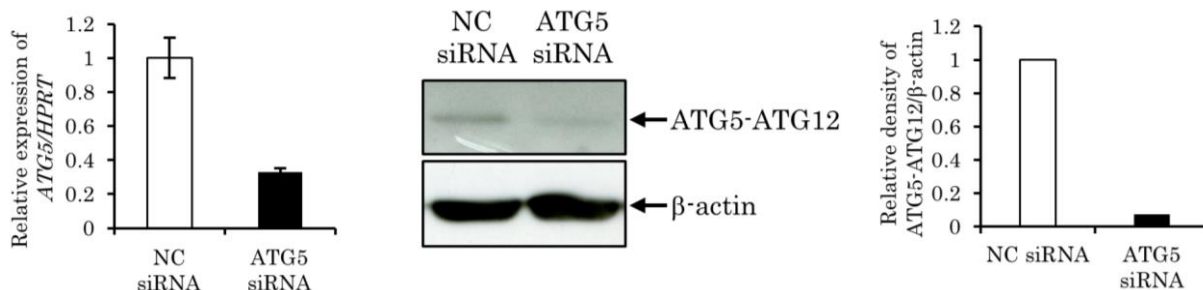
B : オートファジー阻害剤あるいは誘導剤を添加して 3 日間培養後の、I 型ならびに III 型コラーゲンの mRNA 発現を Real-Time PCR 法を用いて解析した (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ vs. Control)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。E+P : E-64d (10 $\mu\text{g/ml}$) + ペプスタチン A (10 $\mu\text{g/ml}$)、CQ : クロロキン (10 μM)、3MA : 3-メチルアデニン (1 mM)、Rp : ラパマイシン (250 nM)

C : オートファジー阻害剤あるいは誘導剤を添加して 6 日間培養後、抗 I 型コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロッティング法によりタンパク発現を解析した。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。E+P : E-64d (10 $\mu\text{g/ml}$) + ペプスタチン A (10 $\mu\text{g/ml}$)、CQ : クロロキン (10 μM)、3MA : 3-メチルアデニン (1 mM)、Rp : ラパマイシン (250 nM)

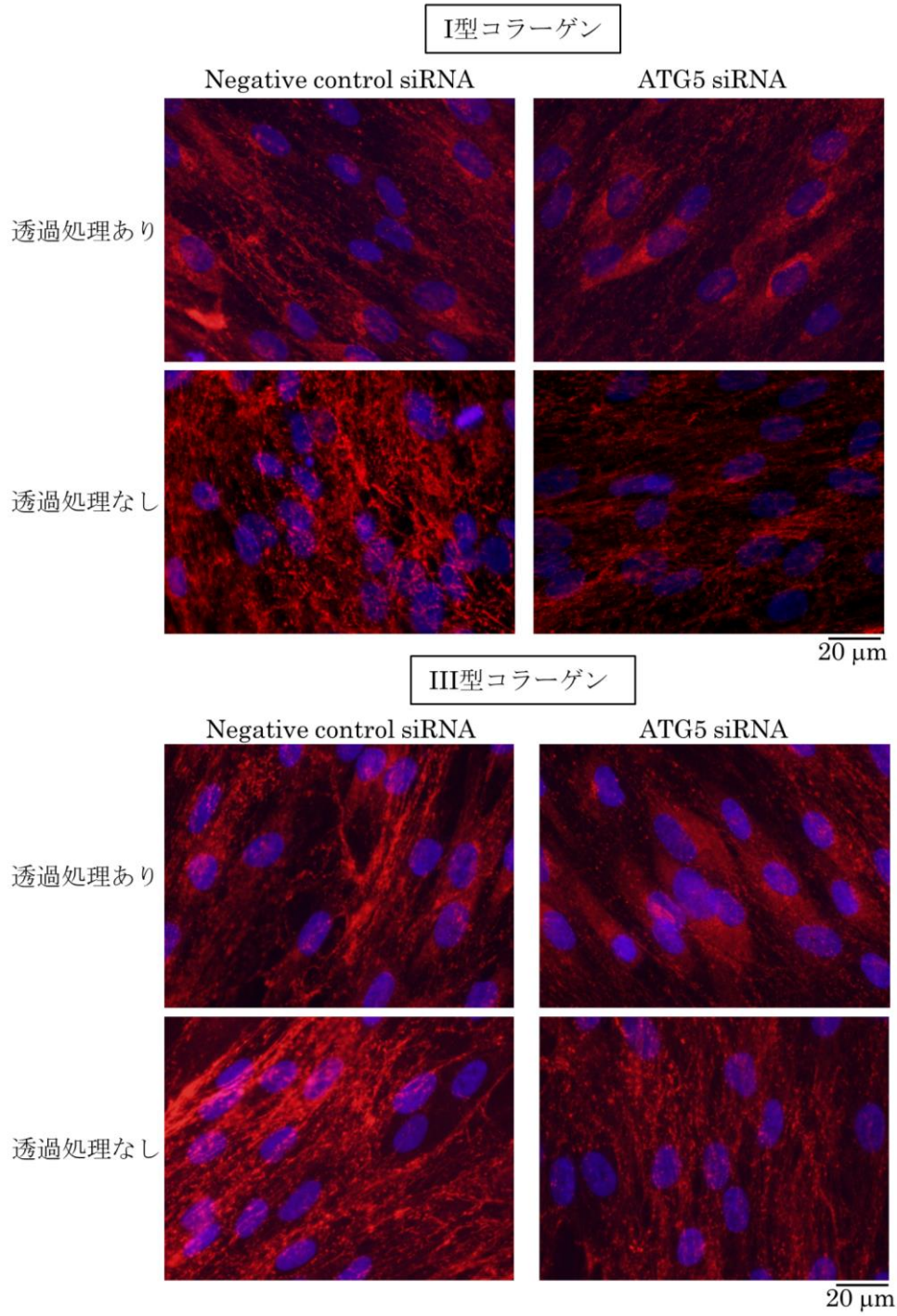
7. ATG5 ノックダウンが HPDL の細胞内コラーゲン分布と、タンパクならびに mRNA 発現に及ぼす影響

これまでの、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。そこで、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²⁸を RNAi によりノックダウンすることにより、同じ実験系にて検討を行った。ATG5 の siRNA を HPDL に遺伝子導入すると mRNA レベルでは、Control 群と比し約 70% の ATG5 発現の抑制が認められ、タンパクレベルにおいても、ATG12 と共有結合した ATG5 の発現が抑制されていることがウェスタンブロッティング法にて確認された (図 7A)。ATG5 ノックダウンによる実験結果は、これまでの薬剤を用いた場合の実験結果と同様の結果を示した。ATG5 をノックダウンした HPDL においても、阻害剤処理した細胞免疫染色と同様に、細胞外へのコラーゲン分泌の減少を認めた (図 7B)。コラーゲンの mRNA 発現については I 型、III 型コラーゲンともに ATG5 ノックダウンにより、Control 群と比し発現の抑制が認められた (図 7C)。

A



B



C

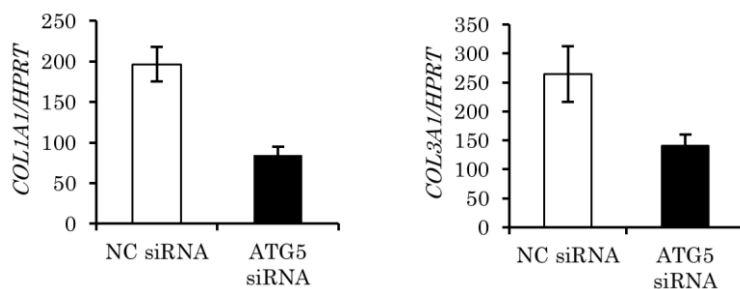


図7 ATG5 ノックダウンが HPDL のコラーゲン蓄積と生合成に与える影響

A : HPDL に ATG5 siRNA を導入し、導入効率を mRNA レベル (左) とタンパクレベル (中央) で確認した。ウェスタンブロッティング法で得られたバンドの濃度を解析した結果を右に示す (NC : ネガティブコントロール)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

B : ATG5 をノックダウンした HPDL を 6 日間培養後、抗 I 型ならびに抗 III 型コラーゲン抗体を用いて細胞免疫染色を行った。上段に膜透過処理を行ったものを、下段に膜透過処理を行っていないものを示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

C : HPDL の ATG5 をノックダウンした 3 日後、I 型ならびに III 型コラーゲンの mRNA 発現を Real-Time PCR 法を用いて解析した (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs. NC siRNA : ネガティブコントロール siRNA)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

8. オートファジーが HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響

歯根膜細胞はセメント芽細胞や骨芽細胞などの硬組織形成細胞へ分化することが明らかとされている¹¹。オートファジーが HPDL の硬組織形成細胞への分化に及ぼす影響を検討するため、石灰化誘導培地で HPDL を長期培養し、アルカリホスファターゼ活性と石灰化関連遺伝子の発現を解析した。その結果アルカリホスファターゼ活性は、オートファジー阻害剤処理ならびに ATG5 ノックダウンにより有意に抑制された (図 8A)。オートファジー阻害剤処理や ATG5 ノックダウンは、ALP の mRNA 発現を有意に抑制した。SP7 と RUNX2 についても、オートファジー阻害剤処理や ATG5 ノックダウンによる発現の抑制を認めた (図 8B)。これより、オートファジーが HPDL の硬組織形成細胞への分化過程にも関与することが示唆された。

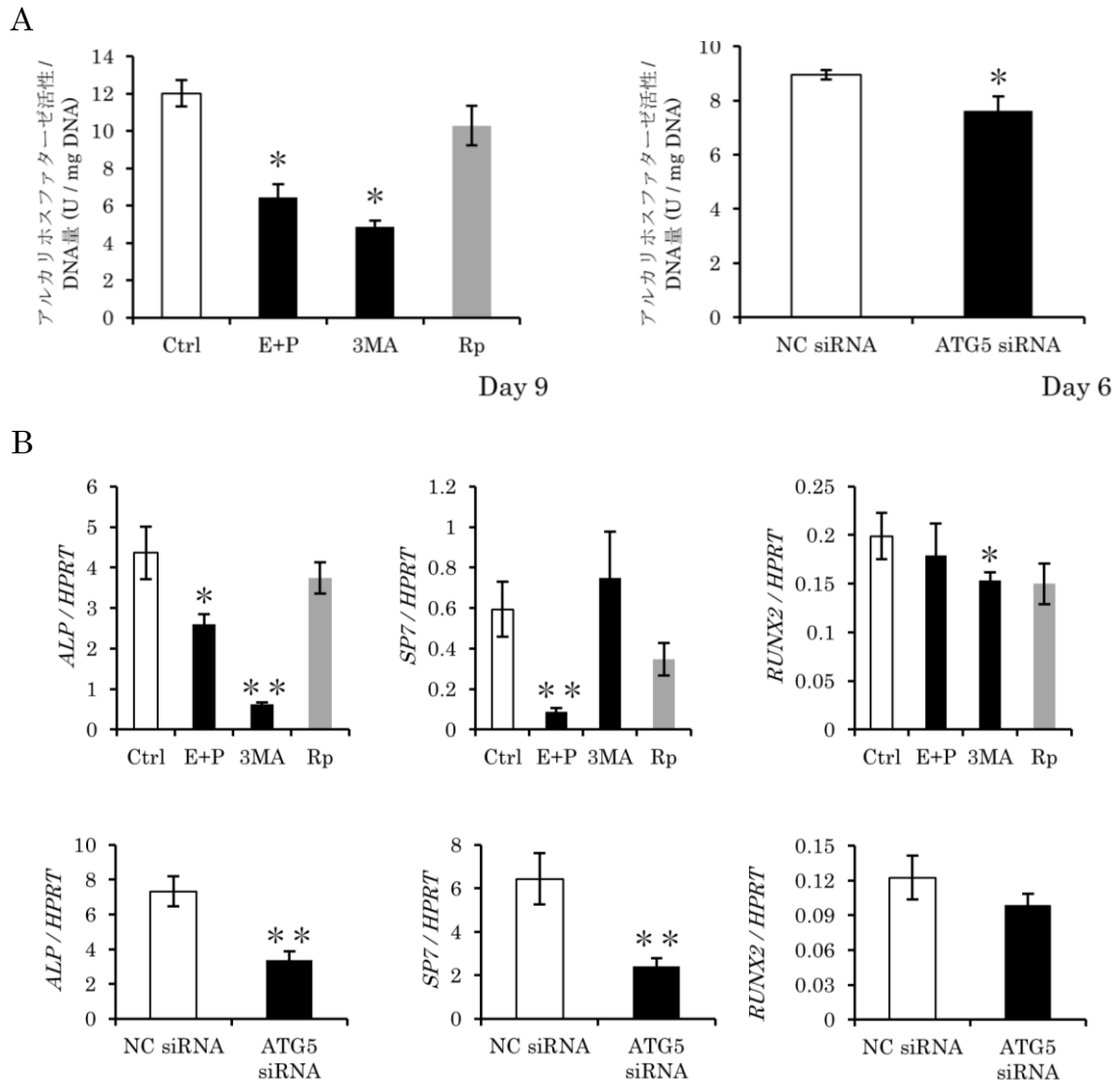


図 8 オートファジーがアルカリホスファターゼ活性と石灰化関連遺伝子発現に与える影響

A : オートファジー阻害剤あるいは誘導剤を添加した石灰化誘導培地で HPDL を 9 日間培養後 (左)、あるいは ATG5 をノックダウンした HPDL を石灰化誘導培地で 6 日間培養後 (右)、アルカリホスファターゼ活性を測定した (* : $p < 0.01$ vs. Control)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。E+P : E-64d (10 $\mu\text{g/ml}$) + ペプスタチン A (10 $\mu\text{g/ml}$)、3MA : 3-メチルアデニン (1 mM)、Rp : ラパマイシン (250 nM)、NC : ネガティブコントロール

B : オートファジー阻害剤あるいは誘導剤を添加した石灰化誘導培地で HPDL を 3 日間培養後 (上段)、あるいは ATG5 をノックダウンした HPDL を石灰化誘導培地で 3 日間培養後 (下段)、石灰化関連遺伝子の発現を Real-Time PCR 法を用いて解析した (* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ vs. Control)。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。E+P : E-64d (10 $\mu\text{g/ml}$) + ペプスタチン A (10 $\mu\text{g/ml}$)、3MA : 3-メチルアデニン (1 mM)、Rp : ラパマイシン (250 nM)、NC : ネガティブコントロール

考察

これまでに、オートファジーが歯周病細菌の上皮細胞への侵入排除に関与することは報告されている²⁹が、歯周病とオートファジーの関連についての詳細な検討はなされておらず、歯周組織の恒常性維持や歯周病の病態形成に果たすオートファジーの役割については未だ明らかとなっていない。本研究では、初代培養ヒト歯根膜細胞（HPDL）を用いた *in vitro* のオートファジー実験システムを樹立することで、解析、検討を行った。

歯根膜細胞は、歯周組織の恒常性維持や修復・再生において中心的な役割を担うことが知られている。そこで、歯根膜細胞の酸化ストレス応答メカニズムや、ECM 産生ならびに硬組織形成細胞への分化に果たすオートファジーの生理的役割に焦点を絞り解析を行った。その結果、オートファジーが歯根膜細胞の酸化ストレス制御に関与していること、正常な ECM の生合成にはオートファジーが必須であり、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。

本研究では酸化ストレス刺激として H₂O₂ を用い、同刺激を与えることにより HPDL のオートファジーが誘導された（図 3）。オートファジーを制御するシグナルとして mammalian target of rapamycin（以下 mTOR と略す）経路が知られている。哺乳類細胞においては、サブユニットの異なる mTOR 複合体のひとつである mTOR 複合体 1 がオートファジーを抑制的に制御している³⁰ことから、酸化ストレス刺激によって mTOR 経路の上流にある AMP キナーゼが活性化され、オートファジーが誘導されたと考えられる³¹。口腔内細菌のなかには過酸化水素産生菌が存在することが報告されており³²、歯根膜細胞では、口腔内細菌や好中球などから産生された ROS に対してオートファジーが作動することで、細胞内への酸化ストレスの蓄積を回避する適応機構の存在が示唆されたものと考えられる。また、定常状態のオートファジーの阻害により HPDL のミトコンドリア由来の細胞内 ROS 蓄積の増加を認めた。（図 4）。その一方で、オートファジー誘導剤であるラパマイシン処理による HPDL の細胞内 ROS 蓄積量の低下は認められなかった。これらの結果は、歯根膜細胞において、オートファジーが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のみならず、定常状態においても、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を示唆するものである。また、Mito-TEMPO による ROS 抑制効果が部分的であったことは、オートファジーが障害ミトコンドリア以外の ROS 生成に関わる細胞内器官の除去に関与していると考えられる。

オートファジーのコラーゲン産生に与える影響については、軟骨細胞や腎線維芽細胞における機能解析の報告がなされている^{33,34}。本研究で用いた HPDL において、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 (図 6B、図 7C)。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。透過型電子顕微鏡を用いた解析により、オートファジー阻害剤である E-64d とペプスタチン A 存在下ではリソソームの内容物が分解されず蓄積していた (図 5C)。E-64d とペプスタチン A は、オートファジーの後期過程のリソソーム酵素を標的とした阻害剤であることから、内容物の一部は、コラーゲン生成過程で生じた異常コラーゲンが、オートリソソーム内で分解されずに凝集したのと考えられる。これは、還元条件下でのタンパク解析において、E-64d とペプスタチン A 処理下では、蓄積したミスフォールディングなコラーゲンタンパクが正常より分子量の異なるサイズとして検出され、非還元条件下では、正常な可溶性のコラーゲンタンパク量が減少して検出された実験結果と一致するものである (図 6C)。

哺乳類細胞において、コラーゲンは小胞体で合成されゴルジ体によって細胞外へ輸送、分泌される。この過程において生ずる小胞体の異常構造タンパクは、大部分が小胞体関連分解によりユビキチン・プロテアソーム系で分解される³⁵が、三重らせん構造を維持した異常コラーゲンは主にオートファジーによって分解されることが明らかとなっている³⁶。3-メチルアデニン処理や ATG5 のノックダウンによるオートファジーの膜形成開始の阻害では、E-64d とペプスタチン A とは異なり、小胞体内に異常コラーゲンが蓄積していると考えられる。現在、抗コラーゲン抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析や細胞内小器官に対する蛍光プローブを用いたイメージング解析により、オートファジーの各過程におけるコラーゲンの詳細な細胞内局在を解析中である。

未分化間葉系細胞が骨芽細胞へ分化する過程ではその成熟期において、小胞体ストレス応答が I 型コラーゲンなどの骨基質の転写を促進、誘導することが報告されている^{37,38}。本研究では HPDL のオートファジー阻害により ALP をはじめとする石灰化関連遺伝子の発現抑制とアルカリホスファターゼ活性の顕著な低下を認めた (図 8)。したがって、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に際しては、小胞体ストレス応答とは異なるメカニズムで作用する可能性が示唆される。例えば、オートファジーの阻害は HPDL において過剰な ROS の蓄積を惹起することから、オートファジー阻害による細胞内の酸化ストレスの増加が、歯根膜細胞の分化を抑制している可能性が考えられる。

本研究は *in vitro* 実験系で行ったが、*in vivo* 実験系としては、*ATG5* や *ATG7* などのオートファジー関連遺伝子のノックアウトマウスを用いた実験的歯周炎モデルが考えられる。全身的なオートファジー関連因子のノックアウトマウスは出生直後に死亡する³⁹⁻⁴³ ことから、実験的歯周炎モデルの解析においては、組織特異的なコンディショナルノックアウトマウスを用いる必要がある。しかしながら、歯周炎の発症には個体全体の免疫系、内分泌系が関与することから、遺伝子のコンディショナルノックアウトによる限局的な解析結果は、ヒトにおける臨床像を反映しない可能性が想定される。したがって、ノックアウトマウスを用いた解析と併せて、オートファジーの機能不全をともなう慢性疾患を有する集団を対象とした歯周組織の疫学調査や保存困難で抜歯した歯などの試料の解析が “Clinical Relevance” の確立には必要と考えている。

オートファジーの低下が糖尿病や心筋梗塞などの慢性疾患の発症機序に関与していることが提唱されている。興味深いことに、これらの慢性疾患と歯周病との相関については疫学レベルのみならず、分子レベルで証明がなされている。また、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³³ 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 (図 9)。近年、食事カロリー制限が慢性疾患の発症低下に寄与するとの大規模疫学調査や遺伝子組換え動物を用いての報告がなされている⁴⁴。実際に、抗酸化食品として注目されているポリフェノールの一種のレスベラトロールや、ターメリックの成分であるクルクミンが、オートファジーを誘導することが報告されている^{45,46}。これらオートファジーを誘導する食品群の摂取や食事カロリー制限は、全身のみならず、歯根膜のオートファジー制御を介した歯周病の発症や進行を抑制する新たな治療法につながる可能性があり、歯科治療分野への応用が期待される。

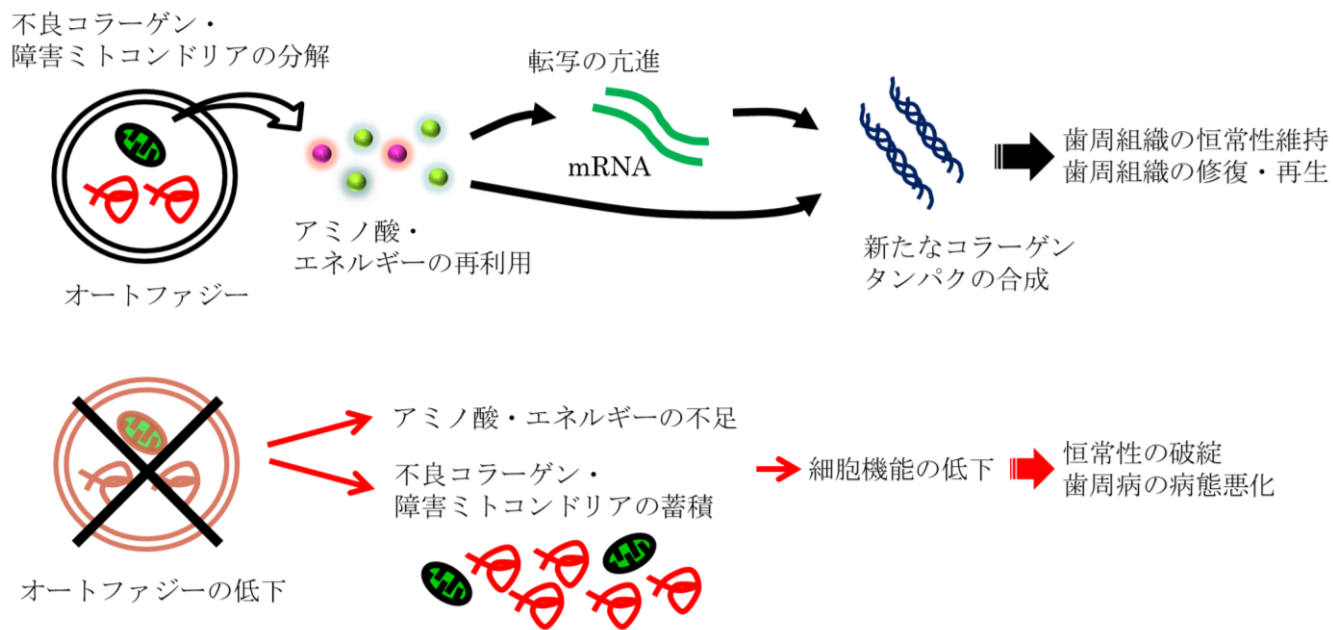


図9 歯根膜細胞のオートファジーと歯周病病態の関係（作業仮説）

結論

本研究結果より以下の結論を得た。

1. オートファジーがヒト歯根膜細胞で生じた過剰な ROS を恒常的に軽減することで、歯周組織の恒常性維持に関与していることが示された。
2. オートファジーがヒト歯根膜細胞の代表的な生理作用であるコラーゲン代謝と硬組織形成細胞への分化に寄与していることが明らかとなった。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御高閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の進行にあたり直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学歯学部附属病院 口腔治療・歯周科、山下元三助教に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

1. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007;21(22):2861-2873.
2. Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* 2005;280(48):40282-40292.
3. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008;183(5):795-803.
4. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011;469(7330):323-335.

5. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009;43:67-93.
6. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 2007;13(5):619-624.
7. Lin NY, Beyer C, Giessl A, Kireva T, Scholtysek C, Uderhardt S, Munoz LE, Dees C, Distler A, Wirtz S, Kronke G, Spencer B, Distler O, Schett G, Distler JH. Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72(5):761-768.
8. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab* 2008;8(4):325-332.
9. Picton DC. The periodontal enigma: eruption versus tooth support. *Eur J Orthod* 1989;11(4):430-439.
10. Yamada S, Murakami S, Matoba R, Ozawa Y, Yokokoji T, Nakahira Y, Ikezawa K, Takayama S, Matsubara K, Okada H. Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of *PLAP-1*, a novel SLRP family gene. *Gene* 2001;275(2):279-286.
11. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi ST. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364(9429):149-155.
12. Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 1996;245(2):327-341.

13. Lekic PC, Rajshankar D, Chen H, Tenenbaum H, McCulloch CA. Transplantation of labeled periodontal ligament cells promotes regeneration of alveolar bone. *Anat Rec* 2001;262(2):193-202.
14. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* 1997;13:20-40.
15. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000* 2007;43:160-232.
16. Nassar H, Kantarci A, van Dyke TE. Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol 2000* 2007;43:233-244.
17. Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008;35(4):277-290.
18. de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5(4):218-224.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-685.
21. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946;164:321-329.
22. Kuma A, Mizushima N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient

- metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21(7):683-690.
23. Klionsky DJ, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012;8(4):445-544.
 24. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j* 2000;19(21):5720-5728.
 25. Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol* 2009;452:181-197.
 26. Kuma A, Matsui M, Mizushima N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* 2007;3(4):323-328.
 27. Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 2009;46(9):1283-1297.
 28. Matsushita M, Suzuki NN, Obara K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. Structure of Atg5-Atg16, a complex essential for autophagy. *J Biol Chem* 2007;282(9):6763-6772.
 29. Takeuchi H, Furuta N, Morisaki I, Amano A. Exit of intracellular *Porphyromonas gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. *Cell Microbiol* 2011;13(5):677-691.
 30. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 2010;40(2):310-322.
 31. She C, Zhu LQ, Zhen YF, Wang XD, Dong QR. Activation of AMPK

- protects against hydrogen peroxide-induced osteoblast apoptosis through autophagy induction and NADPH maintenance: new implications for osteonecrosis treatment? *Cell Signal* 2014;26(1):1-8.
32. Zhu L, Kreth J. The role of hydrogen peroxide in environmental adaptation of oral microbial communities. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:717843.
 33. Kim SI, Na HJ, Ding Y, Wang Z, Lee SJ, Choi ME. Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- β 1. *J Biol Chem* 2012;287(15):11677-11688.
 34. Settembre C, Artega-Solis E, McKee MD, de Pablo R, Al Awqati Q, Ballabio A, Karsenty G. Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification. *Genes Dev* 2008;22(19):2645-2650.
 35. Nakatsukasa K, Brodsky JL. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* 2008;9(6):861-870.
 36. Ishida Y, Yamamoto A, Kitamura A, Lamande SR, Yoshimori T, Bateman JF, Kubota H, Nagata K. Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. *Mol Biol Cell* 2009;20(11):2744-2754.
 37. Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener DR, Imaizumi K. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J Biol Chem* 2011;286(6):4809-4818.
 38. Tohmonda T, Miyauchi Y, Ghosh R, Yoda M, Uchikawa S, Takito J, Morioka H, Nakamura M, Iwawaki T, Chiba K, Toyama Y, Urano F, Horiuchi K. The IRE1 α -XBP1 pathway is essential for osteoblast differentiation through promoting transcription of *Osterix*. *EMBO Rep* 2011;12(5):451-457.

39. Sou YS, Waguri S, Iwata J, Ueno T, Fujimura T, Hara T, Sawada N, Yamada A, Mizushima N, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M. The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* 2008;19(11):4762-4775.
40. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004;432(7020):1032-1036.
41. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in *Atg7*-deficient mice. *J Cell Biol* 2005;169(3):425-434.
42. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 2008;456(7219):264-268.
43. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(49):20842-20846.
44. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* 2010;328(5976):321-326.
45. Vingtdeux V, Giliberto L, Zhao H, Chandakkar P, Wu Q, Simon JE, Janle EM, Lobo J, Ferruzzi MG, Davies P, Marambaud P. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid- β peptide metabolism. *J Biol Chem* 2010;285(12):9100-9113.
46. Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y.

Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* 2007;72(1):29-39.