

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

歯根膜における

細胞老化の病態生理学的意義

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学

池上 久仁子

(指導教員:村上 伸也 教授)

諸言

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。 高齢者においては、糖尿病、動脈梗塞性疾患、リウマチ性疾患等の慢性疾患へ の罹患率並びに重篤度が顕著に増強することが知られており¹、これら成人性疾 患に共通の基礎病態として慢性炎症があげられる²ことから、加齢性の自然炎症 としての病態が注目を集めている。

このような、個体老化に伴う臓器の機能低下の原因として、細胞レベルでの老 化、細胞老化原因説が有力視されている³⁻⁵。生体を構成する体細胞の *in vitro* における細胞分裂回数には限界があり、分裂限界に到達すると細胞分裂が非可 逆的に停止することから細胞の老化と個体の加齢現象の因果関係が Hayflick ら によって提唱されている⁶。従来、細胞老化は非可逆的な細胞分裂により、障害 が蓄積された細胞の癌化を回避する細胞自律のメカニズムと考えられてきた⁷。 老化細胞による増殖能の低下は、組織の修復・治癒の遷延化を惹起するのみなら ず、炎症性サイトカインやケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ(以 下 MMPs と略す)などの生理活性物質を高産生する SASP (Senescence associated secretory phenotype)現象が、近年、報告されており、老化に伴う 慢性炎症の原因の一つとして注目を浴びている^{1,3,8}。

歯周病の疾患発症の原因は、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と考える。またその病 態成立の過程において、歯周組織構成細胞は病原体、メカニカルストレス、ROS などの様々な老化誘導ストレスに長期間曝露されていると考えられる。しかし ながら、歯周病と老化との関連については、未だ十分に解明されていない。そ こで本研究では、歯周組織の細胞老化が歯周病発症・進行の誘因の一つである との仮説のもと、細胞老化について分子レベルで検討することで、その病態生 理学的意義の解明に挑むこととした。

歯周組織の老化を解析するにあたり、歯周組織の恒常性維持の中心的役割を 担う歯根膜に焦点をあて解析を行うこととした。歯根膜は、セメント質と歯槽 骨の間に存在する密な線維性結合組織であり、歯根膜細胞はコラーゲン等の細 胞外基質(ECM)タンパクを活発に生合成する%。さらに、歯根膜中には多分 化能を有する間葉系幹細胞が存在し、創傷治癒や再生過程において増殖・分化し

歯周組織の修復・再生を担うこと¹⁰⁻¹²、サイトカインや接着分子の発現により 局所の免疫応答に関与することが明らかとなっている¹³。

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し、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 分泌タンパクならびに ECM タンパクの細胞性機構を解析する 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。さらに、老 化歯根膜細胞においては、加齢に伴うエピジェネテックな異常が DNA に集積し ていると考えられることより、老化形質発現のメカニズムとして、microRNA (以下 miRNA と略す)による調節制御機構について解析を行った。

材料および方法

1. マウス歯周組織のµCT 解析ならびに組織学的解析

本研究におけるすべての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委 員会の承認を得て行った(承認番号:動歯24-012-0)。マウスは雄性6週齢並び に 68 週齢 C57BL/6(日本 SLC 株式会社、静岡、日本)を使用した。Pentobarbital sodium salt 麻酔下で安楽死させ、上顎第二臼歯周辺の歯槽骨を実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2(リガク、東京、日本)を用いて micro Computed Tomography(以下µCTと略す)画像を得た。µCTにより得られた画像データ を三次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON(ラトックシステムエンジニアリ ング、東京、日本)で処理した。画像を解析ソフトウェア WinROOF(三谷商 事、福井、日本)に取り込み、第一臼歯近心根、第一臼歯遠心根、第二臼歯近 心根のセメントーエナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定し、歯槽骨吸収量 とした。µCT 撮影後の歯周組織を 4% Paraformaldehyde phosphate buffer solution(和光純薬工業、大阪、日本、以下 PFA と略す)にて浸漬固定を 12 時間行った。0.5 M EDTA 溶液(和光純薬工業)にて一週間の脱灰処理後、15%、 20%、25%ショ糖(和光純薬工業)含有 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (和光純薬工業、以下 PBS と略す) に浸漬し、24 時間後に O.C.T Compound (サクラファインテックジャパン、東京、日本)を用いて凍結包埋した。クラ イオスタット Leica CM3050 S (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を 用いて矢状断で5 μmの薄切標本を作製した。薄切標本を Senescence Detection Kit (Bio Vision, Milpitas, CA, USA) のプロトコールに従い 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside(以下 X-Gal と略す)を用 いて、Senescence Associated β-galactosidase (以下 SA-β-Gal と略す) 活性陽 性細胞を染色した。観察および写真撮影には光学顕微鏡(オリンパス、東京、 日本)を用いた。

2. In vitro におけるヒト歯根膜細胞老化モデルの樹立

実験に供した初代培養ヒト歯根膜細胞(ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA, 以下HPDLと略す)の培養には10% Fetal Bovine Serum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, 以下FBSと略す)を加えたAlpha MEM with Earle's Balanced Salts(和光純薬工業、以下aMEMと略す)を用い た。HPDLの継代培養は、NIH 3T3の方法¹⁴を改変し用いた。すなわち10 cm Dish (Corning, Corning, NY, USA) に1x10⁶個播種し、3日後に細胞数を計測し再 び10 cm Dishに1x10⁶個で播種する、という手順で行った。細胞分裂寿命は、以 下の計算式に基づき細胞分裂回数(Population Doublings:PDs)を算出し、細 胞増殖曲線を描くことで確認した。

 $PD_n = log_2(Nf_n/Ni_{n-1})$

$PDs=PD_1+PD_2+...+PD_n$

(n: 継代数、PDn: 継代数nにおける細胞分裂回数、

Ni_{n-1}: 継代数n-1に播種時の細胞数、Nf_n: 継代数nに収集した細胞数) 継代数(Passage number、以下Pと略す)の増加に伴う各種遺伝子発現、タン パク質発現の検討には、継代培養3日毎に回収したHPDLの全RNA、タンパク 質溶解画分、培養上清画分を用いた。

3. 細胞染色試薬

X-Gal染色にはSenescence Detection Kitを用い、SA-β-Gal陽性細胞を青色に 染色した。光学顕微鏡像を用いて細胞を計測することで全細胞数に対する SA-β-Gal陽性細胞数の割合を算出した。Actinの染色にはActi stain 555 Phalloidin (Cytoskeleton, Denver, CO, USA) を、活性酸素(以下ROSと略す) の染色にはCM-H2CDFDA (Life Technologies) を使用し、光学顕微鏡にて観 察した。Senescence Associated Heterochromatin Foci (以下SAHFと略す)の 観察には、封入剤であるVECTASHIELD Mounting Medium with DAPI

(VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA)を使用し、共焦点レーザー 顕微鏡(Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)を用いて検討した。

4. フローサイトメトリー法

細胞を回収後にHank's Balanced Salt Solution (Life Technologies, 以下 HBSSと略す)で洗浄後、1% Bovine serum albmin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA、以下BSAと略す) 含有PBSに細胞を浮遊させた後、FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)を用いてForward scatter (以 下FSCと略す) 並びにSide scatter (以下SSCと略す)を測定した。

5. 透過型電子顕微鏡解析

培養細胞を4°CのPBSにて2回洗浄後、2% Glutaraldehydeを用いて4°Cで一晩、 前固定し、2% Tetraphosphate osmium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Ethanol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)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% Uranyl acetate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。

6. Western Blot法

培養細胞を4℃の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 Sodium fluoride (和光純薬工業)、1 mM Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich)、10 mM β-Glycerophosphoric acid(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℃、20分)し、上清をタ ンパク質溶解画分として精製した。タンパク質溶解画分についてはBradford法 15にてタンパク質定量を行い、タンパク質濃度を各サンプル間において同値に調 整した。次に10% 2-Mercaptoethanol(和光純薬工業)含有Laemmliの5xサン プルバッファー¹⁶を用いてサンプルを95℃、10分のボイリング後に室温に戻し、 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。泳動バッファーには25 mM Tris (Sigma-Aldrich) -塩酸緩衝溶液(以下、Tris-HClと略す)、192 mM Glycine(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) に転写装置(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて、4°C、80 V、2時間の条件にて転写した。メンブレンのブロッ キングは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Tris Buffered Saline (50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM Sodium chloride(和光純薬工業)、以下TBSと略す)に室温にて1時間、振盪させ行っ

た。一次抗体には、マウス抗ヒトp53抗体、ウサギ抗ヒトp16抗体、ヤギ抗ヒト CTGF抗体(以上、Santa Cruz, Dallas, TX, USA)、ウサギ抗ヒトp21抗体、マ ウス抗ヒトRb抗体、ウサギ抗ヒトSIRT1抗体(以上、Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、ウサギ抗ヒト I 型Collagen抗体、ウサギ抗ヒトIII型 Collagen抗体、ウサギ抗ヒトPeriostin抗体、ヤギ抗ヒトPLAP-1 (Asporin) 抗 体(以上、Abcam, Cambridge, UK)、マウス抗ヒトFibronectin1抗体(Becton Dickinson)、マウス抗ヒトβ Actin抗体(Sigma-Aldrich)を用いた。二次抗体 にはHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体、HRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(以上、 Cell Signaling Technology)、HRP標識ウサギ抗ヤギIgG抗体 (Chemicon International, Temecula, CA, USA)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、X線フィルム(GE Healthcare) を感光させることで特異的バンドを検出した。

7. 遺伝子の発現解析

mirVana miRNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて全RNAを精製した。mRNAの発現解析には、High Capacity RNA-to-cDNA Kit(Life Technologies)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、大津、日本)と、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies) を用いて検討した。cDNA増幅には7300 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い た。解析はリファレンス遺伝子を用いた相対定量法にて行った。リファレンス 遺伝子には、継代数を経た細胞においても発現レベルが一定であるHPRTを用い た。HPRTのCt値をRfCt、ターゲット遺伝子のCt値をTgCtとし、2-(TgCt-RfCt)を 算出し、グラフの縦軸の値とした。miRNAの発現解析には、miScript IIRT kit (QIAGEN, Hilden, Germany)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、miR-146a並びにmiR-34a特異的なReal-Time PCR 用プライマー(QIAGEN、製品番号MS00003535並びにMS00009534、配列非 公開)と、miScript SYBR Green PCR kit (QIAGEN)を用いて検討した。cDNA 増幅には7300 Fast Real-Time PCR Systemを用いた。解析はリファレンス遺伝 子RNU6を用いた相対定量法にて行い、RNU6のCt値をRfCt、ターゲット遺伝 子のCt値をTgCtとし、2-(TgCt-RfCt)を算出し、グラフの縦軸の値とした。

8. ELISA法による定量解析

培養上清に含まれるIL-6、IL-8、I型Collagen、Periostin、MMP-1、MMP-2 の産生量を定量解析するにあたり、IL-6 Human Elipair kit (Abcam)、IL-8 Human Elipair kit (Abcam)、Procollagen Type I C-Peptide (以下PIPと略す) EIA kit (タカラバイオ)、Human Periostin/OSF-2 DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、Human Pro-MMP-1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)、Total MMP-2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を用いた。 波長450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) で読み取ることにより、タンパク質含有量を算出した。

9. LPSとサイトカインの共刺激

Porphyromonas gingivalis(以下*P.g.*と略す)由来Lipopolysaccharide(以下 LPSと略す)(和光純薬工業)およびHuman IL-1β(R&D Systems、以下IL-1β と略す)を実験に供した。コンフルエント状態に達したHPDL P8並びにP30を、 *P.g.*由来LPS 1 μg/ml並びにIL-1β 2 ng/ml にて刺激し、6時間後に全RNAを、 24時間後に培養上清を回収した。

10. タイムラプスイメージング解析

35 mmガラスボトムディッシュ(松波、大阪、日本)にHuman Fibronectin (Becton Dickinson) 50 µg/mlを滴下し、37℃で1時間表面処理したのち、PBS で洗浄した培養皿を実験に供した。HPDLのPKH染色にはPKH67緑色細胞染色 キット(Sigma-Aldrich)を用いた。顕微鏡はBioStation IM-Q(Nikon、東京、 日本)を使用し、10分間隔で4時間、画像を取得した。

11. HPDLにおける硬組織形成能の解析

12 well プレート (Corning) 上で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-glycerophosphoric acidおよび50 µg/ml ascorbic acid

(和光純薬工業)を添加した10% FBS含有αMEMにて培養し、2日毎に培地を 交換した。培養20日目に細胞粉砕液を回収しAlkaline Phosphatase (以下ALP) 活性測定をBesseyらの方法¹⁷に準じて行った。すなわち細胞層を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) にて超音波破砕した後に細胞破砕液を回収し、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 µlの1 M Tris-HCl (pH 9.0)、100 µlの5 mM magnesium chloride (和光純薬工業)、100 µlの50 mM disodium p-nitrophenylphosphate (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 µlの1 N sodium hydroxide (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 µmolのpNPPを水解するALP活性を1 Uとし、1 well当たりの ユニット値で示した。培養30日目にはAlizarin red S染色液 (和光純薬工業)、 Von Kossa 染色キット (Abcam)を使用し、形成された石灰化物を染色し観察 した。

12. 細胞免疫染色

I型Collagen、Periostinの細胞免疫染色を行うにあたり、まず直径15mm(松 波)カバーガラスに播種した細胞をPBSで洗浄し、4% PFAを用いて室温で15 分固定した。PBSで洗浄した後、1.5% BSA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Collagen抗体(Abcam)、ウサギ抗ヒトPeriostin抗体 (Abcam)を用い、室温で1時間反応させた後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)を用い、室温で30 分間反応させた。PBSにて洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPIを用いて封入した後、光学顕微鏡で観察した。

13. ザイモグラフィー

HPDLの培養上清を用いてMMP-1、MMP-2、MMP-3の酵素活性を評価した。 泳動はカセット電気泳動槽DPE-1020ミニゲル用二連式(コスモバイオ、東京、 日本)を用いた。MMP-1、MMP-3の検出には、Acrylamide 8~13%、Casein 0.05%のゲルを含む、カゼインザイモ電気泳動キット(コスモバイオ)を、MMP-2 の検出にはAcrylamide 10%、Gelatin 0.1%のゲルを含む、ゼラチンザイモ電気 泳動キット(コスモバイオ)をプロトコールに準じて使用した。

14. Wound Healing Assay

CytoSelect[™] 24-Well Wound Healing Assay (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) のインサートを使用した。インサートを24 well プレートに装着後、HPDL P10を播種し、2日間、80% コンフルエントになるまで培養した。インサートを除去し、スリットの形成を光学顕微鏡で確認後、抗Integrin $\alpha_v\beta_3$ 抗体 (Millipore) 10 μ g/mlを添加あるいは未添加にて1時間培養した。HPDL P10並びにHPDL P33より回収した培養3日目の培養上清 (Conditioned medium、以下CMと略す) および Human Periostin (R&D Systems、以下Periostinと略す) 100 μ g/ml を添加した。CM添加群のウェルの培地は、CM 250 μ lとFBS不含の α MEM 250 μ lの割合で配合し用いた。対照群であるCM未添加群のウェルの培地は、FBS5% 含有 α MEM 500 μ lを用いた。スリット除去後24時間培養し、細胞をPBSで洗浄後、0.09% Crystal Violet (和光純薬工業) 溶液にて染色し、顕微鏡を用いて細胞の移動量を観察し撮影した。観察された染色像を画像解析ソフトウェア WinROOFに取り込み、二元化処理後に染色強度を数値化し、HPDLの移動量を数値化した。

15. miRNAアレイ解析

HPDL P5、P6、P10、P18、P32、P34を10cm Dishに1x10⁶個播種し、3日 後に回収した全RNAを、mirVana miRNA isolation kitを用いて精製し、試料 とした。本研究ではmiRアレイとしてAgilent human miRNA Microarray (8x60K) miRBase ver.19.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用い、Agilent Technologies社が推奨するプロトコール (ファイル名; miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit Version 2.4, September 2011) に準じて実施した。すなわち100 ngの全RNAを鋳型とし、 Calf Intestine Alkaline Phosphataseによる脱リン酸化反応を行った後、5'末端 に蛍光色素 (Cyamin-3) のラベリングを行った。濃縮遠心によって得た乾燥物 を17 µlのRNase/DNase Free水を加えて溶解させ、所定の試薬を加え20rpmで 回転させながら、55℃、17時間のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリ ダイゼーション後、マイクロアレイを洗浄し、Agilent DNA Microarray Scannerでマイクロアレイのスキャニングを行った。取得した画像データを Feature Extractionソフトウェアを用いて数値化した。次いで、数値化したアレ イデータを用いてアレイ間ノーマライゼーションを実施した。得られた数値デ ータについて、GeneSpling GX 12.0 (Agilent) ソフトウェアを用い、データ間 の類似性・独立性を評価する為に階層的クラスタリング解析を実施した。次に 継代数により変化する遺伝子発現パターンを分類する為に、GeneSpling GX 12.0 (Agilent) ソフトウェアを用い、K-meansクラスタリング解析を実施した。 この際、HPDL P34でP5に対して発現が二倍以上の上昇を示すmiRNAを絞り込 み、Ingenuity Pathway Analysis (以下IPAと略す) ver.14197757 (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) にインポートし、標的遺伝子の探索を行 った。

16. miRNA mimic、inhibitor導入

HPDLを細胞培養用プレートに播種し、24時間後、50~70%コンフルエントの 状態まで培養した。mirVana miRNA mimic (Thermo Fisher Scientific、以下 mimicと略す) すなわち内在性miRNA様の動向を示す2本鎖RNAオリゴヌクレ オチド、mirVana miRNA inhibitor (Thermo Fisher Scientific、以下inhibitor と略す) すなわち標的mRNAを抑制する1本鎖RNAオリゴヌクレオチド、 mirVana miRNA negative control (Thermo Fisher Scientific、以下controlと 略す) を、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を含むOpti-MEM (Life Technologies) を用いて導入した。導入24時間後に培地を交換し、さらに24時 間後に全RNA、タンパク質溶解画分、培養上清を回収した。

17. 統計処理について

実験データは 3 群の平均値±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 未満 の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
P16	5'- CCTTTGGTTATCGCAAGCTG -3'
	5'- CCCTGTAGGACCTTCGGTGA -3'
P21	5'- TCAAATCGTCCAGCGACCTTC -3'
	5'- CATGCCCTGTCCATAGCCTCTAC -3'
IL6	5'- AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA -3'
	5'- TGTCCTGCAGCCACTGGTTC -3'
IL8	5'- ACACTGCGCCAACACAGAAATTA -3'
	5'- TTTGCTTGAAGTTTCACTGGCATC -3'
COL1A1	5'- CCCGGGTTTCAGAGACAACTTC -3'
	5'- TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC -3'
COL3A1	5'- CCACGGAAACACTGGTGGAC -3'
	5'- GCACATCAAGGACATCTTCAGGA -3'
POSTN	5'- CATTGATGGAGTGCCTGTGGA -3'
	5'- CAATGAATTTGGTGACCTTGGTG -3'
FN1	5'- GCCAGATGATGAGCTGCAC -3'
	5'- GAGCAAATGGCACCGAGATA -3'
PLAP-1	5'- ATGGGAGTCTTGCTAACATACCAC -3'
	5'- CAGAAGTCATTTACTCCCACTCTTG -3'
CTGF	5'- CTTGCGAAGCTGACCTGGAA -3'
	5'- AAAGCTCAAACTTGATAGGCTTGGA -3'
MMP1	5'- ACAACTGCCAAATGGGCTTGA -3'
	5'- CTGTCCCTGAACAGCCCAGTACTTA -3'
MMP2	5'- CTCATCGCAGATGCCTGGAA -3'
	5'- TTCAGGTAATAGGCACCCTTGAAGA -3'
MMP3	5'- TTTCCAGGGATTGACTCAAAGA -3'
	5'- AAGTGCCCATATTGTGCCTTC -3'
MMP14	5'- GGAACCCTGTAGCTTTGTGTCTGTC -3'
	5'- TGAGGGTCCTGCCTTCAAGTG -3'
SIRT1	5'- CCCAGAACATAGACACGCTGGA -3'
	5'- ATCAGCTGGGCACCTAGGACA -3'
HPRT	5'- GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA -3'
	5'- GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC -3'

1. 高週齢マウスの歯周組織の解析

本研究を開始するにあたり、6 週齢の若週齢マウスと、68 週齢の高週齢マウ スの上顎歯槽骨をµCT で撮影、解析することで加齢による歯槽骨の変化を計測 した(図1-A)。高週齢マウスは若週齢マウスと比較して、臼歯部における咬頭 の顕著な摩耗が観察された。興味深いことに、高週齢マウスは臼歯部における 周囲支持歯槽骨の著明な水平的な骨吸収が認められた。実際に、臼歯部の計測 した3部位の全てにおいて高週齢マウスでは若週齢マウスと比較し、約2倍の 骨吸収量の亢進が認められた。(図1-B)。

老化細胞においては、ライソゾームに存在する β -galactosidase (β -Gal)活性が弱酸性条件(pH 6.0)下で増加することが報告されている(senescence associated β -galactosidase activity: SA- β -Gal)¹⁸。すなわち X-Gal を基質として呈色反応させることにより、SA- β -Gal 活性を青色として検出し老化細胞を標識する方法が用いられている。そこで、マウスの上顎臼歯部歯周組織の凍結標本を作製し、X-Gal 染色を行った(図 1-C)。高週齢マウスでは歯根膜において、SA- β -Gal 陽性細胞が多数観察された。また、拡大像による解析により、同陽性細胞は歯根膜細胞並びに血管細胞であることが確認された。すなわち、加齢により老化が進行した個体においては、歯周組織の歯槽骨の吸収が亢進すること、同歯周組織の歯根膜に老化細胞が多数存在することが明らかとなった。



図1 高週齢マウスの歯周組織の解析

- A) マウス上顎歯槽骨を頬側からµCT 撮影した像を示す。
- B) マウス上顎支持歯槽骨の各部位の吸収量を定量化した。①:第一臼歯近心根、②:第一臼 歯遠心根、③:第二臼歯近心根のセメントーエナメル境から各部歯槽骨頂までの距離 (n=4 *:p<0.01)
- C) マウス上顎第一臼歯付近の凍結切片の X-Gal 染色像を示す(上)。(倍率 40 倍)
 上図の第一臼歯近心根根尖付近の拡大像より、68 週齢マウスでは SA-β-Gal 陽性細胞が多数観察された(下)。AB:歯槽骨 PD:歯根膜 D:象牙質 (倍率 100 倍)。
 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. In vitro におけるヒト歯根膜細胞老化モデルの樹立

前述の高週齢マウスにおいて認められた歯根膜の細胞老化現象を、分子レベルで検討するために、ヒト初代培養歯根膜細胞(HPDL)を用いて *in vitro* 細胞 老化誘導モデルを樹立することとした。HPDLを10cm Dishに1x10⁶ 個播種し、 3日毎に継代培養を行った。継代時に回収した細胞数(Nf)を計測した結果、 増殖は継代数(Passage number、以下Pと略す)20付近から徐々に低下し始 め、P36付近でほぼ停止した(図2-A)。播種時の細胞数(1x10⁶ 個)とNfから 細胞分裂回数(PDs)を算出し増殖曲線を得た(図2-B)。その結果、HPDLの 増殖曲線はP36に相当する培養開始108日で水平となり、細胞増殖の停止、す なわち細胞分裂の停止が認められた。

哺乳類の体細胞においては、その細胞分裂回数には限界があることが報告されており、ある一定回数の細胞分裂を経た細胞はアポトーシスあるいは非可逆的な細胞分裂の停止であるセネッセンス(senescence)に陥ることが知られている⁴。これより、HPDLは *in vitro* において継代培養により細胞分裂依存的に 老化が亢進し、P36 付近で細胞老化が誘導されたことが示唆された。

次に、細胞老化が誘導された HPDL を用いて、細胞レベルでの老化形質の解 析を行った。まず、代表的な老化細胞マーカーである SA- β -Gal 活性について検 討を行った。X-Gal 染色の結果、HPDL P8 に比し P35 は多数の陽性細胞が認 められた(図 2-C 左)。また、単位面積あたりにおける陽性細胞数を定量解析し た結果、HPDL P8 と P35 間に有意差が認められた(図 2-C 右)。以上より P35 付近の HPDL は、高い SA- β -Gal 活性を有することが明らかになった。

顕微鏡における明視野観察像において、継代開始期の HPDL は spindle shape が認められた。一方、継代数を重ねた HPDL には肥大形態が認められた。そこ で、細胞骨格を構成する Actin 線維を Phalloidin にて免疫染色し、解剖学的な 細胞形態を検討した。その結果、継代数の増加に伴い Actin 線維は伸展し、培 養皿上に薄く広がった形態を示した(図 2-D)。次に、フローサイトメトリーを 用いて HPDL の細胞形態を単一細胞レベルで詳細に検討した。その結果、FSC にて示される細胞の大きさ、並びに SSC にて示される細胞の内部密度は、継代 数の増加に伴い増大していた(図 2-E)。このことより、HPDL は細胞分裂をほ ぼ停止の状態にあるが、細胞内には器官を含有し、タンパク質の代謝、生合成 を行っており、細胞死とは異なることが示唆された。

老化細胞では、核における染色体の凝集が報告されている。これは、細胞老

化 特 異 的 \land テ \sqcap ク \sqcap マ チ ン 構 造 (SAHF : senescence-associated heterochromatic foci) と呼称され、細胞レベルでの老化の進行を推る、形態学 的な指標とされている ¹⁹。透過型電子顕微鏡を用いた超高解像度の形態学的観 察の結果、HPDL P35 においては、 \land テロクロマチンの凝集像が観察された。 一方、DAPI 染色像においては、HPDL P35 の核の中央に不染部を認めた。こ のことより、HPDL P35 においては細胞老化に特徴的な \land テロクロマチン構造 をとることが示唆された (図 2-F)。



С



P35











図2 In vitro におけるヒト歯根膜細胞(HPDL) 老化モデルの樹立

- A) HPDLの3日毎の継代時に回収した細胞数(Nf)を計測した。同じ3回の実験で得られた 結果のうち、代表的なものを示す。
- B) A)の Nf から細胞分裂回数(PDs)を算出し増殖曲線を得た。
- C) HPDL P8、P35 の X-Gal 染色像を示す。黄矢頭は SA-β-Gal 陽性細胞を表す(左、倍率 200 倍)。単位面積当たりの陽性細胞数を計測し、定量化した(右)。(*:p<0.01)同じ3回 の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- D) HPDL P7、P27、P40の Phalloidin による染色像を示す。(倍率 400 倍)
 同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- E) HPDL P11、P20、P35 を用いて、フローサイトメトリー法により FSC(左)、SSC(右)
 を検出した。同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- F) HPDL P8、P35の核の透過型電子顕微鏡像(左、倍率 1760 倍)、DAPI 染色像(右、倍率 1000 倍)を示す。赤矢頭は SAHF を表す。

3. 老化 HPDL における活性酸素 (ROS) の産生

細胞分裂を停止した老化細胞においては、エネルギーの代謝・生成の異常が報告されている^{20,21}。透過型電子顕微鏡を用いて、エネルギー代謝の中心の場となるミトコンドリアについて形態観察を行った。HPDL P9 と比較し、HPDL P35 においては膨潤した形態のミトコンドリアが多く認められた。また興味深いことに、HPDL P9 のクリステは長軸方向に伸展した正常構造を示す一方、HPDL P35 のクリステは短軸方向の梯子状に並列した異常構造が観察された

(図 3-A)。クリステはミトコンドリアにおける呼吸鎖電子伝達系の反応の場で あり、ATP の産生過程において代謝中間産物として ROS を生成する。また、 老化に伴う細胞内 ROS の増加は、線維芽細胞において報告されている^{22,23}。そ こで、HPDL の細胞内に蓄積された ROS を蛍光プローブ CM-H2CDFDA を用 いて検出した結果、HPDL P7 と比較し P34 において ROS の顕著な増加が認め られた(図 3-B)。これより、HPDL P35 には ROS の蓄積により様々な細胞ス トレスや DNA ダメージが蓄積されていることが示唆された。

А

P35



В



図3 老化 HPDL における活性酸素 (ROS) の産生

- A) HPDL P9、P35の透過型電子顕微鏡像を示す。黄矢頭はミトコンドリアを表す。 倍率 31800 倍
- B) HPDL P7、P34を CM-H2CDFA で染色し、ROS を検出した顕微鏡像を示す。同じ 3 回 の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。緑: ROS、青: DAPI 倍率 100 倍

4. 老化 HPDL における細胞周期の解析

老化細胞においては、細胞ストレスや DNA ダメージの蓄積により非可逆的な 細胞分裂停止の状態に陥る。この際、p53-p21 経路あるいは p16-pRB 経路によ るサイクリン依存性キナーゼ CDK2、CDK4/6 の抑制により G1/S 期において細 胞周期が停止することが明らかとされている²⁴。そこで HPDL における細胞周 期調節マーカーの遺伝子発現を検討した。HPDL P6 と比較し P32 は、p16、p21 の有意な遺伝子発現の上昇を認めた(図 4-A)。また、老化に対して拮抗的に作 用することが報告されている SIRT1(詳細は図 10-F で後述)²⁵、Klotho²⁶(図 4-A)の有意な遺伝子発現の低下を認めた。さらに、HPDL における p16、p21、 Rb のタンパク質発現が、継代数の増加とともに増加していることが Western Blot 法にて確認された(図 4-B)。

以上の実験結果より、P36 付近で細胞増殖が停止した HPDL には、複製老化の誘導により細胞老化が誘導されたことが確認された。継代数 P30 付近の HPDL においても老化細胞に特異的な形質を具備していることが確認されたため、以降の実験では、P30 付近の HPDL を老化 HPDL として実験に供し、一般的な老化のみならず HPDL に特異な細胞老化形質の探求を行った。



図4 老化 HPDL における細胞周期の解析

- A) HPDL P6、P32 における細胞周期制御マーカーの遺伝子発現を、Real-Time PCR 法を用いて解析した(*:p<0.01)。同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- B) HPDL P8、P17、P29、P33 における細胞周期制御マーカーのタンパク質発現を、Western Blot 法を用いて解析した。同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。

5. 老化 HPDL における SASP タンパクの産生

線維芽細胞²⁷、上皮細胞²⁷、血管平滑筋細胞²⁸、免疫担当細胞²⁹において、 老化細胞がさまざまな炎症性サイトカインや組織分解酵素を高産生する SASP 現象が報告されている。近年、SASP 関連分泌タンパクが老化臓器において特 徴的な臓器の線維化や、慢性炎症病態樹立に関わるとされ注目を集めている。 そこで、SASP タンパクとして代表的な炎症性サイトカインである、IL-6、IL-8 の HPDL における発現について検討した。前述の複製老化モデルを用いて、 継代毎に試料を採取し、老化誘導過程におけるその発現量を検討した。IL-6、 IL-8 の遺伝子発現は P30 付近で顕著な増強を認めた (図 5-A)。さらに、ELISA 法を用いて培養上清中の IL-6、IL-8 産生量を定量解析した結果、HPDL P30 は P8 と比較して有意な産生量の増加を示した (図 5-B)。

HPDLにおいては、炎症性サイトカインや *P.g.*由来細菌産物に対して高い応 答性を示すことが報告されている^{30,31}。そこで、老化 HPDL を炎症性サイトカ イン IL-1βあるいは *P.g.*由来 LPS で刺激し、その応答性について検討した。そ の結果、HPDL P30 でみられた IL-6 の遺伝子レベルの高発現は、IL-1β刺激に より増強された。しかしながら、*P.g.*由来 LPS 刺激による IL-6 の遺伝子発現 に対する増強作用は認められなかった(図 5-C 左)。さらに 24 時間刺激後の培 養上清中における IL-6 のタンパク質量についても同様の傾向を示した(図 5-C 右)。興味深いことに HPDL P8 は P30 と比較し *P.g.*由来 LPS 刺激に対して高 い IL-6 産生を示した。以上より、老化 HPDL は炎症性サイトカイン産生やサ イトカイン応答性に関して正常より高い反応を示した。



図 5 老化 HPDL における SASP タンパクの産生

- A) 継代数の異なる HPDL における IL-6、IL-8 の遺伝子発現を、Real-Time PCR 法を用いて 解析した (*:*p*<0.01 vs P5)。同じ 3 回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- B) 継代数の異なる HPDL の培養上清に含有される IL-6、IL-8 のタンパク質量を、ELISA 法 を用いて定量解析した(*:p<0.01)。同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なもの を示す。
- C) 老化 HPDL を IL-1βおよび P.g.LPS にて刺激し、IL-6 の遺伝子発現(左)、および培養上 中のタンパク質発現(右)を解析した(*:p<0.01)。同じ3回の実験で得られた結果のうち、 代表的なものを示す。

6. 老化 HPDL の機能解析

老化細胞は、細胞分裂の停止により癌化からの回避を可能とする一方で、そ の自己複製能の低下は臓器における組織リモデリングの遅延に関わる。歯根膜 細胞は、歯周組織の恒常性の維持の中心となる細胞であり、組織の創傷治癒・再 生のみならず、さまざまな生理作用を担う事が明らかとなっている。そこで、 これら生理作用に及ぼす HPDL の老化の影響について検討した。

歯周組織の修復過程においては、損傷部位への組織構成細胞並びに幹細胞の 遊走、集積が必要である³²。そこで、PKH 染色した HPDL をタイムラプスイ メージングで撮影し、老化 HPDL 自身の自律な運動能を検討した。画像解析に より、HPDL の移動軌跡を評価した結果、HPDL P30 は P8 と比較し、単位時 間あたりの細胞移動量の減少が認められた(図 6-A)。また細胞増殖については、 前述の実験結果(図 2-A)より、HPDL の細胞増殖能は P20 付近から徐々に低 下し始め、P36 付近でほぼ停止することが明らかとなっている。さらに、細胞 数計測の際に用いたトリパンブルー染色の顕微鏡像より、増殖数の低下は細胞 死とは異なることが確認された。

歯根膜細胞は、脂肪細胞、骨芽系細胞、軟骨細胞への分化能を有する間葉系 幹細胞としての性質を有することが明らかとされており³³、歯周組織の修復・再 生過程においてはセメント芽細胞、骨芽細胞などの硬組織形成細胞への分化、 成熟能が重要となる。そこで HPDL の硬組織形成能について、石灰化誘導培地 を用いた長期培養により検討した。その結果、HPDL P11 は、石灰化誘導培養 30 日において、Alizarin 染色陽性の石灰化物並びに、Von Kossa 染色に陽性の 硬組織様形成物を示した(図 6-B 左)。興味深いことに、HPDL P14、P19、 P30 と継代数の増加に伴い陽性細胞の減少を示した。また、石灰化誘導培養 20 日においてアルカリフォスフォターゼ(以下 ALP と略す)活性を測定した結果、 P7、P13、P29、P33 の HPDL は、継代数の増加に伴い ALP 活性の著明な減少 を示した(図 6-B 右)。以上より、老化 HPDL では、細胞分化能、とりわけ硬 組織形成細胞への分化能の低下が示唆された。



図6 老化 HPDL の機能解析

- A) タイムラプスイメージングで撮影した画像を用いて、HPDLの移動軌跡を評価した(HPDL P8: 黄矢頭、HPDL P30: 赤矢頭)。h: 時間 倍率 200 倍
 同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- B) HPDL を石灰化誘導培地にて 30 日間培養後の Alizarin 染色像(左上段)、Von Kossa 染 色像(左下段)を示す。20 日間培養後の ALP 活性を測定した結果を示す(右、*:p<0.01)。
 同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。

7. 老化 HPDL における ECM タンパク発現の検討

細胞運動、増殖、分化の制御において、ECM タンパクが重要な役割を果たす ³⁴⁻³⁶。歯根膜は、セメント質と歯槽骨の間に存在する密な線維性結合組織であり、 その恒常性維持には歯根膜細胞からの Collagen 等の ECM タンパクの産生が必 須である。そこで、HPDL に発現する ECM 関連タンパクの継代数の増加に伴 う遺伝子の発現変動を Real-Time PCR 法を用いて解析した(図 7-A)。その結 果、継代数の増加に伴い I 型 Collagen、Periostin、III型 Collagen、PLAP-1、 Fibronectin1、CTGF はその遺伝子発現が増加する傾向を認めた。次に、これ らのタンパク質発現を HPDL の Lysates を用いて Western Blot 法にて検討し た(図 7-B)。その結果、Fibronectin1、CTGF については遺伝子発現と相関し たタンパク質発現パターンを示した。 I 型 Collagen、III型 Collagen、PLAP-1 は、継代数の増加に依存せず、恒常的に高いタンパク質発現を示した。興味深 いことに、継代数の増加に伴い遺伝子レベルでの発現増強を示した Periostin は、 タンパク質レベルにおいて、発現量の低下を示した。これより、老化 HPDL は ECM タンパクの産生機構に変異が生じていることが示唆された。



В



- 図7 老化 HPDL における ECM タンパクの産生
- A) 継代数の異なる HPDL の ECM 関連タンパクの遺伝子発現を解析した(*:p<0.01 vs P8)。
 同じ 3 回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
 COL1A1: I 型 Collagen、POSTN: Periostin、COL3A1: III型 Collagen、PLAP-1: PLAP-1、
 FN1: Fibronectin1、CTGF: CTGF
- B) 継代数の異なる HPDLの ECM 関連タンパクのタンパク質発現を Western Blot 法を用い て解析した。同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。

8. 老化 HPDL における ECM タンパク分解機構の検討

前述の ECM タンパク群において、遺伝子発現、タンパク質発現ともに継代数 に非依存性に恒常的な発現を示した I 型 Collagen と、遺伝子発現とタンパク質 発現のパターンが逆の相関を示した Periostin に着目し、その老化 HPDL にお ける発現機構について検討した。HPDL の Lysates を用いた Western Blot 法に よる解析では、熱並びに還元条件下で変成させたタンパク質の可溶画分の検出 となる。そこで、HPDL 細胞膜表面上のタンパク質の発現について、HPDL を 膜透過処理を行わずに免疫細胞染色することで比較、検討した。その結果、 HPDL P9 と比較し P32 においては、I 型 Collagen、Periostin ともに発現が減 少する傾向を認められた(図 8-A)。この際に、膜透過処理下においてはタンパ ク質の発現量に大きな差は認めなかった(データ示さず)。

多くの ECM タンパク種は、細胞表面上のみならず細胞外に分泌されることが 明らかとなっている。そこで、HPDL の培養上清中のタンパク質発現量、すな わち分泌タンパク質量について ELISA 法を用いて定量的に解析した(図 8-B)。 成熟 I型 Collagen 生成時に生ずる C 末端ペプチド断片(以下 PIP と略す)に 対する抗体を用いた ELISA 法より、その継代数に関わらず、高いレベルの成熟 I型 Collagen 量の産生が認められた。一方 Periostin は、継代数の増加に伴い 有意な発現量の減少を認めた。

HPDL P32 における Periostin 遺伝子の転写量と細胞膜表面並びに培養上清 中のタンパク質量が相関しないメカニズムの一つとして、タンパク質翻訳後の 修飾機構が考えられる。Collagen や Fibronectin 等の様々な ECM タンパクが 細胞外で MMPs による分解をうけその発現レベルが調節制御されることが明ら かとされている。そこで、HPDL における MMP-1、2、3、14 の遺伝子発現レ ベルを HPDL P6 ならびに P32 について Real-Time PCR 法を用いて検討した (図 8-C)。その結果、HPDL P32 は P6 と比較して、MMP-1、2、3、14 の発 現レベルが、有意に増加していた。この中で、Collagen と Periostin の制御に 関わる MMP-1 ならびに MMP-2 のタンパク質量と酵素活性について検討した。 MMP は、潜在型酵素 Pro-MMP として分泌される。培養上清中のタンパク質発 現を ELISA 法を用い定量した結果、Pro-MMP-1、MMP-2 の産生量は HPDL P32 において顕著な増加を認めた(図 8-D)。培養上清を用いたザイモグラフィ ーの結果、HPDL P32 において MMP-1、MMP-2、MMP-3 の酵素活性の増強 が明らかとなった(図 8-E)。 А



図 8 老化 HPDL における ECM タンパク分解機構の検討

- A) HPDL P9、P32 における I型 Collagen、Periostin の免疫染色像を示す。(倍率 100 倍)
 同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- B) 継代数の異なる HPDL の培養上清に含有される PIP(左)並びに Periostin(右)のタン パク質量を、ELISA 法を用いて定量解析した(*:p<0.01 vs P8)。同じ3回の実験で得ら れた結果のうち、代表的なものを示す。
- C) HPDLP6、P32 における MMPs の遺伝子発現を Real-Time PCR 法を用いて解析した (*:p<0.01)。同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- D) 継代数の異なる HPDL の培養上清に含有される Pro-MMP-1(上段)並びに MMP-2(下
 段)のタンパク質量を、ELISA 法を用いて定量解析した(*:p<0.01 vs P10)。同じ3回の
 実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- E) ザイモグラフィーを用いて培養上清に含有される Pro-MMP-1、Pro-MMP-3(上段)、
 Pro-MMP-2、MMP-2(下段)の酵素活性を評価した。同じ3回の実験で得られた結果の
 うち、代表的なものを示す。

9. 老化 HPDL が産生するタンパクの機能解析

次に老化 HPDL の産生する分泌タンパク質の生理作用について解析した。最 初に、HPDL P10 を播種して作成した wound field に、HPDL P10 あるいは P33 由来培養上清 (CM)を添加し 24 時間培養を行う wound healing assay により、 同上 CM が *in vitro* 創傷治癒に及ぼす影響について検討した(図 9)。

HPDL P10 CM 添加群においては、対照群 (5%FBS 含有)と比較して、細胞 移動量の増加が認められたが、HPDL P33 CM 添加群では、細胞の移動量は対 照群と同等の低いレベルであった。前述の実験結果より、HPDL P33 CM は Periostin の含有量が低い事があきらかとなっている。そこで HPDL P33 CM 添 加群に Periostin 100 μg/ml を添加したところ、HPDL の移動量は、HPDL P10 CM 添加群と同レベルに回復した。さらに Periostin 添加による移動量の増強効 果は抗 Integrin 中和抗体添加の前処理によりその一部が阻害された。

このことより、老化 HPDL における ECM タンパクの産生異常が、歯周組織の創傷治癒に影響を及ぼすこと、その原因の一つとして Periostin 産生量の低下が関与することが示唆された。

А



HPDLにおける Wound Healing Assay の、細胞のクリスタルバイオレット染色像(A) と、 その細胞移動量の画像解析結果(B)を示す。Insert(+):Insert 未除去群、control:対照群(5%FBS 含有培地)、P10 CM: HPDL P10 由来 CM 添加群、P33CM: HPDL P33 由来 CM 添加群、P33 CM+Periostin: HPDL P33 由来 CM と Periostin (100 µg/ml)を添加した群、Anti-Integrin+P33 CM+Periostin: 抗 Integrin 抗体(10 µg/ml)で一時間培養後に HPDL P33 由来 CM と Periostin (100 µg/ml) を添加した群 (*:p<0.05)

同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。

10. HPDL の細胞老化のメカニズムの解析

老化 HPDL の形質発現のメカニズムとして、miRNA による機能制御につい て着目した。miRNA は 20~25 塩基の短鎖ノンコーディング RNA で、相補配 列を持つ標的 mRNA に結合し、タンパク質への翻訳の抑制や、mRNA そのも のを不安定化することで機能を阻害する³⁷。配列相補性より、理論上は1種類 の miRNA が 100 種以上の標的 mRNA を制御することが予測されており、細胞 の増殖、分化、アポトーシス、代謝などに関わることで、生体の発生のみなら ず疾患発症に深く関わる制御性の核酸分子である事が明らかとなってきている ³⁸。また、最初に線虫で発見された miRNA である lin-4 は線虫の寿命を制御す るものであった ^{39,40} ことから、miRNA の生理作用の一つとして、老化・寿命の 調節制御の重要性が考えられている。

はじめに、P5、6、10、18、32、34の HPDL より miRNA を回収し、miRNA アレイを用いてその発現プロフィールを検討した。現在、ヒトにおいては約2000 種の miRNA が報告されている 41 が、HPDL においては約 360 種の有意な発現 が確認された。発現プロフィールの類似性・独立性を評価する為に階層的クラ スタリング解析を用いて検討した結果、継代数の近い群では類似した発現パタ ーンを示すことが明らかとなった(図 10-A)。次に老化に伴う発現変動パター ンを分類する為、K-means クラスタリング解析を行った(図 10-B)。8 種類の 発現パターンの中で、継代数の増加に伴い発現が増加するパターン(赤枠で表 す)に注目した。その中で、HPDL P34 で発現が2倍以上に増加した miRNA は7種類であり、各々について標的遺伝子の探索を行った(データ示さず)。歯 周病は慢性炎症性疾患であること、歯根膜には間葉系の幹細胞亜集団が存在し ていることから、炎症制御に重要な miR-146a および幹細胞性に関連のある miR-34a に着目した。miR-146a はリウマチなどの炎症局所において高発現し ていること⁴²、NF·κBによりその発現が誘導され、炎症制サイトカインシグナ ル経路においてネガティブフィードバック因子として機能することが報告され ている⁴³。また、miR-34a は、体性幹細胞の初期化並びに長寿遺伝子の SIRT1⁴⁴ を制御することが報告されている。

HPDL において、老化に伴う miR-146a の発現増加をマイクロアレイの結果 (図 10-C 左) ならびに Real-Time PCR 法を用いて確認した(図 10-C 右)。 この際、miR-146a の発現のピークは図 5-A に示した IL-6 の遺伝子発現のピー クと比較し、遅延することが明らかとなった。次に、miRNA の機能を解析する

為に、mimic、すなわち内在性 miRNA 様の動向を示す2本鎖 RNA オリゴヌク レオチドと、inhibitor すなわち標的 miRNA を抑制する1本鎖 RNA オリゴヌ クレオチドを用いて検討した。P30以上の老化 HPDL においては、オリゴヌク レオチドの導入が困難であったことから、P30より継代数の少ない老化早期の HPDL を実験に使用した。この際に、Control のオリゴヌクレオチドを導入し た老化早期の HPDL において IL-6 の遺伝子レベルが高発現であったことより、 老化形質が誘導されていることを確認した(図 10-D, H)。HPDL に miR-146a の mimic 並びに inhibitor を導入し、IL-6 の発現を解析した。その結果、mimic の導入により IL-6 の遺伝子発現並びに培養上清中の IL-6 の産生量は減少する 一方、HPDL P24 においては inhibitor の導入により IL-6 の遺伝子発現が増加 した(図 10-D)。このことから、HPDL において miR-146a が加齢性の炎症反 応を制御することが示唆された。

次に、幹細胞の制御に関わる miR-34a について HPDL における発現を検討し た。HPDL において、老化に伴い miR-34a の発現増加を確認した(図 10-E)。 その一方 miR-34a の標的遺伝子の SIRT1 は老化に伴い、遺伝子発現、タンパ ク質発現ともに減少した(図 10-F)。実際に HPDL に miR-34a の mimic を導 入した結果、SIRT1 の遺伝子発現、タンパク質発現が減少した(図 10-G)。 mimic を導入した際に IL-6 と Periostin の遺伝子発現は増加し、さらに Periostin に関 しては inhibitor 導入により遺伝子発現が減少した(図 10-H)。このことから、 老化 HPDL においては、miR-34a により制御されるヒストンの修飾機構により、 炎症性サイトカインや ECM タンパクなどの発現が制御されていることが示唆 された。







図 10 HPDL の細胞老化のメカニズムの解析

- A) miRNA アレイにおける階層的クラスタリング解析の結果を示す。
- B) miRNA アレイにおける K-means クラスタリング解析の結果を示す。
- C) 継代数の異なる HPDL における miR-146a の発現を、miRNA アレイ(左)、Real-Time PCR
 法(右)を用いて解析した(*:p<0.01)。PCR の結果に関しては、同じ3回の実験で得ら
 れた結果のうち、代表的なものを示す。
- D) HPDL P8、P24 に miR-146a の mimic 並びに inhibitor を導入した際の IL-6 の遺伝子発現を Real-Time PCR 法(左)を用いて、タンパク質発現を ELISA 法(右)を用いて解析した。(**:p<0.01、*:p<0.05)。c: control、m: mimic、i: inhibitor。同じ 3 回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- E) 継代数の異なる HPDL における miR-34a の発現を miRNA アレイ(左)、並びに Real-Time PCR 法(右)を用いて解析した(*:p<0.01)。PCR の結果に関しては、同じ3回の実験で 得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- F) 継代数の異なる HPDL における SIRT1 の遺伝子発現を Real-Time PCR 法(左)を用いて、タンパク質発現を Western Blot 法(右)を用いて解析した(*:p<0.01)。同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。</p>

- G) HPDL P7、P27 に miR-34a の mimic 並びに inhibitor を導入した際の SIRT1 の遺伝子発現を Real-Time PCR 法(左)を用いて、タンパク質発現を Western Blot 法(右)を用いて解析した(*:p<0.01)。c: control、m: mimic、i: inhibitor。同じ3回の実験で得られた結果のうち、代表的なものを示す。
- H) HPDL P7、P27 に miR-34a の mimic 並びに inhibitor を導入した際の IL-6、Periostin の 遺伝子発現を Real-Time PCR 法を用いて解析した (*:p<0.01)。同じ3回の実験で得られ た結果のうち、代表的なものを示す。

考察

個体の老化の原因としては、外的要因と内的要因が考えられる。生活環境な どの外的要因に対し、内的要因としては、ROS、DNA ダメージ、ミトコンドリ アの障害などに誘導される細胞レベルの老化、すなわち細胞老化が有力と考え られている。細胞老化は、細胞死とは異なり、老化細胞が除去されることなく ストレス負荷の状態で臓器に蓄積されることから、様々な病態への関与が注目 されている。これまでに、臓器の老化が各種疾患発症に関与することは、糖尿 病、心筋梗塞、リウマチ性疾患、パーキンソン病において報告されている。そ の病態発症のメカニズムの一つとして、老化細胞が SASP タンパクの産生を介 して、慢性炎症を誘導することが明らかとなっている。

しかしながら、老化と歯周病の関連についての詳細な検討は未だ十分になさ 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おける細胞老化の意 義については明らかとなっていない。本研究では、マウス歯周組織における老 化の影響を *in vivo* モデルを用いて解析した。また初代培養ヒト歯根膜細胞

(HPDL)を用いた *in vitro* 細胞老化システムを樹立することで、その細胞老 化の生理学的および病態生理学的意義を検討することを目的とした。

高週齢マウスにおいては、SA-β-GAI 陽性の老化細胞は骨、歯根膜、歯髄、歯 肉結合組織で観察され、その中でも歯根膜には SA-β-GAI 強陽性の細胞が多く存 在することが明らかとなった(図 1)。細胞の種類によって、細胞老化あるいは 細胞死の運命系譜が異なる事が報告されていることから、この実験結果は重要 な知見と考えられる。マウスの初期発生過程においては、細胞老化現象が確認 されている⁴⁵ことから、定常状態の細胞老化が、歯根膜の恒常性維持を担って いる可能性が示唆される。また、老化個体の冠動脈を用いた研究では、同部の 血管内皮細胞において SA-β-GAI 陽性細胞が多く存在するとの報告がなされて いる。歯根膜中の血管内皮においても SA-β-GAI 陽性の老化細胞が認められたこ とは、同様の病態形成のメカニズムが歯周病にも関与する事を示唆するもので、 興味深い。

生体内の加齢による細胞老化の現象を再現する為に、in vitroの実験系で継代 培養の繰り返しによる、テロメアの短縮にもとづいた複製老化を誘導する手法 を選択した。その結果として、老化 HPDL においては、ミトコンドリアの異常 構造並びに ROS の蓄積が認められた(図 3)。ミトコンドリアの異常にテロメ

アの短縮は直接関与しないことから、複製老化に伴うオートファジーなどの膜 融合システムの異常が関与しているものと考えられる。この際に生じた細胞内 ROS は、DNA を傷害する老化誘導刺激として、染色体のエピジェネテックな 変異を伴う SAHF の誘導に、テロメア短縮と共に関与したものと考える。また、 口腔細菌種には ROS 産生菌も存在すること 47 から、細菌感染に依存する歯周組 織の ROS 誘導性の細胞老化の可能性が示唆され大変興味深い。

本研究では、老化 HPDL の病態生理学的作用の一つとして、炎症に関わる SASP タンパクに注目している。実際に、SASP 現象は、線維芽細胞、上皮細胞、 血管平滑筋細胞、免疫担当細胞などの細胞種において報告されており、オート クライン的に自己に作用し老化を促進すること 48,49、パラクライン的に他の正 常細胞の増殖に抑制的に働くこと 50、さらには癌の進展には促進的に働くこと ⁵¹が明らかとなっている。老化 HPDL は、代表的な SASP タンパクとして報告 のある IL-6、IL-8、MMPs を遺伝子レベルならびにタンパク質レベルで高発現 していた(図 5-A,B、図 8-C-E)。また、SASP 分泌タンパクとして報告のある、 TGF-β、TNF-α、GROα、MCP-1の遺伝子レベルでの高発現を確認した(デー タ示さず)。HPDLにおいて、他の細胞種でも確認されている SASP タンパクの 高発現が認められたことは、老化性の慢性疾患と歯周病において共通の基礎病 態の存在を示唆するものである。しかし老化歯周組織における SASP タンパク の産生は、炎症の増強に作用するものか、免疫担当細胞を誘導する事で老化細 胞のクリアランスに作用するものか不明であり、今後の重要な検討すべき課題 と考えている。また老化小動物を用いた in vivo 歯周病実験モデルの解析並びに 高齢者を対象とした歯周組織の臨床疫学調査や、保存困難で抜歯した歯などの 試料の解析が SASP タンパクの"Clinical Relevance"の確立に必要と考えて いる。現在、細胞培養上清の質量分析解析により、老化 HPDL に特異的な分泌 蛋白の同定に取り組んでいる。これらの分子は、歯周病の新規の病態マーカー としての活用が期待される。

マウス由来歯肉線維芽細胞を用いた *P.g.* 感染実験では、高週齢マウス由来歯 肉線維芽細胞は若週齢マウス由来のものと比較し IL-6 の遺伝子発現が低いとの 報告がある ⁵²。そこで HPDL の炎症性刺激に対する免疫応答を検討するために、 炎症性サイトカインとして SASP タンパクの一つである IL-1βと、細菌因子と して *P.g.*由来 LPS を用いて刺激し、比較した。老化 HPDL は IL-1β刺激により IL-6 の著しい発現増強を示す一方、*P.g.*由来 LPS 単独刺激に対しては低応答で

あった(図 5-C)。また、IL-1βと *P.g.*由来 LPS の共刺激においても、IL-6の発 現の増強は認められなかった。老化 HPDL は定常状態で慢性炎症状態にあるこ と、さらには外部からの炎症性サイトカイン刺激に応答して炎症反応が増強す ることが示唆された。老化 HPDL における炎症性サイトカイン高産生の原因と して、DNA ダメージシグナルによって活性化された、NF-κB によるサイトカイ ンシグナルの増幅機構を確認している(データ示さず。)老化 HPDL における 細菌刺激に対する低応答性の原因として、歯肉線維芽細胞に比し、歯根膜細胞 は Toll like receptor(以下 TLR と略す)の発現が低いことが考えられる(デー タ示さず)。また、細胞内において、MyD88、IRAK 等は細胞内シグナル伝達の アダプタータンパクとして機能するが、老化 HPDL においては、TLRs の細胞 内ドメインに結合するはずの MyD88、IRAK が IL-1 Receptor、TNF Receptor に結合する事で競合阻害が生じている可能性が考えられる。老化 HPDL におけ る細菌刺激に対する低応答性がどのような病態生理学的意義を有するかについ ては、*in vivo* 動物モデルでの検討が必要と考えられる。

老化 HPDL の形態学的な変化として、肥大化が認められ(図 2-D)、また機能 的な変化として自律的な運動能の低下が認められた(図 6-A)。その分子機構と しては、細胞骨格を構成する Actin、ECM タンパクと細胞表面接着分子との相 互作用、老化細胞により高産生が報告されている Wnt⁵³ による細胞極性の制御 などが考えられる。私たちの研究室では、歯根膜に特異的な ECM タンパクが、 細胞の増殖・分化 54、組織の修復治癒、免疫応答 55 に重要な役割を担っているこ とを見いだしている。そこで、本研究では、SASP 現象以外の歯根膜に特徴的な 生理作用として、歯根膜における ECM タンパクに着目した。Periostin は歯根 膜細胞に特徴的に高発現している ECM タンパクの一つであり、幹細胞の遊走 ⁵⁶、硬組織形成細胞への分化⁵⁷に重要な役割を演じている。In vivoにおける上 皮創傷治癒モデルでは、Periostin のノックアウトマウスにおいてその創傷治癒 が低下すること、ヒト表皮角化細胞を用いた wound healing assay では Periostin の強発現により細胞増殖の促進が報告されている 58。本研究での老化 HPDL における解析の結果、Periostin の遺伝子発現とタンパク質発現のパター ンは相関しないことが明らかとなった。すなわち老化に伴いその遺伝子発現は 増加する一方、タンパク質発現は減少する傾向が顕著に認められた。この原因 として、老化に伴い産生が増加する TGF-βの刺激により Periostin 遺伝子の転 写量は増加するが、SASP タンパクの一つである MMPs によって生合成された

Periostin が分解された可能性が示唆された。しかしながら、老化 HPDL においては、抗体では認識されない完全長ではない Periostin のタンパク質分解産物が存在、機能している可能性は排除できず、タンパク質発現レベルの変動についてはさらなる検討が必要と考えられる。

老化 HPDL 由来 CM を用いて、老化 HPDL が正常 HPDL にパラクライン的 に与える影響を Wound Healing Assay の手法を用いて評価した。前述の実験結 果(図 8D,E)より、老化 HPDL の CM 中には MMP-1、2、3 の高産生が認め られた。そこで老化 HPDL の CM に MMPs の阻害剤を添加し正常 HPDL の移 動量について検討したが、回復は見られなかった(データ示さず)。理由として レシピエントの細胞が HPDL P10であり MMPsによる分解に非依存性の ECM タンパクが豊富に分泌されることにより、阻害剤の効果が検出されなかった可 能性が考えられる。さらに、老化 HPDL では Periostin の分泌量が減少してい ること、老化 HPDL 由来 CM への Periostin の添加により、正常 HPDL の移動 量は回復することが明らかとなった(図 9)。Periostin は組織修復マクロファー ジの遊走を促進させ、組織の創傷治癒を促すことが報告されている ⁵⁹。このこ とより、正常 HPDL から分泌される Periostin のような ECM タンパクの補充 療法が、老化歯周組織の治癒の促進をはかる新たな治療への展開が期待される。

老化における miRNA の役割は細胞、臓器、個体レベルで多く報告されてい る。無脊椎動物の個体レベルの老化を制御する miRNA は数多く同定され、哺 乳類でも組織特異的な老化に関連する多くの miRNA が判明している。そこで 本研究では老化 HPDL に特異的な発現変動を示す miRNA を同定するため、 miRNA アレイ解析を行った。

歯周病は慢性炎症性疾患であることに着目し、はじめに老化と慢性炎症に深 く関与する miR-146a について詳細に解析した。miR-146a は NF-κB により誘 導され、炎症性サイトカインシグナル経路において機能する制御因子として報 告がなされており⁶⁰、線維芽細胞においては miR-146a と相補配列を持つ標的 遺伝子 IRAK の阻害により NF-κBをネガティブフィードバックに制御すること で、IL-6、IL-8の分泌量は減少するとの報告がなされている⁶¹。HPDL におい ても miR-146a の導入もしくは阻害により、IL-6の発現が制御された(図 10-D)。 また、miR-146a は継代数の増加に伴い発現が上昇し、その発現のピークは IL-6 の遺伝子発現のピークよりも後半にあることから、HPDL においても加齢に伴 う炎症性サイトカイン産生を収束させるネガティブフィードバック因子として の役割が示唆された(図 5-A、図 10-C)。すなわち、miR-146a は、老化 HPDL における正常な炎症反応を抑制することで、免疫システムを回避し、炎症の慢性化に関与することが示唆された。

miR-34a はがん抑制遺伝子である p53 により発現が誘導され、細胞周期を制 御するサイクリン依存性キナーゼ CDK4/6、 アポトーシスを抑制する BCL2、 長 寿遺伝子と呼ばれるニコチンアミド依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 と相補配列 をもち、機能を制御することが報告されている 62。実際に、miR-34a 導入によ り HPDL において SIRT1 の発現が抑制され、IL-6 並びに Periostin の発現は上 昇した(図 10-G,H)。SIRT1 が線維芽細胞において IL-6 のプロモーター領域 に結合する事が報告されている⁶³。老化 HPDL においては miR-34a の高発現に より、SIRT1の発現が低下し、IL-6 プロモーター領域のヒストンの Lysine の アセチル化が促進されることで IL-6 の転写量が増加したことが示唆される。ま た miR-34a ノックアウトマウス由来体細胞に Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc を導入 すると、野生型の細胞の場合と比較し再プログラム化効率が上昇したことから、 miR-34a が幹細胞性に関わることが報告されている⁶⁴。HPDL は継代数の増加 とともに、硬組織形成細胞への分化能が低下していた(図 6-B)。初代培養 HPDL は、幹細胞能亜集団を含むヘテロな細胞集団であることから、老化による硬組 織形成物の減少が、miR-34a による Periostin や CDK4/6 の調節にもとづいた 幹細胞能の機能制御によるものか、幹細胞数の減少によるものかについては今 後の研究課題の一つとしている。

本研究結果より、加齢性の個体の老化により、歯周組織の骨吸収が顕著に亢進すること、その際に、歯根膜の細胞老化が亢進することが示唆された。実際に、ヒトの初代培養系細胞により樹立された老化 HPDL は、SASP タンパクの産生を介して、細菌刺激に非依存性に炎症応答に関与することが示唆された。また、歯根膜老化に伴う ECM タンパクの異常が、歯根膜の自己修復能の低下と、炎症性免疫担当細胞の遊走を伴う生体バリアの破綻に関与することが示唆された。HPDL の細胞老化におけるエビジェネテックな分子機構として、miRNAの関与が示唆された(図 11)。

臨床において、高齢者における歯周病は他の糖尿病や血管梗塞性疾患などの 慢性炎症性疾患とともに難治性である。さらに、全身性疾患に罹患していない 高齢者においても、血中の炎症性サイトカイン濃度の上昇が報告されている⁶⁵。 その原因の一つとして、歯周組織における老化細胞が、SASP タンパクや ECM

タンパクの異常を介して慢性炎症の誘導、組織修復の抑制に働くこと、さらに は歯根膜細胞自身の機能低下により、組織の機能不全や幹細胞性の破綻が誘導 されることが強く示唆された。

超高齢化が急速に進行する日本においては、平均寿命の延長とともに難治性 の慢性疾患の罹患率が急上昇し、健康寿命の延長が社会的な課題である。口腔 領域においても、2013年度歯科疾患実態調査の結果より、80歳で20本以上の 歯を有する者の割合は38.3%と向上したが、ほぼ全員が中等度以上の慢性歯周 病に罹患していることが報告されている。高齢者においては、細菌除去を目的 としたスケーリングや抗生剤の投薬からなる定期的なメインテナンス療法のみ では、歯周治療のコントロールは困難である場合が多い。本研究成果によって 明らかとなった、慢性炎症、ECM タンパクの異常といった老化形質を標的とす る、核酸医薬による抗炎症療法、ECM タンパク補充療法などの開発が、歯根膜 の老化制御を介した歯周病の発症や進行を抑制するのみならず、全身疾患の制 御につながる新たな治療法の可能性があり、歯科治療分野への応用が期待され る。

図 11 作業仮説

結論

本研究結果より以下の結論を得た。

- 1. 加齢により歯周組織の破壊が進行し、その部位においては歯根膜における 老化も亢進していることが示された。
- 2. 老化ヒト歯根膜細胞は炎症性サイトカインなどの SASP タンパクを高発現 し、慢性炎症への関与が示唆された。
- 3. 老化ヒト歯根膜細胞の ECM タンパクの異常を介して細胞の増殖、遊走、分化に影響を及ぼし、歯周組織の機能不全を招く可能性が示唆された。
- 老化ヒト歯根膜細胞においては miR-146a、miR-34a の発現増加により老 化形質が制御されることが示唆された。

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 ロ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 ロ腔治療・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 ロ腔分子免疫制御学講座(ロ腔治療学教室)の教室員の皆様に厚く 御礼申し上げます。

文献

- Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013;123(3):966-972.
- Singh T, Newman AB. Inflammatory markers in population studies of aging. Ageing Res Rev. 2011;10(3):319-329.
- Naylor RM, Baker DJ, van Deursen JM. Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;93(1):105-116.
- ChildsBG, BakerDJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 2014;15(11):1139-1153.
- 5. Ohtani N, Hara E. Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis. *Cancer science*. 2013;104(5):525-530.
- 6. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25(3):585-621.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010;24(22):2463-2479.
- Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853-2868.
- 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.
- Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997;13:20-40.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim 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.

- 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.
- Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. Crit Rev Oral Biol Med. 1998;9(3):248-266.
- Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol.* 1969;4(5):549-553.
- 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.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
- 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.
- 18. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(20):9363-9367.
- Narita M, Nũnez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003;113(6):703-716.
- Greer EL, Maures TJ, Ucar D, Hauswirth AG, Mancini E, Lim JP, Benayoun BA, Shi Y, Brunet A. Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in Caenorhabditis elegans. *Nature*. 2011;479 (7373): 365–371.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120(4):483-495.
- 22. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH, Finkel T. Ras proteins induce senescence by altering

the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 1999;274(12):7936-7940.

- 23. Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, Nakayama K, Nakayama KI, Ide T, Saya H, Hara E. Mitogenic signalling and the p16^{INK4a}-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol.* 2006;8(11):1291-1297.
- 24. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* USA. 1996;93(24):13742-13747.
- Imai S, Guarente L. Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(5):212-220.
- 26. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997;390(6655):45-51.
- Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010;16(5):238-246.
- Minamino T, Yoshida T, Tateno K, Miyauchi H, Zou Y, Toko H, Komuro I. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation*. 2003;108(18):2264-2269.
- 29. Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, Yamada T, Kanoh M, Matsumoto A, Maruyama S, Kometani K, Kurosaki T, Ohara O, Nakayama T, Yamashita M. The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat Commun.* 2014;5:3555.
- 30. Shimizu N, Ogura N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Abiko Y, Iwasawa T, Takiguchi H. Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6

production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 1992;37(9):743-748.

- 31. Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, Umemoto T. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 1995;63(9):3576-3581.
- 32. Kao RT, Murakami S, Beirne OR. The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. *Periodontol 2000*. 2009;50:127-153.
- Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res. 2007;10(3):149-160.
- Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* 1998;8(2):51-54.
- Gospodarowicz D, Delgado D, Vlodavsky I. Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S* A. 1980;77(7):4094-4098.
- 36. Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech*. 2010;43(1):55-62.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-297.
- Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012;148(6):1172-1187.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
- 40. Boehm M, Slack F. A developmental timing microRNA and its target regulate life span in C. elegans. *Science*. 2005;310(5756):1954-1957.
- 41. miRBase (マンチェスター大学、英国) < http://www.mirbase.org/ > 2016 年 1 月 30 日アクセス
- 42. Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum*. 2012;64(1):11-20.

- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-12486.
- 44. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36): 13421-13426.
- 45. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. 2013;155(5):1104-1118.
- 46. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial Cell Senescence in Human Atherosclerosis. Role of Telomere in Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 2002;105:1541-1544
- Zhu L, Kreth J. The role of hydrogen peroxide in environmental adaptation of oral microbial communities. Oxid Med Cell Longev. ;2012:717843.
- 48. Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernando E, Gil J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell.* 2008;133(6):1006-1018.
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 2008;133(6):1019-1031.
- 50. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, Carroll T, Capper D, Pritchard C, Inman GJ, Longerich T, Sansom OJ, Benitah SA, Zender L, Gil J. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013;15(8):978-990.
- 51. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S,

Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013;499(7456):97-101.

- 52. Domon H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Age related alterations in gene expression of gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis. J Periodontal Res.* 2014;49(4):536-543.
- 53. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell*. 2012;149(6):1298-1313.
- 54. Awata T, Yamada S, Tsushima K, Sakashita H, Yamaba S, Kajikawa T, Yamashita M, Takedachi M, Yanagita M, Kitamura M, Murakami S. PLAP-1/asporin positively regulates FGF-2 activity. *J Dent Res.* 2015;94(10):1417-1424.
- 55. Yamaba S, Yamada S, Kajikawa T, Awata T, Sakashita H, Tsushima K, Fujihara C, Yanagita M, Murakami S. PLAP-1/Asporin Regulates TLR2-and TLR4-induced Inflammatory Responses. J Dent Res. 2015;94(12):1706-1714.
- 56. Matsuzawa M, Arai C, Nomura Y, Murata T, Yamakoshi Y, Oida S, Hanada N, Nakamura Y. Periostin of human periodontal ligament fibroblasts promotes migration of human mesenchymal stem cell through the $\alpha_v\beta_3$ integrin/FAK/PI3K/Akt pathway. *J Periodontal Res.* 2015;50(6):855-863.
- 57. Yamada S, Tauchi T, Awata T, Maeda K, Kajikawa T, Yanagita M, Murakami S. Characterization of a novel periodontal ligament-specific periostin isoform. *J Dent Res.* 2014;93(9):891-897.
- 58. Nishiyama T, Kii I, Kashima TG, Kikuchi Y, Ohazama A, Shimazaki M, Fukayama M, Kudo A. Delayed re-epithelialization in periostin-deficient mice during cutaneous wound healing. *PLoS One*. 2011;6(4):e18410.

- 59. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W, Fang X, Paul J, Wu L, Sloan AE, McLendon RE, Li X, Rich JN, Bao S. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol.* 2015;17(2):170-182.
- Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. J Cell Biol. 2011;192(4):547-556.
- 61. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Orjalo AV, Rodier F, Lithgow GJ, Campisi J. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging*. 2009;1(4):402-411.
- 62. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):193-199.
- 63. Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Takimoto K, Maruyama M, Maruyama W, Motoyama N. SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLoS One*. 2015;10(1):e0116480.
- 64. Choi YJ, Lin CP, Ho JJ, He X, Okada N, Bu P, Zhong Y, Kim SY, Bennett MJ, Chen C, Ozturk A, Hicks GG, Hannon GJ, He L. miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol.* 2011;13(11):1353-1360.
- 65. Miura Y, Hashii N, Tsumoto H, Takakura D, Ohta Y, Abe Y, Arai Y, Kawasaki N, Hirose N, Endo T; SONIC (Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians). Change in N-Glycosylation of Plasma Proteins in Japanese Semisupercentenarians. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142645.