

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21689053
 研究課題名（和文）ユビキチン化システムに基づいた歯周組織幹細胞のサイトカインシグナルクロストーク
 研究課題名（英文）Ubiquitin-proteasome system regulates cytokine signal crosstalk in periodontal stem cells
 研究代表者
 山下 元三（YAMASHITA MOTOZO）
 大阪大学・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：90524984

研究成果の概要（和文）：歯周組織再生の中心となる歯周組織幹細胞に対して、歯周組織の創傷治癒や再生に関わるサイトカイン群を作用させた際に繰り広げられる細胞内シグナルのクロストークについて検討した。小分子化合物である TGF- β I 型受容体阻害剤処理を用いた実験システムにより、TGF- β は成熟した硬組織形成細胞からの基質産生のみならず、BMP2 刺激により誘導される歯根膜細胞の硬組織形成細胞へのコミットメントを制御していることを見出した。DNA マイクロアレイによる全遺伝子網羅解析により、E3 ユビキチンリガーゼである *Smurf1* と *Ski, Smad7* が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化にとり重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the cross talk mechanism of intracellular signaling induced by multiple growth factors in periodontal stem cells. We found TGF- β was crucial for commitment to pre-osteoblast lineage from periodontal ligament cells and ECM production in the presence of BMP2. DNA chip analysis revealed the *Smurfs*, *Ski* and *Smad7*, ubiquitin-proteasome system related genes, as the key determinants for cytodifferentiation to the calcified nodule forming cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周系治療学

キーワード：歯学、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

次世代の再生医療を支える方向性の一つとして、シグナル分子の臨床応用が考えられる。米国においては [PDGF + β -Tricalcium phosphate (β -TCP)] と [BMP-2 + collagen sponge] が各々、歯周組織、歯槽骨再生用の device として市場に現れている。国内にあっては、申請者の所属するグループを中心に塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) の歯周組

織再生誘導能について検討が積み重ねられており、臨床試験の結果から、ヒトへの有効性が示唆されている。

これらの試みは全て、単独のリコンビナントサイトカインを再生医療に応用しようとするものである。しかしながら *in vivo* の生体応答を考えたときこのような単一のサイトカイン活性化機構が作用することは極めてまれであり、通常は種々のサイトカインが

時空的に制御された状態で作用し、それらサイトカインの協調作用により *in vivo* で最大の効果をあげているものと考えられる。そのため、現在の「サイトカイン療法」のさらに次世代を担う、“超”サイトカイン療法を開発するためには歯周組織幹細胞内におけるサイトカイン刺激のクロストーク機構の分子基盤を解明することが必要である。

歯周組織の再生過程においては、FGF familyに加えて、歯周組織の初期発生、恒常性の維持、組織修復の過程において重要な TGF- β super family 蛋白 (TGF- β , BMPs, アクチビン) や Wnt, PDGF, VEGF などの様々な生理活性を有したサイトカイン刺激やストレス刺激が相互に作用する。

そこで、対象となる幹細胞個体へ単一のサイトカイン刺激によるシングルヒット (刺激) ではなく多数のサイトカインによるマルチヒット (刺激) を次々と並列的に伝達するのみならず、それらのシグナル伝達系が細胞内で横断的にクロストークをさせることができれば、各々のサイトカインシグナルを効率よく増幅できるものと考えられる。そうすることにより、FGF2 を基軸とした歯周組織再生過程で機能するサイトカインを最小限必要な生理的濃度で配合しカクテルとするだけで最大限の組織再生の誘導を有するサイトカインカクテル療法を、‘Super Cytokine Cocktail Therapy(SCCT)’ を樹立できるものと思われる。

2. 研究の目的

歯周組織再生部位においていかなる細胞内分子機構により未分化間葉系幹細胞における増殖から分化へとスイッチの切り替えがおこるのか、また、同じ組織に作用する様々なサイトカイン刺激が、いかなる機構により欠損部位の組織修復を制御する基質産生や細胞遊走を惹起するシグナル系へと統合されていくのか未だ不明である。組織再生の中心となる歯周組織幹細胞に対して、歯周組織の創傷治癒や再生に関わるサイトカインを作用させた際に繰り広げられる細胞内シグナルのクロストーク機構を蛋白質の量や質の修飾機構に基づいて分子レベルで明らかにする。本研究は、‘Super Cytokine Cocktail Therapy(SCCT)’ の樹立にむけての、分子基盤情報を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

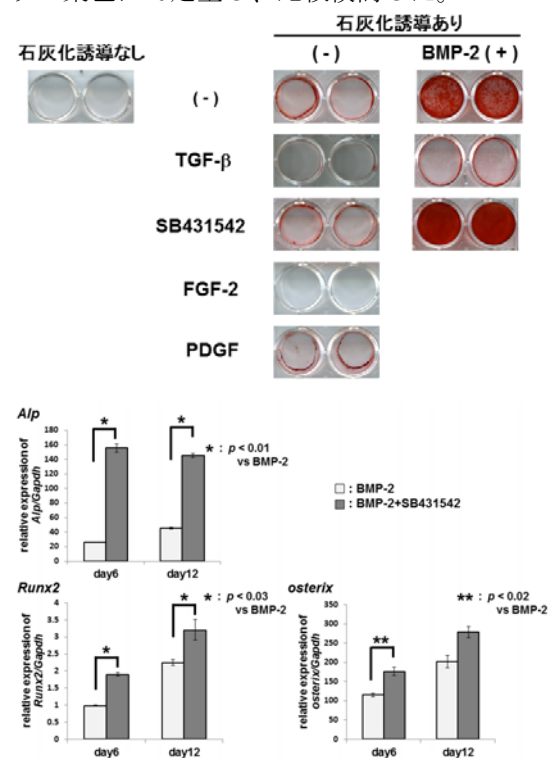
マウス歯根膜細胞(MPDL22)およびヒト歯根膜細胞(HPDL)の *in vitro* 細胞培養系を樹立、実験に供した。FGF2 を基軸として、歯周組織の恒常性の維持に必要であり初期発生時や、創傷治癒時に発現しているサイトカインである、TGF- β , BMP2, Wnt3a, IGF, VEGF を濃度、添加時期を変え添加し、細胞増殖能、分化能、特に硬組織形成性能について蛋白レベル、遺伝子レベルで解析を行った。その際に、TGF- β の阻害剤である小分子化学物 SB43152 を培養系に添加し用いることにより内在性刺激の遮断状態を構築し解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯根膜細胞の石灰化物形成および骨芽

細胞分化遺伝子の発現に及ぼす TGF- β の影響

SB431542 存在・非存在下において歯周組織に発現している代表的なサイトカインである BMP-2、FGF-2、TGF- β 、PDGF-BB を石灰化誘導培地へ添加し、MPDL22 の長期培養を行い、形成された石灰化物の量をアリザリン染色にて定量し、比較検討した。

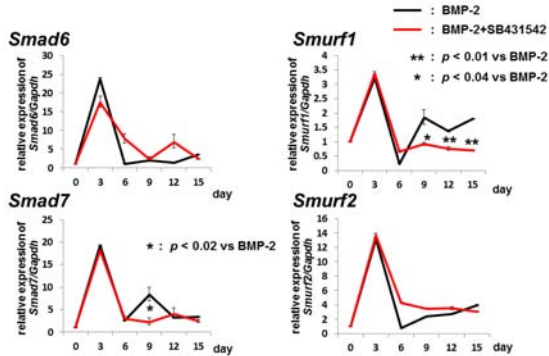


TGF- β 添加により抑制され、SB431542 添加により著しく増強された。興味深いことに SB431542 単独添加による内在性 TGF- β シグナルの遮断のみでは石灰化物形成の変化を認めなかった。TGF- β I 型受容体阻害剤処理による BMP-2 誘導性の石灰化物形成の分子機構を明らかにするため、長期培養系における骨芽細胞分化遺伝子について経時的な発現のモニタリングを行った。その結果、硬組織形成細胞の代表的なマーカーである *Alp*、*Runx2* および *osterix* の発現は BMP-2 の添加により day3 をピークとして発現が誘導されるが、SB431542 処理により発現の有意な増強を認めた。発現の増強は培養後期である day12 よりも培養前期である day6 において顕著であった。

(2) TGF- β にて誘導される細胞内シグナルのネガティブフィードバックに関わる遺伝子の発現変化

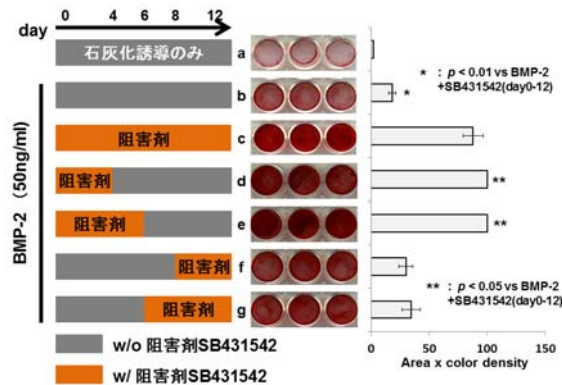
抑制性 Smad である Smad6/7 もしくは E3 ユビキチンリガーゼである Smurf1/2 は、TGF- β ならびに BMP-2 刺激により誘導され、受容体および Smad に対して抑制的に作用することで、BMP シグナル経路の負の制御因子となる。そこで MPDL22 の石灰化誘導時における *Smad6/7*、*Smurf1/2* の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて検討を行った。石灰化の後期における *Smad6* および *Smurf2* の発現は SB431542 処理による変化を認めなかったが、*Smad7* および *Smurf1*

の発現は同処理により低下が認められたことより TGF- β I 型受容体阻害剤処理による BMP-2 誘導性の石灰化物形成増強の分子機構の一つとして、石灰化後期におけるネガティブフィードバック因子の発現抑制が関与していることが示唆された。これは TGF- β が歯根膜細胞の石灰化過程において Smad7 および Smurf1 の発現を介して、BMP-2 シグナルを制御している可能性を示唆するものである。



(3) TGF- β による時期特異的な歯根膜細胞の石灰化制御機構

間葉系細胞は、その細胞系譜や分化の程度の違いにより異なる性質を有していることから、TGF- β が時期特異的な作用を歯根膜細胞の石灰化に対して有しているとの仮説を立てた。in vitro の培養系においては、歯根膜細胞は前駆骨芽様細胞、骨芽様細胞の順に段階的に成熟骨芽細胞様細胞へと分化すると考えられる。前期のみ、後期のみ、全培養期間に SB431542 を添加しその影響を検討した結果、前期に阻害剤処理を行った群 d、e が全培養期間に阻害剤を添加した c と比較してより効果的に石灰化物形成を増強した。後期に阻害剤処理を行った群 f、g は c と比較して石灰化物形成が抑制された。

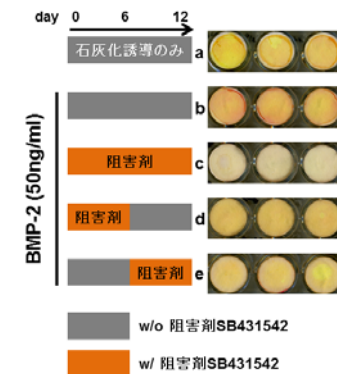


MPDL22 の in vitro 培養系において阻害剤は石灰化前期に強く影響を示したことから、TGF- β は石灰化初期において BMP-2 の作用に拮抗的に作用し、後期においては石灰化の成熟誘導にとって重要である可能性が示唆された。

(4) TGF- β I 型受容体阻害剤が歯根膜細胞のコラーゲン蓄積に及ぼす影響

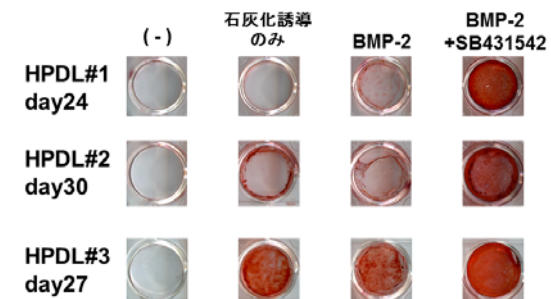
歯根膜細胞の石灰化においては I 型コラーゲンをはじめとする ECM 蛋白の産生ならびに Ca や PO₄ の沈着が起こる。TGF- β はコラ

ーゲン産生を強力に誘導するサイトカインであることから、SB431542 を石灰化誘導培地中に添加し、コラーゲン蓄積に与える影響を van Gieson 染色にて検討した。その結果、阻害剤処理によりコラーゲン蓄積の抑制が見られたことより、石灰化の前期に阻害剤処理を行うことで BMP-2 に誘導される石灰化物形成は増強する一方、後期の阻害剤処理においては石灰化を増強せず抑制したと考えられる。以上より、TGF- β は歯根膜細胞の BMP-2 に誘導される石灰化過程において、その初期には抑制的に作用するが、石灰化の成熟過程にとっては必要であることが示唆された。



(5) TGF- β I 型受容体阻害剤がヒト歯根膜細胞の石灰化物形成に及ぼす影響

TGF- β I 型受容体阻害剤処理が BMP-2 誘導性のヒト歯根膜細胞による石灰化物形成に及ぼす影響について検討した。実験には 3 種類の異なる初代培養ヒト歯根膜細胞株を用いた。いずれの細胞株も 24~30 日間にわたる長期培養を行うことで、石灰化物の形成を認め、BMP-2 の添加により石灰化物形成の増強が認められ、MPDL22 と同様に SB431542 処理による BMP-2 誘導性の石灰化物形成の増強が認められた (図 11)。これらより、内在性の TGF- β シグナルが BMP-2 誘導性の石灰化物形成を抑制する機構が齧歯類の歯根膜細胞のみならず、ヒト歯根膜細胞においても機能していることが確認された。すなわちヒト歯根膜細胞においても TGF- β I 型受容体阻害剤による石灰化の制御が可能であることが示唆された。



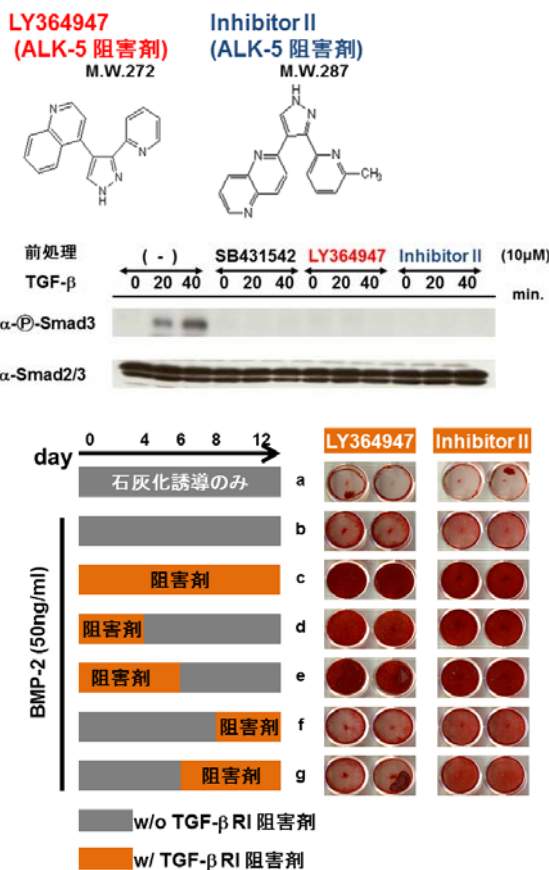
(6) 異なる TGF- β I 型受容体阻害剤が歯根膜細胞の石灰化物形成に及ぼす影響

ここまでの実験で用いた TGF- β I 型受容体

阻害剤 SB431542 は Smad2/3 の活性化を誘導する ALK-4, 5, 7 キナーゼ活性を特異的に抑制する。これ以外にも、現在様々な TGF- β I 型受容体阻害剤が見出されており、LY364947 と Inhibitor II は共に TGF- β I 型受容体である ALK-5 の阻害剤として機能するが、その化学構造は異なる TGF- β I 型受容体阻害剤である。そこで LY364947 と Inhibitor II の影響を SB431542 と同様に検討したところ、共に MPDL22 において TGF- β にて誘導される Smad3 のリン酸化を抑制し、BMP-2 に誘導される石灰化物形成を 4 倍以上に増強した。

前期、後期、培養期間中全体と時期を変えてこれらの阻害剤を添加し、その影響をアリザリン染色を用いて検討した結果、前期に阻害剤処理を行った群 d, e が効果的に石灰化物形成を増強する一方、後期に阻害剤処理を行った群 f, g では石灰化物形成の増強はみられなかった。

このことから ALK-5 により伝達される細胞内の TGF- β シグナルが BMP-2 に誘導される石灰化物形成を抑制していることが強く示唆された。すなわち、SB431542 処理による BMP-2 誘導性の石灰化物形成の増強が歯根膜細胞自身の産生する TGF- β の作用阻害によるものであることが確認された。

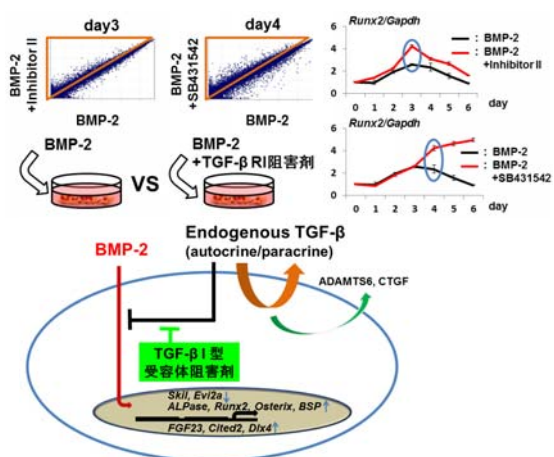


(7) 石灰化初期の MPDL22 における遺伝子発現プロファイル

MPDL22 の石灰化過程の初期における遺伝子発現プロファイルを詳細に検討するため、DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行った。石灰化初期の培養 day3, day4 に

おける遺伝子発現について、BMP-2 単独添加群と BMP-2 に加え阻害剤を添加した群の間で比較を行うことで阻害剤処理によって誘導される遺伝子の発現パターンを抽出した。阻害剤に関しては SB431542 と Inhibitor II の 2 種類を用いた。マイクロアレイに供するサンプルの抽出に当たっては、石灰化誘導培養時における *Runx2* の発現を経時的にモニタリングし、*Runx2* 発現強度比 (BMP-2 vs 阻害剤+BMP-2) が BMP-2 単独添加群に比べ BMP-2 に加え阻害剤を添加した群で差異が大きくなる培養 day3, day4 のサンプルを試料として DNA マイクロアレイ解析を行った。day3, day4 双方で発現上昇した遺伝子 622 個と、双方で発現低下した遺伝子 217 個に着目し、検討を行った。IPA ソフトウェアを用いた機能分類の結果、発現上昇した遺伝子群においては Tissue Development を始めとする組織レベルの分化に関与する遺伝子群が多く認められ、発現低下した遺伝子群においては Cellular Growth and Proliferation を始めとする細胞の増殖に関与する遺伝子群に多く認められた。発現上昇群には *Wnt* や *Vegf*, *Igf*, *Fgf* といった硬組織形成に関わる増殖因子に加え、*Id4* を始めとした転写因子が含まれ、発現低下群には *PAI-1* や *Adamts* といった TGF- β により誘導される標的遺伝子群に加え、BMP corepressor である *Evi2a* や *Skil* が含まれていた。

次に real-time PCR 法を用いて、遺伝子発現量を検討したところ、発現上昇群においては、TGF- β シグナルや BMP シグナルを調節することで骨代謝を制御する *Fgf23*, *Cited2*, *Dlx4* が阻害剤処理により発現上昇することが確認された。また発現低下群においては *Skil* および *Evi2a* が阻害剤処理により発現低下することが確認された。



以上の結果より、TGF- β I 型受容体阻害剤を時期特異的に添加すること、ならびにサイトカインと SB431542 といった小分子化合物との併用療法により、歯周組織の治癒期間の短縮促進や、より成熟した再生組織の獲得が期待できることが強く示唆された。

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 2 件)

- ① Blank M, Tang Y, Yamashita M, Burkett SS, Cheng SY, Zhang YE, A tumor suppressor function of Smurf2 associated with controlling chromatin landscape and genome stability through RNF20. Nat Med. (査読あり) 2012 Jan 8;18(2):227-234.
- ② Tang LY, Yamashita M, Coussens NP, Tang Y, Wang X, Li C, Deng CX, Cheng SY, Zhang YE. Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF- β signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. EMBO J. (査読あり) 2011 Nov 1;30(23):4777-4789.

〔学会発表〕 (計 13 件)

- ① T. KAWAHARA, M. YAMASHITA, and S. MURAKAMI, Ossification of periodontal ligament cells induced by TGF- β type I receptor inhibitor, Osaka International Symposium "Current Topics on Frontier Oral Science, November 24, 2011, Osaka
- ② 中村友美, 山下元三, 河原貴展, 橋本悠平, 梶川哲宏, 森 健太, 前田 憲一郎, 北垣次郎太, 柳田 学, 山田 聡, 北村正博, 村上伸也, SIRT1による歯根膜細胞の石灰化制御, 日本歯科保存学会2011年度秋季学術大会 (第135回), 2011年10月21日, 大阪
- ③ T. KAWAHARA, M. YAMASHITA, T. Nakamura, T. KAJIKAWA, S. YAMADA, M. KITAMURA and S. MURAKAMI, Dual mode of TGF- β function in periodontal ligament cell calcification, The 59th Annual Meeting of Japanese Association of Dental Research, Oct9, 2011, Hiroshima
- ④ 山下元三, 河原貴展, 橋本悠平, 中村友美, 梶川哲宏, 森 健太, 前田憲一郎, 北垣次郎太, 柳田 学, 山田 聡, 北村正博, 村上伸也, 歯根膜細胞においてFGF-2はWnt依存性にBMPシグナルを制御する, 日本歯科保存学会2011年度春季学術大会 (第134回), 2011年6月10日, 東京
- ⑤ 河原貴展, 山下元三, 橋本 悠平, 中村 友美, 梶川 哲宏, 前田 憲一郎, 北垣 次郎太, 山田 聡, 北村 正博, 村上 伸也, Endogenous TGF- β downregulates mineralization of periodontal ligament cells in vitro, 第32回 日本炎症・再生医学会, 2011年6月3日, 京都
- ⑥ 中村友美, 山下元三, 河原貴展, 橋本 悠平, 梶川 哲宏, 山田 聡, 北垣 次郎太, 前田 憲一郎, 北村 正博, 村上 伸也, 歯根膜細胞におけるオートファジーの役

割, 第54回春季日本歯周病学会学術大会, 2011年5月28日, 福岡

- ⑦ Y. HASHIMOTO, M. YAMASHITA, T. KAWAHARA, T. NAKAMURA, T. KAJIKAWA, S. YAMADA, T. NOZAKI, M. KITAMURA, and S. MURAKAMI
Post-transcriptional control of BMP-signaling by FGF-2 in periodontal ligament cells, 89th General Session & Exhibition of the IADR, March 19, 2011, San Diego, CA
- ⑧ T. KAWAHARA, M. YAMASHITA, Y. HASHIMOTO, T. NAKAMURA, T. KAJIKAWA, S. YAMADA, M. KITAMURA, and S. MURAKAMI, Endogenous TGF- β downregulates mineralization of periodontal ligament cells in vitro 89th General Session & Exhibition of the IADR, March 18, 2011, San Diego, CA
- ⑨ T. Kawahara and M. YAMASHITA
FGF-2-MAPK signal pathway suppresses BMP signaling axis in periodontal ligament cells, Osaka-Chulalongkorn-Mahidol Joint Symposium, "Current topics on Oral Science" November 26, 2010, Osaka
- ⑩ T. KAWAHARA, M. YAMASHITA, Y. HASHIMOTO, T. KAJIKAWA, S. YAMADA, M. KITAMURA, and S. MURAKAMI, TGF- β signaling regulates mineralization of periodontal ligament cells., The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology Oct30, 2010, Honolulu, Hawaii
- ⑪ 河原貴展, 山下元三, 橋本悠平, 梶川哲宏, 中村 友美, 前田憲一郎, 山田聡, 北村正博, 村上伸也, 歯根膜細胞においてFGF-2はMAPK依存性にBMPシグナルを抑制する, 第53回秋季日本歯周病学会学術大会, 2010年9月19日, 高松
- ⑫ 河原貴展, 山下元三, 梶川哲宏, 橋本悠平, 柳田 学, 山田 聡, 北村正博, 村上伸也, TGF- β I型受容体阻害剤による歯根膜細胞の石灰化制御, 日本歯科保存学会 2009年度秋季学術大会 (第131回), 2009年10月29日, 仙台
- ⑬ 河原貴展, 山下元三, 橋本悠平, 梶川哲宏, 前田憲一郎, 北垣次郎太, 山田聡, 北村正博, 村上伸也, FGF-2はMAPK依存性にBMPによるSmad1リン酸化を抑制する, 日本歯科保存学会 2010年度春季学術大会 (第132回) 2009年6月4日, 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 元三 (YAMASHITA MOTOZO)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90524984