



Title	老化ヒト歯根膜細胞におけるミトファジーの機能解析
Author(s)	鈴木, 美麻
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/72252">https://hdl.handle.net/11094/72252</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 鈴木 美 麻 )

論文題名 老化ヒト歯根膜細胞におけるマイトファジーの機能解析

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

歯根膜は、歯槽骨とセメント質の間に介在して、咬合圧を緩衝、調節する結合組織であり、口腔内細菌の侵襲、pH変化、酸化ストレスなどの多様な侵害刺激を遮断する生体バリアーとしての生理機能を担っている。一方、生体内においては、過剰な活性酸素種（Reactive Oxygen Species;ROS）は、ダメージを受けたミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系において放出され、細胞構成蛋白やDNAを酸化・傷害することで、細胞老化、炎症、アポトーシスを誘導する。また、ミトコンドリアの機能不全は、メタボリックシンドローム、神経変性疾患、循環器系疾患などの加齢性の成人性疾患の疾患臓器で明らかとなり、その病態への関与が注目されている。興味深いことに、歯周病患者の歯肉溝浸出液には、高値の活性酸素代謝物が検出されており、ROSの病態への関与が強く示唆されている。しかしながら、歯周組織におけるROS発生の分子機構の詳細は未だ不明である。

そこで本研究では、近年明らかとなった損傷ミトコンドリアの細胞内クリアランス機構であるマイトファジーに焦点をあて、その機能異常が老化ヒト歯根膜細胞の過剰なROS産生に及ぼす影響を検討した。

## 【材料と方法】

## 1. 高週齢マウスにおける酸化ストレスの解析

雄性8週齢および85週齢C57BL/6 マウス上顎骨の非脱灰凍結切片を作製した。ROS反応試薬（DHE）によるROSの検出とDNA酸化ストレスマーカーである、酸化塩基8-OHdGの蛍光免疫組織染色を行い、高週齢マウスの歯周組織における酸化ストレスを評価した。

## 2. 老化ヒト歯根膜細胞におけるミトコンドリアの解析

ヒト歯根膜細胞を *in vitro* にて継代培養することで複製老化を誘導し、老化ヒト歯根膜細胞として供した。老化ヒト歯根膜細胞におけるミトコンドリアをMitoTracker並びにTimm22免疫染色を行うことでその局在を観察し、透過型電子顕微鏡（TEM）にてミトコンドリアの微細な解剖学形態を評価した。また、老化ヒト歯根膜細胞におけるミトコンドリアの膜電位の変化をJC-1色素にて染色し、蛍光顕微鏡およびマイクロプレートリーダーを用いて解析することで、定量評価した。

## 3. 老化ヒト歯根膜細胞におけるROSおよび酸化ストレスの解析

老化ヒト歯根膜細胞における細胞内のROSについて検討するため、蛍光プローブにて染色し、蛍光顕微鏡により評価した。また、老化ヒト歯根膜細胞においてDNA酸化ストレスマーカーである、酸化塩基8-OHdGの免疫染色を行い、酸化ストレスについて評価した。

## 4. 老化ヒト歯根膜細胞におけるマイトファジーの解析

老化ヒト歯根膜細胞におけるマイトファジーを解析するために、mt-mkeima-Redあるいは、低pH感受性のミトコンドリア標識試薬であるMtphagy Dyeを用い、脱共役剤CCCP処理によるマイトファジーダイナミクスを正常ならびに老化ヒト歯根膜細胞間にて比較し、評価した。オートファジーに関連する遺伝子のmRNAの発現レベルについてqRT-PCR法にて解析した。次に、*PARK2*を老化ヒト歯根膜細胞に遺伝子導入し、脱共役剤CCCP処理によるマイトファジーの誘導を評価した。また、同システムを用いて細胞内ROSの変化を蛍光プローブで染色し解析した。

#### 5. 老化ヒト歯根膜細胞におけるオートファジーフラックスの解析

HBSSにより栄養飢餓を誘導しオートファジーの代表的なマーカータンパクであるLC3-II、p62をウェスタンブロット法にて検出し、老化ヒト歯根膜細胞におけるオートファジーを生化学的に検討した。また、蛍光プローブGFP-LC3-RFPをレトロウイルスにて遺伝子導入し、オートファジーフラックスをイメージング解析した。

#### 6. 老化ヒト歯根膜細胞におけるmicro RNAによる損傷ミトコンドリアの標識異常の解析

歯根膜細胞の老化形質獲得におけるメカニズムの一つとしてmicro RNA (miRNA)に注目し、解析を行った。ヒト歯根膜細胞におけるmiR-181a, miR-137の発現を検討した。模倣合成オリゴ (mimic) を導入し、標的遺伝子である*PARK2*、*FUNDC1*の発現をqRT-PCR法にて検討し、細胞内のROSの変化をROS反応試薬 (CellRox Green) による染色により解析した。

#### 【結果】

##### 1. 高週齢マウスにおける酸化ストレスの増大

85週齢マウスの歯根膜において8週齢マウスに比べ、ROSの増加と8-OHdGの発現の増加が認められた。

##### 2. 老化ヒト歯根膜細胞における損傷ミトコンドリアの増加

老化ヒト歯根膜細胞において、ミトコンドリアは細胞質内に拡散して分布することが蛍光顕微鏡により観察された。TEM解析により、断裂、膨潤形態のミトコンドリアが増加することが観察された。またJC-1 標識により、老化ヒト歯根膜細胞においては、ミトコンドリア膜電位の低下が認められた。

##### 3. 老化ヒト歯根膜細胞におけるROSおよび酸化ストレスの解析

老化ヒト歯根膜細胞において細胞内のROSが増加し、8-OHdGの発現の増加が細胞免疫染色により認められた。

##### 4. 老化ヒト歯根膜細胞におけるマイトファジーの機能低下

mt-mkeima-RedおよびMtpagy Dyeを用いたマイトファジーの解析より、老化ヒト歯根膜細胞においてマイトファジーの機能が低下していることが明らかとなった。また、老化ヒト歯根膜細胞においては*PARK2*ならびにマイトファジー関連遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。*PARK2*の遺伝子導入により、マイトファジーは部分的に賦活化され、細胞内のROSが減少した。

##### 5. 老化ヒト歯根膜細胞におけるオートファジーのフラックスの低下

ウェスタンブロット法およびGFP-LC3-RFPを用いたオートファジーの解析より、老化ヒト歯根膜細胞におけるオートファジーのフラックス並びにタンパク分解系が低下していることが明らかとなった。

##### 6. miRNAによる損傷ミトコンドリアの標識異常

老化細胞ではmiR-181a、miR-137の発現が増加していた。正常ヒト歯根膜細胞へのmiR-181a、miR-137 mimicの導入により、標的遺伝子*PARK2*、*FUNDC1*の発現が低下し、細胞内のROSの蓄積が増加した。

#### 【結論および考察】

老化ヒト歯根膜細胞においては、損傷ミトコンドリアの認識機構とオートファジーフラックスの低下からなる、マイトファジーの機能不全が明らかとなった。そのメカニズムの一つとして、miR-181a、miR-137によるParkinを介したミトコンドリア認識機構の異常が示唆された。その結果、損傷ミトコンドリアより放出された過剰なROSがDNAの傷害を惹起し、内因性の酸化ストレスとなることが示唆された。加齢に伴う多様な環境ストレスへの暴露により生じたROSが歯周組織の酸化ストレスを誘導し、歯周病病態の増悪に関与することが推察される。今後、抗酸化剤やmiRNAの投与によるミトコンドリアの賦活化に基づいた、高齢者の歯周病病態の改善を目的とした抗酸化ストレス療法、予防法の開発が期待される。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 鈴木 美 麻 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	村上 伸也
	副 査	教授	豊澤 悟
	副 査	准教授	久保庭 雅恵
	副 査	講師	大川 玲奈
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>本研究は、加齢に伴う歯根膜の酸化ストレスや活性酸素種増大の原因として、ヒト歯根膜細胞におけるミトコンドリアの異常とマイトファジーに着目し、解析を行ったものである。</p> <p>その結果、老齢マウスの歯根膜においては、酸化ストレスが増大していることを明らかとした。また、老化ヒト歯根膜細胞においては、不良ミトコンドリアが蓄積しており、細胞内クリアランス機構であるマイトファジーの異常がその原因であることを <i>in vitro</i> の解析により明らかとした。また、マイトファジー機能不全の分子メカニズムの一つとして、miR-181a、miR-137 による損傷ミトコンドリアの認識機構とオートファジーフラックスの低下を明らかとした。</p> <p>これらの研究成果は、ヒト歯根膜細胞の酸化ストレス制御におけるマイトファジーの役割を明らかにすると共に、ミトコンドリアの機能維持に基づく高齢者の歯周病病態の改善を目的とした抗酸化ストレス療法、予防法の開発につながる重要な知見と考えられ、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。</p>			