

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20592404

研究課題名(和文)

ペリオスチンの機能解析—骨芽細胞及び歯根膜線維芽細胞における抗アポトーシス作用—

研究課題名(英文)

Functional analysis of periostin—anti-apoptotic action of periostin in osteoblasts and periodontal ligament cells

研究代表者

藤原 慎視 (FUJIHARA SHINJI) 徳島大学・病院・助教

研究者番号：70403706

研究成果の概要(和文)：

本研究は、骨芽細胞と歯根膜線維芽細胞のアポトーシスにおけるペリオスチンの果たす役割とそのシグナル伝達系について検討を行った。結果、低酸素によるアポトーシス誘導系により、歯根膜のアポトーシスにはペリオスチンが関連し、そのシグナル伝達にはFAK, JNK, ERK, P38, AKTなどが関連していることが示唆された。また、 β -cateninシグナル伝達系でも、ペリオスチンが関与し、種々の細胞における抗アポトーシス作用に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we examined the effect of periostin on the function of osteoblasts and periodontal ligament cells, such as apoptosis and the associated signal pathway. In the result, it is revealed that periostin is associated with the apoptosis of periodontal ligament cells by the hypoxia-induced system, and the signaling pathway including FAK, JNK, ERK, P38 and AKT. Additionally, in the signaling pathway of β -catenin, periostin might affect the anti-apoptotic action in various cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：矯正・小児系歯学

科研費の分科・細目：歯科矯正学

キーワード：歯学、ペリオスチン、アポトーシス、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療では歯に力学的刺激を負荷し、歯周組織の改造を誘導することによって歯を移動させ、不正咬合の改善を図る。歯の移動時における圧迫側歯根膜では血管圧縮

による血流量の減少の結果、一時的な虚血により低栄養・低酸素状態に陥ることが知られている。一方我々は、歯根膜や骨膜に発現するペリオスチンがメカニカルストレスに応答し、圧迫側歯根膜にて発現が高まることを

見いだした (Wilde J, Cell Tissue Res, 312, 345-51, 2003)。ペリオスチンは、骨芽細胞の接着・分化に関与することが知られている。ペリオスチンノックアウトマウスの研究により、力学的刺激負荷時における歯根膜及び歯槽骨の恒常性維持に非常に重要な役割を担っていることが示唆された (Rios H, Mol Cell Biol, 25, 11131-41, 2005)。さらに近年、ペリオスチンが腫瘍細胞において血清欠乏及び低酸素にて誘導されたアポトーシスに対しインテグリン受容体・PI3K/Akt シグナル伝達系を介した抑制作用を示すこと (Bao S, Cancer Cell, 5, 329-39, 2004)、心筋細胞においては増殖効果を示すことが報告された (Kuhn B, Nature Medicine, 13, 962-969, 2007)。インテグリン受容体によるシグナル伝達は、種々の細胞生存・増殖に重要な働きを担っている。Unloading では、インテグリンを介したシグナル伝達の不活性化により Bcl-2 の低下が認められ、骨芽細胞及び骨細胞のアポトーシスが生じている (Defour C, Exp Cell Res, 313, 394-403, 2007)。力学的刺激に応答して誘導されたペリオスチンは骨芽細胞、歯根膜線維芽細胞のインテグリン受容体を活性化、抗アポトーシスシグナルを伝達し、これら細胞の生存・増殖を促進することによって歯周組織のリモデリングにおいても重要な役割を担っている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞・歯根膜線維芽細胞のアポトーシスにおけるペリオスチンの果たす役割とそのシグナル伝達系について明らかにし、歯周組織リモデリングのメカニズムをより明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

- ①骨芽細胞のアポトーシスにおけるペリオスチンの役割を検討するため、MC3T3-E1 細胞を用いた serum starvation によるアポトーシス誘導実験系において、リコンビナントペリオスチン蛋白の添加による影響を、MTT アッセイにて検討した。
- ②①と同様のアポトーシス誘導実験系において、細胞接着機構を介した抗アポトーシスに関連する蛋白である FAK の発現量を、ウェスタンブロット分析にて検討した。
- ③低酸素によるアポトーシス誘導系として、Deferoxamine (DFO) 100 μ M を添加した培地にて歯根膜細胞を培養し、経時的なペリオスチンの発現を、ウェスタンブロット分析にて検討した。
- ④低酸素環境下におけるペリオスチンによる各シグナル分子、FAK, JNK, ERK, P38, AKT

のリン酸化の経時的な変化検討するため、DFO (100 μ M) を添加した培地に recombinant ペリオスチン (1 μ g/ml) を加え、ウェスタンブロット分析にて検討した。

⑤種々の細胞において、抗アポトーシス作用を示す β -catenin シグナル伝達系の活性化について検討した。

4. 研究成果

①Serum starvation 下ではコントロールに対して生細胞数が 25%まで減少したが、positive control として使用した IGF-I とリコンビナントペリオスチンを添加した群では同程度に増加しており、ペリオスチンが細胞のアポトーシス抑制に効果があることが示唆された。

②リコンビナントペリオスチン蛋白の添加群において、serum starvation 状態と比較して、約 4 倍まで増加しており、ペリオスチンが細胞の抗アポトーシスに影響を及ぼすことが示唆された。

③DFO 添加後 2 4 時間以降に、ペリオスチンの増加が認められた。

④ペリオスチン添加後 30 分以降には、リン酸化された JNK, ERK, P38, AKT の経時的な発現上昇が認められた。

これら③④の結果から、歯根膜のアポトーシスにはペリオスチンが関連し、そのシグナル伝達には FAK, JNK, ERK, P38, AKT などが関連していることが示唆された。

⑤ペリオスチン添加培地に歯根膜線維芽細胞を培養した場合、ウェスタンブロット分析により、 β -catenin が上昇し、ペリオスチン発現抑制下では β -catenin の発現抑制が認められた。また、通常培地にて歯根膜線維芽細胞にペリオスチンを添加 (1 μ g/ml) した場合には、経時的に β -catenin タンパク出現が上昇することが確認できた。

これらのことから、ペリオスチンが β -catenin のシグナル伝達系に関与し、種々の細胞における抗アポトーシス作用に影響を及ぼすことが明らかとなった。

これらの研究成果については、現在結果をまとめ、国際論文に投稿中である。

5. 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Tatsuya Nakamura, Shinji Fujihara, Tomoko Katsura, Kumiko Yamamoto, Toshihiro Inubushi, Kotaro Tanimoto, Eiji Tanaka: Effects of Low-Intensity

Pulsed Ultrasound on the Expression and Activity of Hyaluronan Synthase and Hyaluronidase in IL-1 β -Stimulated Synovial Cells, Ann Biomed Eng. 38(11):3363-3370 2010 査読有

- ② Yukiko Kitase, Masahiko Yokozeki, Shinji Fujihara, Takashi Izawa, Shingo Kuroda, Kotaro Tanimoto, Keiji Moriyama, Eiji Tanaka: Analysis of gene expression profiles in human periodontal ligament cells under hypoxia: The protective effect of monocyte chemoattractant protein-1 to oxygen shortage, Archives of Oral Biology, 54(7), 618-624, 2009 査読有
- ③ Shinya Horiuchi, Kenzo Asaoka and Eiji Tanaka : Development of a novel cement by conversion of hopeite in set zinc phosphate cement into biocompatible apatite, Bio-Medical Materials and Engineering, 19(2), 121-131, 2009 査読有
- ④ Shinya Horiuchi, Kazuyuki Kaneko, H Mori, Emi Kawakami, T Tsukahara, K Yamamoto, Kenichi Hamada, Kenzo Asaoka and Eiji Tanaka : Enamel bonding of self-etching and phosphoric acid-etching orthodontic adhesives in simulated clinical conditions: Debonding force and enamel surface, Dental Materials Journal, 28(4), 419-425, 2009 査読有
- ⑤ 藤原 慎視, 堀内 信也, 井澤 俊, 辻 けい子, 大庭 康雄, 森山 啓司, 田中 栄二 : エナメル質形成不全を伴う空隙歯列症例の一治験例, 中・四国矯正歯科学会雑誌, 20(1), 55-60, 2008 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① Shinji FUJIHARA, Tomoko KATSURA, Tatsuya, NAKAMURA, Kumiko NAGATA, Shinya HORIUCHI, Eiji TANAKA, The effect of low-intensity pulsed ultrasound on craniofacial bone healing, IADR 89th, 2011年3月16, 17,

18, 19日, San Diego, USA

- ② 藤原慎視, 桂智子, 中村竜也, 永田久美子, 堀内信也, 田中栄二, 低出力超音波パルスを用いた顎顔面領域の骨治癒促進効果の検討, 第69回日本矯正歯科学会大会, 2010年9月27, 28, 29日, 横浜
- ③ 中村 竜也, 藤原 慎視, 永田 久美子, 堀内 信也, 谷本 幸太郎, 田中 栄二 : 低出力超音波が炎症状態下の関節滑膜に及ぼす影響の検討, 第23回日本顎関節学会総会・学術大会 2010年7月24, 25日, 東京
- ④ Tepei Watanabe, Akihiro Yasue, Shinji Fujihara, Eiji Tanaka, Periostin Up-regulates MMPs via ERK pathway in Periodontal Ligament Cells, IADR 88th, 2010年6月14, 15, 16, 17日, Barcelona, Spain
- ⑤ 中村竜也, 藤原慎視, 泰江章博, 桂智子, 犬伏俊博, 谷本幸太郎, 田中栄二 : 低出力超音波は炎症存在下の滑膜細胞のCOX-2 発現を抑制する, 第68回日本矯正歯科学会大会, 2009年11月16, 17, 18日, 福岡
- ⑥ 渡邊哲平, 泰江章博, 藤原慎視, 田中栄二 : Periostin Negatively Regulates Osteoblastic Differentiation in Human Periodontal Ligament Cells, 2nd Meeting of IADR PAPF/ 1st Meeting of IADR APR, 2009年9月22, 23, 24日, 中国, 武漢
- ⑦ Shinya Horiuchi, Kenzo Asaoka, Takashi Izawa, Shinji Fujihara, Nao Kinouchi, Shingo Kuroda, Eiji Tanaka : Development of novel bioceramic by modification of zinc phosphate cement, 87th IADR, 2009年4月1, 2, 3, 4日, Miami, Florida, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 慎視 (FUJIHARA SHINJI)

(徳島大学・病院・助教)

研究者番号：70403706

(H21 研究分担者→H21 年 9 月研究代表者)

北瀬 由紀子 (KITASE YUKIKO)

(徳島大学・病院・助教)

研究者番号：70363166

(H21)

(2) 研究分担者

堀内 信也 (HORIUCHI SHINYA)

(徳島大学・病院・助教)

研究者番号：70263813

井澤 俊 (IZAWA TAKASHI)

(徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教)

研究者番号：30380017

(H20, H21→H22 連携研究者)

(3) 連携研究者