

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20791597

研究課題名（和文） 歯根膜細胞のメカニカルストレスによるペリオスチン遺伝子発現のシグナル伝達の解明

研究課題名（英文） Analysis of signaling pathway of periostin gene expression by mechanical stress on periodontal ligament cells.

研究代表者

白川 哲（SHIRAKAWA SATOSHI）

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50460176

研究成果の概要（和文）：ヒト歯根膜由来細胞は Rho kinase の抑制剤である Y27632 を加えることで ALP 活性や石灰化能は抑制された。また、メカニカルストレス存在下では Y27632 添加した群ではメカニカルストレスを加えないコントロール群に比べ ALP 活性は抑制された。これらのことから、以前の研究結果を加味するとペリオスチン遺伝子発現の上昇と線維芽細胞様細胞への分化促進が期待でき、より詳細な検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：The alkaline phosphatase activity and the ability of mineralization on the human periodontal ligament (HPDL) cells was suppressed by Y27632, that is Rho kinase inhibitor. Additionally, the groups that is added Y27632 with mechanical stress was suppresser than that without mechanical stress. In consideration of the precious research, these results show mechanical stress and Y27632 may more upregulate periostin gene expression and more accelerate the differentiation of fibroblastic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合 計       |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2009年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総 計    | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |

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：顎口腔機能機構学、メカニカルストレス

## 1. 研究開始当初の背景

歯根膜組織は硬組織に囲まれるがそれ自身は石灰化することはない。一方、歯根膜の細胞は骨原性がある。この矛盾に関わるメカニズムには不明な点が多い。

歯根膜組織の主要有機質成分である I 型コラーゲンの形成には細胞外マトリックス

の periostin（ペリオスチン）が関与し、歯根膜の非石灰化メ 2,100,000 カニズムを解明する糸口になると考えられる。本来、歯根膜は機械的刺激に曝されており、歯根膜細胞を用いた場合も同様の条件下で研究されることが望ましい。報告者の研究結果では、ペリオスチンの遺伝子発現は周期的伸展力によ

るメカニカルストレスに対し増強した（白川哲 ヒト歯根膜由来細胞の分化に与える周期的伸展力の影響 日本歯周病学会会誌 48 巻 2 号;113-122, 2006）。また、ペリオスチンはインテグリンを介した Rho kinase および PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) のシグナル伝達を通じてその発現が高まると報告されている。しかしながら、歯根膜細胞を用い、且つ動的条件下における詳細な検討は加えられていない。

## 2. 研究の目的

本研究ではメカニカルストレスがかかる環境を擬似的に可能とした培養システムである FLEXERCELL を用い、

(1) ヒト歯根膜由来細胞にメカニカルストレスを与え、Rho kinase のインヒビターである Y-27632、PI3K のインヒビターである LY294002 を用い遮断し、歯根膜細胞の応答性を確認する、

(2) Rho kinase および PI3K が歯根膜細胞の periostin 遺伝子発現のシグナル伝達経路に与える影響を確認する。

(3) 基礎的データを静置培養条件下で得る。

(4) 本来歯根膜は石灰化を起こさない恒常的な組織であり、その組織由来の細胞に強制的な石灰化を起こさせ、その条件下の細胞動態を調べることで逆説的に歯根膜がなぜ石灰化を起こさない組織であるかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 静置培養条件下での assay

矯正学的原因から便宜的に抜歯を必要とし、本研究の趣旨を説明し同意の得られた患者より歯を提供してもらい、そこから得た歯根膜由来細胞を 3～4 継代し研究に用いた。

下記条件下で、

- ① ALP assay (5, 10days)
- ② ALP staining (15days)
- ③ Alizarin red S staining (20days)
- ④ Ca contents (mineralization assay) (20day)を行った。

|           |       |        |
|-----------|-------|--------|
| 普通培地 (SM) | SM+Y  | SM+LY  |
| 石灰化 SM    | 石灰化 Y | 石灰化 LY |

SM : supplement medium ( $\alpha$ -MEM+10%FBS+2%Pn-St)、石灰化 SM (石灰化) : differentiation medium (SM+50  $\mu$ M ascorbic acid, 10mM,  $\beta$ -glycerophosphate,  $10^{-8}$ M  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (活性型ビタミン D<sub>3</sub>)) Y27632 (Y) : Y-27632 ( $10^{-6}$ M) LY294002 (LY) : LY294002 ( $10^{-6}$ M)

(2) メカニカルストレス条件下で assay  
Lonza 社から販売しているヒト正常歯周組織線維芽細胞 (HPD1F) を購入し、下記の培養

条件下で培養し、さらにメカニカルストレス (細胞伸展率 10%, 6 回/分) を加えた。メカニカルストレスを与えてから 5, 10 日目で ALP assay を行った。

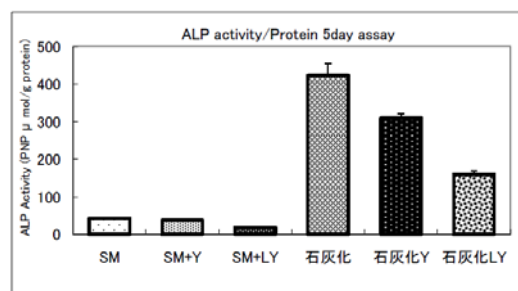
|        |       |        |
|--------|-------|--------|
| SM     | SM+Y  | SM+LY  |
| 石灰化 SM | 石灰化 Y | 石灰化 LY |

SM : supplement medium ( $\alpha$ -MEM+10%FBS+2%Pn-St)、石灰化 SM (石灰化) : differentiation medium (SM+50  $\mu$ M ascorbic acid, 10mM,  $\beta$ -glycerophosphate,  $10^{-8}$ M  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (活性型ビタミン D<sub>3</sub>)) Y27632 (Y) : Y-27632 ( $10^{-6}$ M) LY294002 (LY) : LY294002 ( $10^{-6}$ M)

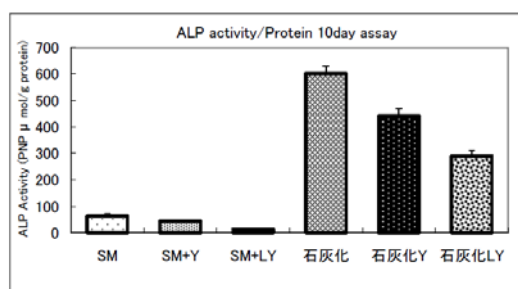
## 4. 研究成果

(1)-① ALP assay

培養 5 および 10 日において、普通培地に比べ石灰化誘導を行った群は著名な ALP 活性の上昇が認められるとともに、石灰化誘導培地 > 石灰化誘導培地+Y27632 添加群 > 石灰化誘導培地+LY294002 添加群の順で ALP 活性値に差が認められた (図 1、2)。



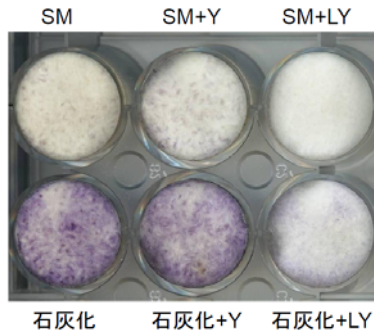
～図 1～



～図 2～

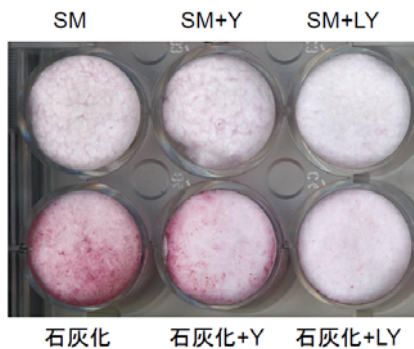
(1)-② ALP staining

培養 20 日目において、普通培地群間および石灰化誘導培地群間ではそれぞれ LY294002 添加群の染色が弱かった。また、普通培地 > 普通培地+Y27632、ならびに石灰化誘導培地 > 石灰化誘導培地+Y27632 添加群で濃染した (図 3)。



～図 3～

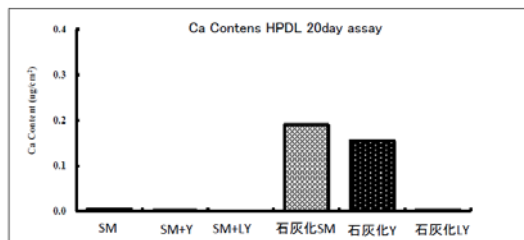
(1)-③ Alizarin red S staining  
培養 20 日目において石灰化誘導培地ならびに石灰化誘導培地+Y27632 添加群において濃染が認められた (図 4)。



～図 4～

(1)-④ Ca contents

培養 20 日目において、カルシウム沈着量を測定したところ、石灰化誘導培地ならびに石灰化誘導培地+Y27632 添加群において顕著な Ca 沈着が認められた (図 5)。

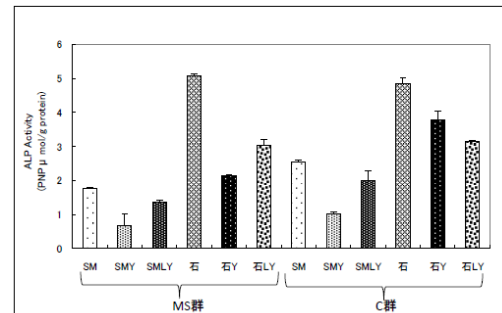


～図 5～

(2) メカニカルストレス条件下での assay

コントロール群 (C 群) とメカニカルストレス群 (MS 群) 間では全体的に大きく差は認められなかったが、MS を加えることで ALP 活性はより低かった。また、同培養条件・同添加物間においても大きな差は認められなかつ

た。しかしながら、石灰化誘導培地+Y27632 添加群では MS を与えることで大きくその活性値は低値示した (図 6)。



～図 6～

(3) 研究成果のまとめ

Y27632 は細胞の未分化性を維持しつつ、細胞増殖を促すと報告されている。ALP 活性の測定ではタンパク質量を計測したが、タンパク質量は Y27632 を添加することで普通培地においても、石灰化誘導培地においても、他の培地に比べ多かった (データ非公開)。また、プレ実験 (MTS assay) においても、同様に細胞増殖率は他の培地に比べ高かった。(データ非公開)。

ALP 活性単独の測定では普通培地ならびに石灰化誘導培地と同等の活性値を示した (データ非公開)。これらのことから、最終的な ALP/Protein で得られた値は普通培地ならびに石灰化誘導培地の値に比べ低くなった。

以上のことから、Y27632 は歯根膜細胞の増殖は促進的に働く一方で、骨原性の分化を抑制している可能性が考えられた。

この推論を裏打ちするかのように、培養 20 日目で石灰化物の形成能を調べたところ、アリザリン染色では染色像は示すもののその程度は低く、またカルシウム沈着量の測定においても低かった。

また、メカニカルストレス存在下で ALP 活性を調べたところ、ALP 活性はメカニカルストレス非存在下のコントロール群に比べ低下を示した。これは Y27632 の作用をメカニカルストレスが増強したためであると考えられた。

報告者の以前の研究結果では、普通培地においてメカニカルストレスを歯根膜細胞に与えることで、ALP 活性は低下し、ペリオスチン遺伝子発現は上昇すると報告している。今回の研究では遺伝子発現に関する研究は今だなされていないが、Y27632 添加普通培地で培養した歯根膜細胞にメカニカルストレスを加えることで、よりペリオスチン遺伝子発現上昇が誘導されることが期待でき、さらなる研究が今後必要であると考えられる。

LY294002 は細胞生存に関わると云われている。タンパク質量と細胞増殖率を調べたところそれぞれコントロールである普通培地ならびに石灰化誘導培地に比べその値は低かった。ALP 活性そのものは高く、そのため、ALP/タンパク質量で換算すると、ある一定の値を見せた。

しかしながら、培養 20 日目では細胞が培養皿から浮き上がる様子も観察され（データ非公開）、ALP 染色にも当然のことながら染色程度は明瞭に観察することはできなかった。

また、アリザリン染色ならびにカルシウム沈着量を測定したところ石灰化物の形成は石灰化誘導をかけたにもかかわらず、ほとんど見いだせなかった。

これらのことから、LY294002 は細胞増殖を抑制してしまうため、短期においては ALP 活性を著しくは抑制しないものの、長期においては細胞生存そのものを抑止し、骨芽細胞様細胞までの分化に至らないことが考えられた。

また、LY294002 を添加しメカニカルストレスを与えても ALP 活性に変動がみられず、Y27632 と比べ一定の効果を確認することはできなかった。

以上のことより LY294002 添加に対する考慮点は、今回本研究で使用した濃度は文献等を参考にした値ではあったが、①濃度決定を行うさらなる基礎実験が必要である一方で、②メカニカルストレスに対する反応性が乏しいため、あまり良好な結果が得られないのではないかと、ということであった。

今後は、歯根膜細胞が動的環境下で Y27632 すなわち Rho キナーゼ抑制に対する反応性を普通培地ならびに石灰化誘導培地を用い、線維芽細胞あるいは骨芽細胞への分化をペリオスチン遺伝子発現や石灰化能を中心として検討することになると考えられる。

## 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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白川 哲 (SHIRAKAWA SATOSHI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50460176