

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592377

研究課題名（和文）メカニカルストレスによる歯周組織構成細胞のシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of intracellular signal transduction in periodontal constitutive cells exposed to cyclic strain

研究代表者

八木 孝和（YAGI TAKAKAZU）

朝日大学・歯学部・口腔構造機能発育学講座歯科矯正学分野・准教授

研究者番号：10346166

研究成果の概要：

歯周組織構成細胞である歯根膜線維芽細胞に矯正治療時にかかるメカニカルストレスを *in vitro* で与えた際に、同細胞内の MAPK 経路が活性化された。その結果、炎症性サイトカインである IL-6 や IL-8 の産生作用が誘導されることが示唆された。また、歯周病原性由来の病原因子である *Porphyromonas gingivalis* 線毛を、メカニカルストレス下において培養細胞に添加すると、炎症性サイトカインの産生が増加する結果が得られた。矯正治療中の歯周病の発症を予防するためにオーラルケアの必要性が重要であると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：メカニカルストレス、ヒト歯周組織構成細胞、細胞内シグナル伝達機構

## 1. 研究開始当初の背景

宿主細胞は伸展刺激負荷により種々の化学伝達物質を産生することが知られており、結果的に心・血管系組織における心肥大や動脈硬化などを惹起することが考えられる。近年、伸展刺激が、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介して細胞増殖を誘導することが報告されている(Wang, J. G. *et al.*, Stretch-induced cell proliferation is mediated by FAK-MAPK pathway. *Life Science*, 76, 2817-2825, 2005)。また、これら伸展刺激が転写因子である NF- $\kappa$ B 経路

を介して細胞の線維化に関わる遺伝子プロモーター領域を活性化することが示唆されている(Chaour, B. *et al.*, Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.*, 281, 20608-20622, 2006)。他方、歯科領域においても咀嚼や咬合力ならびに矯正力が、歯根膜細胞へメカニカルストレスを与えることが知られている(Yamaguchi, M. *et al.*, Effects of different magnitudes of

tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells. *J. Dent. Res.*, 75, 889-894, 1996), また, 口腔内には多くの歯周病原細菌が棲息し, これらの病原因子が細胞内シグナル伝達経路を活性化し, 炎症性サイトカイン産生を誘導する (Asai, Y. *et al.*, *Treponema medium* glycoconjugate inhibits activation of human gingival fibroblasts stimulated with phenol-water extracts of periodontopathic bacteria. *J. Dent. Res.*, 84, 456-461, 2005)。しかしながら, これまでにメカニカルストレスと細菌病原因子の相互作用に関する分子レベルにおける研究はみられず, 伸展刺激による細胞形態変化がどのように細胞内シグナル伝達経路を活性化し, 種々の化学伝達物質の産出を誘導するのか, また, 歯周病原因子が伸展刺激負荷細胞に対してどのような影響を与えているのか不明な点が多い。そこで, 分子生物学的アプローチによる本研究に着手することにより, メカニカルストレスに対する生体の応答性について有意義な基礎情報を得られることが期待される。また, 常在細菌叢が形成されている口腔内において, 矯正的な歯の移動に伴うメカニカルストレスが, 宿主細胞の歯周病原細菌に対する応答性にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることは興味深い。本研究は, 歯周組織構成細胞に対するメカニカルストレス下での細胞内シグナル伝達機構を探究するとともに, これらストレス負荷細胞における歯周病原因子の相互作用について, 免疫分子生物学的手法を用いて明らかにしようとするものである。

## 2. 研究の目的

本研究は, ヒト歯周組織構成細胞を用いて, メカニカルストレスによる細胞内シグナル伝達機構を解明しようとするものである。また, 申請者は, 細菌線毛タンパク質などの歯周病原因子に対する細胞応答性やこれら病原因子の認識にかかわる CD14 や Toll-like receptor (TLR) などの細胞受容体の発現に及ぼすメカニカルストレスの影響について明らかにすることを考えた。初年度は, これら歯周病原因子を菌体から調製することを計画した。また, 最近開発されて本学に既に設置されている一軸方向細胞伸展装置を用いて, メカニカルストレス下における細胞の反応性について検討した。次年度は, 初年度に調製した種々の歯周病原因子を伸展負荷細胞に作用させた際の炎症性サイトカイン産生誘導やこれら遺伝子発現ならびにその細胞認識受容体について検討することを計画した。

## 3. 研究の方法

### 1) Cell culture

朝日大学附属病院にて同意の得られた5名の患者より, 矯正治療のため抜去歯の歯根中央部より歯根膜線維芽細胞を分離・培養した。なお, これらの細胞を供するにあたり, 朝日大学倫理委員会にて承認を得た。また, 歯根膜由来細胞であることは, アルカリフォスファターゼ活性によって確認した。細胞は 10%FBS と 50  $\mu$ g/ml の streptomycin 含有の  $\alpha$ -minimum essential medium を用いて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養し, 5~10 世代までの細胞を実験に供した。

### 2) 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 線毛の分離・精製

*P. gingivalis* を嫌氣的細菌培養装置を用いて大量培養後, 遠心操作にて菌体を得, これら菌体から線毛を機械的に剥離し, 塩析, ついで陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

### 3) 歯周組織構成細胞と歯周病原因子の共における一軸方向伸展刺激の影響

#### 伸展装置

細胞の伸展には, 細胞伸展装置 ST-140 (Strex Inc, Osaka, Japan)を用いた。10%コーゲンコートしたシリコンチャンバーに 1.0x10<sup>5</sup> 個/ml ヒト歯根膜線維芽細胞を容れて, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。伸展装置は, チャンバーの片側が固定され, 他方がモーター可動式のフレーム上に設置され, 1/60 Hz のタイミングでチャンバーのたるみがない状態から 10%の伸展刺激を加えた。この刺激は, 一軸方向にのみ作用し, 側方の変形は 1%以下であった。

#### Western blotting

シリコンチャンバーを伸展装置に装着し, 0~120 分後に sample buffer で細胞を溶解後, 回収した。Total ERK1/2, p38 MAPK, JNK, c-Jun およびそれぞれのリン酸化を検出した。また, 陽性対照として Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>を用いた。

#### mRNA の発現 (RT-PCR 法)

1.0x10<sup>5</sup> 個/ml のヒト歯根膜線維芽細胞をシリコンチャンバーに容れて伸展装置に装着し, 0~480 分後に GenElute mammalian total RNA miniprep kit を用いて, 全 RNA を回収し, RT-PCR 法にて mRNA 発現を調べた。

#### Cytokine assay

1.0x10<sup>5</sup> 個/ml のヒト歯根膜線維芽細胞は

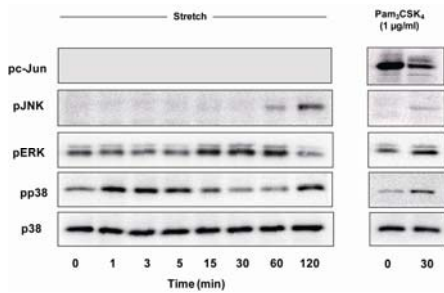
シリコンチャンバーに容れて伸展装置に装着し、48時間後の培養上清中のIL-6およびIL-8産生性をELISAにて測定した。

#### 共刺激実験

1.0x10<sup>5</sup>個/mlのヒト歯根膜線維芽細胞をシリコンチャンバーに容れて伸展装置に装着し、伸展開始30分前にあらかじめ分離・精製した*P. gingivalis*線毛(10μg/ml)を投与した群とコントロール群を伸展した。24時間後の培養上清中のIL-8産生量をELISA法で測定した。

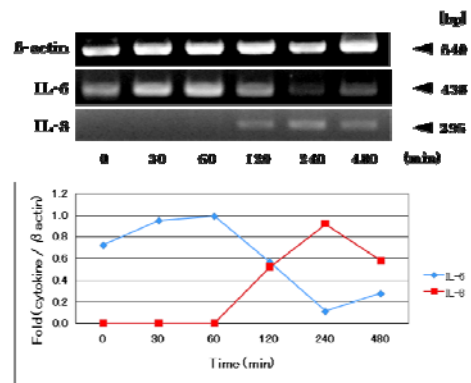
#### 4. 研究成果

##### 1) 伸展刺激に対するMAPKシグナリングカスケードの動態



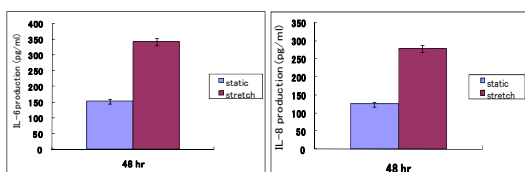
刺激後1分でp38 MAPK, 15分でERK1/2, 60分でJNKのリン酸化がそれぞれみられた。

##### 2) 伸展刺激に対するmRNA発現



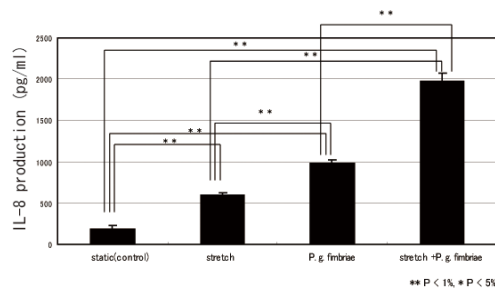
IL-6およびIL-8 mRNAは60分および240分で最も強く発現がそれぞれみられた。

##### 3) 伸展刺激に対する炎症性サイトカインの産生性



IL-6およびIL-8の産生誘導がみられた。

##### 4) 伸展刺激および歯周病原因子による共刺激に対するサイトカインの産生性



歯周病原因子である*P. gingivalis*線毛を添加した培養ヒト歯根膜線維芽細胞に伸展刺激を与えた条件下では、単独刺激群と比較して、有意にIL-8産生の上昇がみられた。

#### 5. 考察

本研究に用いた伸展刺激の条件下で、培養ヒト歯根膜線維芽細胞において、MAPK経路が活性化されることが示唆された。

また、歯周病原因子が添加された培養ヒト歯根膜線維芽細胞では、伸展刺激が加わると、相加的に炎症性サイトカイン産生の上昇がみられた。一軸方向の規則的なメカニカルストレスは細胞表面の構造的変化をもたらし、細胞内情報伝達系を介してIL-8などの炎症性サイトカイン産生を誘導することが示唆された。また、歯周病原因子は、物理的的刺激と共にこれら炎症性サイトカイン産生を増加し炎症反応に影響を与えているのではないかと考えられる。

#### 6. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

1. 八木孝和, 朝井康行, 川端淳司, 清水一郎, 北井則行, 小川知彦  
培養ヒト歯根膜線維芽細胞のメカニカルストレスに対する細胞内シグナル伝達系の検討 Investigation of intracellular signal transduction in human periodontal ligament fibroblasts exposed to cyclic strain. 歯科基礎医学会, 2008年

#### 7. 研究組織

##### (1) 研究代表者

八木 孝和 (YAGI TAKAKAZU)

朝日大学・歯学部 口腔構造機能発育学講座  
歯科矯正学分野・准教授

研究者番号: 10346166

##### (2) 研究分担者

北井 則行 (KITAI NORIYUKI)

朝日大学・歯学部 口腔構造機能発育学講座  
歯科矯正学分野・教授  
研究者番号：20271025

(3)連携研究者  
なし