The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯根膜における細胞老化の病態生理学的意義
Author(s)	池上, 久仁子
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56128
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　（　　池上　久仁子　　）	
論文題名	歯根膜における細胞老化の病態生理学的意義

論文内容の要旨

【研究目的】

ヒト個体は、加齢に伴い免疫系、内分泌系、神経系を統べる生体システムの機能が低下し、各種臓器の機能不全を特徴とした全身の老化が進行する。その原因の一つとして、細胞レベルの老化、すなわち細胞老化が考えられている。歯周病の原因は細菌バイオフィルムであるが、その発症と進行において、加齢は重要なリスクファクターの一つである。近年、老化細胞が不可逆的な細胞増殖停止に陥り臓器に蓄積すること、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリクス(ECM) タンパク分解酵素(MMPs) の産生(SASP :Senescence associated secretory phenotype) を介して組織の炎症を誘導することで、糖尿病、脈管梗塞性疾患、リウマチ性疾患などの全身性の慢性炎症性疾患の病態に関与することが明らかとなってきた。しかしながら、慢性炎症性疾患である歯周病の病態形成における細胞老化の作用については、未だ不明である。

本研究では、*in vitro*におけるヒト歯根膜細胞の老化誘導モデルを構築することで歯周病の病態形成に及ぼす細胞老化の役割を検討した。また、老化歯根膜細胞が産生するSASPタンパクならびにECMタンパクの機構を解析することで、慢性炎症や創傷治癒に及ぼす細胞老化の影響を検討した。また、老化歯根膜細胞における老化形質発現のメカニズムの一つとして、小分子ノンコーディングRNAであるmicroRNA（miRNA）による調節制御機構の関与について解析をおこなった。

【材料および方法】

1. 高週齢マウスの歯周組織の解析

68週齢の高週齢C57BL/6マウスの上顎歯槽骨の解剖学的形態をμCT像を撮影し解析した。歯周組織のSA-βGal(Senescent-associated β-galactosidase) 活性については、凍結薄切標本のX-gal染色にて評価した。

2. *In vitro*におけるヒト歯根膜(HPDL) 老化モデルの樹立

ヒト初代培養歯根膜細胞(HPDL) を3日毎に35代以上の継代培養を行うことで、複製老化を誘導した。細胞分裂寿命については継代ごとの細胞分裂回数(PD:Population doubling) を算出することで評価した。細胞老化のマーカーであるSA-βGal活性を評価するとともに、細胞形態を免疫染色法およびフローサイトメトリーにて検討した。染色体の凝集像(SAHF: Senescence associated heterochromatin foci) を透過型電子顕微鏡像およびDAPI染色像にて観察した。また活性酸素(ROS) 産生の場であるミトコンドリアの形態を透過型電子顕微鏡像にて、細胞内のROSの蓄積を蛍光標識法にて観察した。細胞周期調節マーカーであるp16、p21、Rbの発現量を解析した。次に、継代数の異なるHPDLにおけるSASPタンパクのIL-6、IL-8の遺伝子発現をqRT-PCR法にて、培養上清中のタンパク質量をELISA法にて検討した。また継代数の異なるHPDLにおける*Porphyromonas gingivalis*(*P.g.*) 由来Lipopolysaccharide(LPS) とIL-1βに対する応答性をIL-6の発現量を評価することで検討した。

3. 細胞老化がHPDLに及ぼす影響の解析

老化HPDLにおける運動能をタイムラプスイメージングにより評価した。細胞分化能として老化HPDLを石灰化誘導培地で長期培養し評価した。HPDLに特異的なECMタンパクについては、遺伝子発現をqRT-PCR法にて、タンパク質発現をWestern Blot法および免疫染色法を用いて解析を行った。培養上清中のECMタンパクはELISA法を用いて定量解析した。老化HPDLにおけるMMPsの遺伝子発現をqRT-PCR法にて、培養上清中のタンパク質発現をELISA法にて、酵素活性はザイモグラフィーにて検討した。また老化HPDLが分泌するタンパク質の生理作用については、創傷治癒モデルとしてWound healing assayにて評価した。

4. HPDLの細胞老化メカニズムの解析

継代数の異なるHPDLよりmiRNAを精製し、miRNAアレイを用いて発現プロフィールの解析を行った。アレイ

の結果より老化に伴い発現が２倍以上増加するmiRNAを抽出し、IPA解析を用いて標的mRNAの探索を行った。その中で炎症や老化の制御に関係の深いmiR-146aとmiR-34aに着目した。HPDLの老化に伴うこれら２つのmiRNAとその標的遺伝子発現の変動をqRT-PCR法にて解析した。また合成二本鎖オリゴヌクレオチド(mimic) あるいは、miRNAと相補鎖をもつ合成一本鎖オリゴヌクレオチド(inhibitor)を導入し、実際の機能制御を検討した。

【結果】

1. 高週齢マウスの上顎歯槽骨のμCT像において、臼歯部における顕著な水平性骨吸収が観察された。また、歯根膜においてSA-βGal陽性細胞の有意な増加が、凍結薄切標本の染色像により確認された。
2. HPDLは*in vitro* の複製老化の誘導により、継代数35代付近で細胞増殖が停止した。継代を重ねたHPDLはSA-βGal活性の増強、老化細胞に特徴的な肥大した細胞形態、SAHF、ミトコンドリアの形態異常および細胞内ROSの増強が観察された。また細胞周期調節マーカーであるp16、p21、Rbは継代数の増加とともに発現の増加を認めた。このような細胞老化の特徴を兼ね備えた継代数30付近のHPDLを、老化HPDLと定義し以後の実験に供した。老化HPDLは、SASPタンパクであるIL-6、IL-8の高産生を示した。老化HPDLでは*P.g.*由来LPS刺激へは低応答であった。
3. 老化HPDLは、運動能の低下および硬組織形成細胞への分化能の低下を示した。老化HPDLにおいては、培養上清中のMMPsのタンパク質発現、酵素活性が上昇しており、歯根膜の代表的なECMタンパクであるPeriostinのタンパク質発現が低下していた。Wound healing assayにおける検討の結果、老化HPDL由来の培養上清の添加で認められた細胞移動量の抑制は、Periostinの添加により回復した。
4. HPDLの継代数の増加に伴いmiR-146aの発現は上昇し、その発現量が最大となる継代数は、IL-6の発現が最大となる継代数より後方に遅延した。miR-146aを模倣したmimicの導入によりIL-6の遺伝子、タンパク質発現は抑制された。また、同様にmiR-34aはHPDLの継代数の増加に伴い発現は上昇し、標的遺伝子の一つであるSIRT1の遺伝子、タンパク質発現は相関して減少がみられた。miR-34aのmimic導入によりIL-6とPeriostinの遺伝子発現は増加し、その際に、SIRT1の遺伝子、タンパク質レベルの発現の減少が認められた。

【考察および結論】

高週齢マウスの歯根膜に多数の老化細胞が確認されたことから、歯周組織の恒常性の維持や歯周病の病態形成への老化細胞の関与が示唆された。複製老化を誘導したHPDLは、一般的な老化細胞の特徴を具備しており、老化性の慢性炎症の原因と考えられるSASPタンパクを高産生していた。このことより、細胞老化が亢進した老化HPDLは、自己複製能の低下のみならず、SASPタンパクの産生を介して、老化臓器に特徴的な修復能の低下や慢性炎症の亢進に関与することが示唆された。また、老化に伴い、HPDLのMMPsの発現や酵素活性は上昇し、ECMタンパクであるPeriostinのタンパク質発現の減少がみられたことより、歯根膜の老化は、ECMタンパクの異常を原因とした組織の修復･治癒の遅延を惹起することが示唆された。老化HPDLに高発現するmiRNAであるmiR-146a 、miR-34aにより、IL-6とPeriostin の発現が調節されていた。このことより、HPDLにおいてはmiRNAによるSASPタンパクやECMタンパクの制御を介した老化形質誘導機構の存在が示唆された。

臨床において、高齢者における歯周病は、糖尿病、脈管梗塞性疾患、リウマチ性疾患などの加齢性の疾患と同様に難治性の慢性炎症性疾患である。その原因の一つとして、歯周組織において増大した老化細胞が、SASPタンパクやECMタンパクの異常を介して慢性炎症、組織修復能の低下を誘導することが示唆された。本研究成果より、歯根膜の細胞老化の制御に基づいたECMタンパクの補充療法や小分子核酸遺伝子療法などの開発は、歯周病のみならず、全身性の慢性炎症性疾患の発症や進行を抑制する新規の治療法への応用へと発展が予想され、歯科治療分野への導入が期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　池上　久仁子　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	村上　伸也
	副 査	教授	西村　理行
	副 査	准教授	中田　匡宣
	副 査	講師	伊藤　祥作

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜の細胞老化が歯周組織の恒常性維持ならびに歯周病の病態形成に及ぼす影響について検討したものである。その結果、老化したヒト歯根膜細胞は、炎症性サイトカインの産生亢進および細胞外基質タンパクの産生異常を呈し、歯周組織における慢性炎症の亢進や治癒の低下に関与することが *in vitro* の実験系より明らかとなった。以上の研究結果は、細胞老化という概念を歯周病の病態論に導入するとともに、その疾患発症機構を分子レベルで解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。