

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 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592074

研究課題名（和文）歯根膜における力学的負荷とリゾリン脂質シグナルのクロストーク機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of a crosstalk signaling between mechanical stress and lyso-phospholipid signals in periodontal ligament

研究代表者

荒川 俊哉（ARAKAWA TOSHIYA）

北海道医療大学・歯学研究科・講師

研究者番号：40306254

研究成果の概要（和文）：

培養歯根膜細胞において、LPA1 および LPA6 の強い発現が認められた。LPA 合成酵素では Lyso-PLD の発現がみられたが PA-PLA_{1a} (LIPH) の発現は見られなかった。また、LPA 添加およびメカニカルストレスによって、ID1（転写因子）と EGR1（転写因子）の強い発現上昇が共に見られた。¹⁴C ラベルした基質を用いた実験の結果、LPA が歯根膜線維芽細胞内で合成されることが明らかになった。また LPA による細胞内シグナル経路は LPA1 および ERK を主に介していることが明らかになった。更にメカニカルストレスによって PC 代謝物が放出されることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

LPA1 and LPA6 of LPA receptors were highly expressed; autotaxin (lyso-PLD) was also highly expressed, however, PA-PLA_{1a} and PS-PLA₁ were not expressed. MS stimulated autotaxin mRNA in human PDL cells. ID1 (Inhibitor of DNA binding 1), EGR1 (Early growth response 1), SGK1 (Regulator of G-protein signaling 2) and DUSP1 (Dual specificity phosphatase 1) were upregulated in PDL cells. LPA produced from PDL cells was analyzed by Thin-Layer Chromatography using ¹⁴C-labeled palmitic acid and lysophosphatidylcholine. An enzyme for LPA synthesis, lyso-Phospholipase D (lyso-PLD) was induced by MS after 6h. ERK phosphorylation was determined by MS or LPA treatment at 10 min. LPA was synthesized by PDL cell with MS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯学、ストレス、脂質、シグナル伝達、歯根膜

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯が受ける力学的負荷に対してクッションとして働くと同時に、矯正治療の歯の移動において、力学的負荷を感知し歯槽骨の骨吸収や骨形成をコントロールするセンサー組織として重要な役割を担っていると考えられている。我々はこれまで歯根膜由来線維芽細胞に力学的負荷の一つである重力を負荷すると、ATP が放出された後、MAP キナーゼの一つである ERK がリン酸化され、さらに cyclooxygenase-2 (COX-2) が誘導される事を明らかにした(投稿準備中)。このERKのリン酸化とCOX-2の誘導は単に ATP の添加だけでは完全に力学的負荷のシグナルをミミックすることが出来ず、他のシグナルによるクロストークの存在が示唆された。こうした現象は骨芽細胞にも見られ、力学的負荷の複雑なシグナル応答の存在をさらに強く示唆するものであった。これまで力学的負荷による他のシグナル経路としては、ATP 経路以外に、voltage-sensitive Ca²⁺ channel (VSCC) や Volume sensitive Ca²⁺ channel (MSCC) のCa²⁺ 流入に依存するシグナル経路(第2の経路)、細胞骨格を認識するアクチンを介する経路(第3の経路)、または細胞接着を認識するインテグリン/FSKなどの経路(第4の経路)がそのシグナル経路として報告されてきた。しかし力学的負荷が誘導する膜リン脂質系シグナルの関与についての研究報告はなされて来なかった。細胞は脂質2重層で覆われており、外層はフォスファチジルコリン(PC)が豊富で極性がある。また細胞膜のリン脂質は rotational diffusion (回転拡散) や motility division (運動分配) などによってダイナミックに動いており、外側からの力を容易に受容する。リゾリン脂質の代表であるリゾホスファチジン酸(LPA)は、最近様々な生理機能(体毛形成、血管形成、脂肪細胞の分化、神経系の発達など)に関与していることが明らかになってきており、第2の脂質メディエーターとして注目されている(井上飛鳥、青木淳賢、実験医学, 2059-2067, 2009)。LPAはPCからホスホリパーゼ A₁ および A₂、ホスホリパーゼ D、リゾホスホリパーゼ D (オートタキシン)などのコンビネーションによって生成され、これらの酵素は細胞膜にもアンカーされ局在している。したがって力学的負荷によって細胞膜の流動が促進されPCと一連のLPA合成酵素群が出会い、LPAの合成と遊離が促進すると予想された。そこでLPAの受容体の発現を歯根膜細胞でRT-PCRにより検討したところ、いくつかのLPA受容体の強い発現が観察された(データ未発表)。以上から、力学的負荷が誘導するLPAシグナルの可

能性が強く示唆され、LPAシグナルが力学的負荷を受容する第5番目の経路として検討することを着想した。

2. 研究の目的

歯根膜は歯に掛かる力学的負荷を感知し、歯の位置や機能をコントロールする重要な組織である。歯根膜への力学的負荷はATPの放出、Ca²⁺流入など様々な細胞応答を示すが、細胞膜から合成されるリゾホスファチジン酸(LPA)の歯根膜での機能や力学的負荷との関連については明らかになっていない。LPAは細胞膜外層の主成分であるホスファチジルコリンから合成され、また我々は歯根膜細胞には複数のLPA受容体が強く発現していることを明らかにした。そこで本研究では、力学的負荷がどのようにLPAを誘導し、LPAが歯根膜細胞でどのような細胞内シグナルとクロストークするのかを解明することによって歯根膜の機能を明らかにする。それによって矯正などの歯科治療をより的確に行うための基礎情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) メカニカルストレス負荷によるLPA合成と遊離の検討:

① ヒト歯根膜由来線維芽細胞を、コラーゲンをコートした12 wellの細胞dish上で培養する。

② 培養した歯根膜細胞を、低速遠心機(右図)を用いて、1Gから50Gまで負荷依存的、5分から数日までの時間依存的に重力を負荷する。

③ 重力を負荷した細胞の培養液からLPAを有機溶媒により抽出し、遊離されたLPAの量を高速液体クロマトグラフィーにて解析する。

(2) LPA産生酵素群の解析:

RT-PCRおよびウエスタン解析により、LPA産生酵素群のmRNAおよび蛋白質発現の網羅的な解析を行う。

(3) LPA受容体の解析:

① RT-PCRおよびウエスタン解析により、LPA受容体のmRNAおよび蛋白質発現の網羅的な解析を行う。

② 歯根膜細胞に濃度依存的にLPAを添加し、LPA受容体のシグナルの検討を行う。

(4) 力学的負荷とLPAシグナルの細胞内クロストークの解析:

① 歯根膜細胞にLPAを添加し、低速遠心機で力学的負荷を掛ける。

② 力学的負荷で解析されたシグナル経路である、ATP放出、細胞内Ca²⁺の増加、ERKのリン酸化、COX-2の誘導について、その増強効果を測定し、クロストークの存在を解析する。

③LPA 受容体のシグナルをノックダウンさせ、同様の実験を行い、クロストークの確認を行う。

(5) LPAの細胞応答と細胞機能の解析：

①歯根膜細胞にLPAを添加し、細胞増殖、アクチンストレスファイバーの形成、アポトーシスなど、これまで同定されてきたLPA細胞内応答の解析を行う。

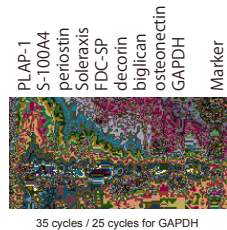
②骨吸収や骨形成のシグナルを検討し、骨芽細胞での石灰化や破骨細胞の分化（未分化破骨細胞からの分化）や骨吸収機能を、歯根膜細胞との共存培養や歯根膜細胞のコンディションメディウムを用いた実験で確認する。

③力学的負荷のメカノセンサーとしての機能の解析を行う。

4. 研究成果

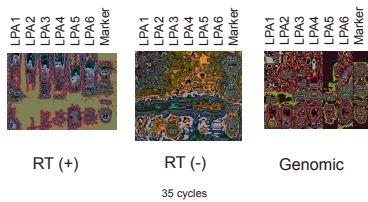
ヒト歯根膜より歯根膜線維芽細胞を単離し、歯根膜細胞特異的に発現している遺伝子の検討を行った。その結果、歯根膜特異的な遺伝子である、PLAP-1, periostin などの発現が確認された。

RT-PCR for PDL markers



ヒト歯根膜細胞における RT-PCR による LPA 受容体及び合成酵素の発現検討と DNA マイクロアレイによる遺伝子発現量変化の検討した結果、(1) 培養歯根膜細胞において、LPA1 および LPA6 の強い発現が認められた。

RT-PCR for LPA receptors



LPA 合成酵素ではLyso-PLDの発現がみられたがPA-PLA1a (LIPH) およびPS-PLA1の発現は見られなかった。

RT-PCR for enzymes of LPA signaling



(2) DNA マイクロアレイ (アジレント) による解析の結果、LPA 添加によって NR4A3 (核受容体)、RASD1 (RAS family small GTPase) などの発現が、重力負荷では ID1 (抑制性転写因子)、EGR (転写因子) などの発現が、歯根膜組織では培養歯根膜線維芽細胞に比べてオステオポンチン、PLAP-1 などの発現の上昇が検出された。

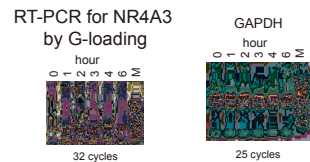
LPA添加により誘導された遺伝子群

Gene	Accession	Fold change
NR4A3	NM_173200	67.3
FOSB	NM_006732	45.7
RASD1	NM_016084	19.8
IL-6	NM_000600	17.6
PTGS2	NM_000963	15.1
RGS2	NM_002923	12.1
IL-11	NM_000641	8.15
FGF-7	NM_002009	6.64
SOX4	NM_003107	5.03
LIF	NM_002309	2.9

重力負荷により誘導された遺伝子群

Gene	Accession	Fold change
ID1	NM_002165	59.9
EGR1	NM_001964	18.1
IL-11	NM_000641	14.8
SGK1	NM_005627	10.3
EDN1	NM_001955	8.2
RGS2	NM_002923	6.7
DUSP1	NM_004417	6.5
NR4A3	NM_006981	6.3
MT2A	NM_005953	5.3
TRIB1	NM_025195	5.0

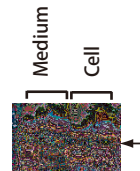
それぞれの DNA アレイの結果で共通して発現が上昇している遺伝子も確認され、RGS2 (G-protein inhibitor) が全てに共通して上昇していた。また、LPA 添加と重力負荷では共通して IL11, NR4A3 が共に上昇していた。



Lyso-PLD のヒト歯根膜線維芽細胞における発現と重力負荷による誘導を検討した。その結果、培養歯根膜線維芽細胞において、LPA 合成酵素群の中で Lyso-PLD の発現が認められた。PA-PLA1a (LIPH) および PS-PLA1 の発現は認められなかった。

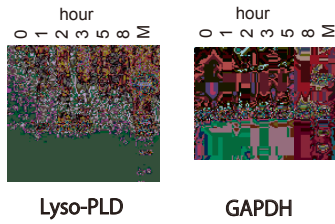


Western blotting により、Lyso-PLD 蛋白質の発現が培養液および細胞で確認された。

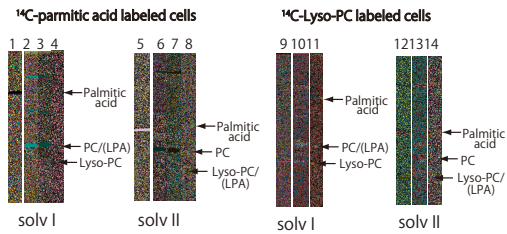


Western blotting (Lyso-PLD)

また、重力負荷により、Lyso-PLD mRNA は 2h をピークに発現が誘導された。



次に、ヒト歯根膜線維芽細胞を¹⁴C-パルミチン酸および¹⁴C-リゾホスファチジルコリン (Lyso-PC) でラベルし (18h)、重力負荷 (5h) 後、18h 培養した。培養液及び細胞からクロロホルムにて脂質を抽出し、TLC を用いてそれぞれの展開溶媒にて分離後、Storm (GE electric) により分析を行った。その結果、パルミチン酸ラベル細胞において、PC のラベルと LPA が僅かに認められた。Lyso-PC は認められなかった。重力負荷後、脂質代謝物に違いは認められなかった。培養液中には明らかな脂質代謝物は認められなかった。

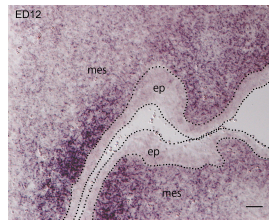


- 1: 培養液 (重力負荷)
- 2: 細胞 (重力なし)
- 3: 細胞 (重力負荷)
- 4: マーカー
- 5: 培養液 (重力負荷)
- 6: 細胞 (重力なし)
- 7: 細胞 (重力負荷)
- 8: マーカー
- 9: 培養液 (重力負荷)
- 10: 細胞 (重力負荷)
- 11: マーカー
- 12: 培養液 (重力負荷)
- 13: 細胞 (重力負荷)
- 14: マーカー

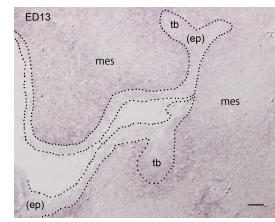
Lyso-PC ラベルした細胞においても、ほぼ同様な結果であった (solvent I (solv I): chloroform: metnanol: water=65:25:4 / solvent II (solv II): chloroform: metnanol: hydroxide=65:25:4)。

さらに、マウス発生期の歯胚における LPA 受容体の発現: RT-PCR による発現検討および in situ hybridization による LPA1 の発現分布の検討を行った。その結果、(1) RT-PCR 法による LPA 受容体の発現検討: マウス E14.5 および E18 における歯胚発生部位から total RNA を抽出し、LPA1~6 の mRNA 発現量を RT-PCR により検討した。E14.5 においては

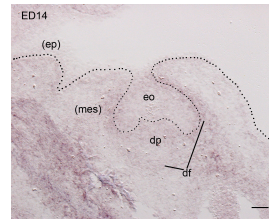
LPA5 以外の受容体の発現が見られた。E18 においては LPA3 と 5 以外においてより強い発現が見られた。(2) in situ hybridization 法による LPA1 の歯胚における発現分布の検討: E12 において、LPA1 は上皮と接する間葉の部分に強い発現が認められた。その後発生が進むに従って E16 まで徐々に発現が減弱していくものの、間葉の部分に LPA1 の発現がみとめられた。しかし E18 になると間葉に接する上皮の部分、特にエナメル芽細胞が分布する付近に LPA1 の発現が移動し、間葉では象牙芽細胞にのみ発現が見られるようになった。



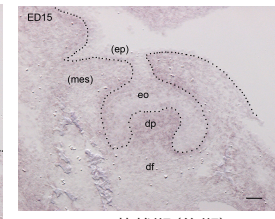
E12: 臼歯歯胚形成開始直後



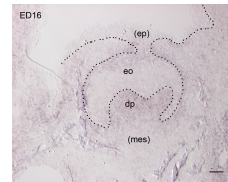
E13: 蕾状期 (臼歯)



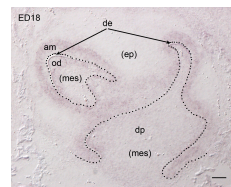
E14: 帽状期



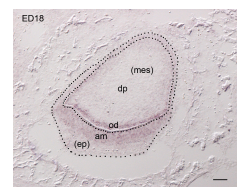
E15: 蕾状期 (後期)



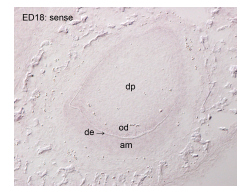
E16: 初期鐘状期



E18: 鐘状期 (臼歯)

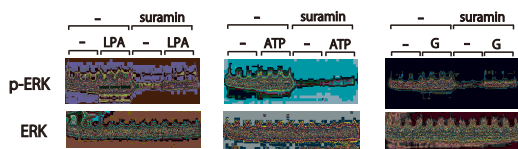


E18: 鐘状期 (切歯)

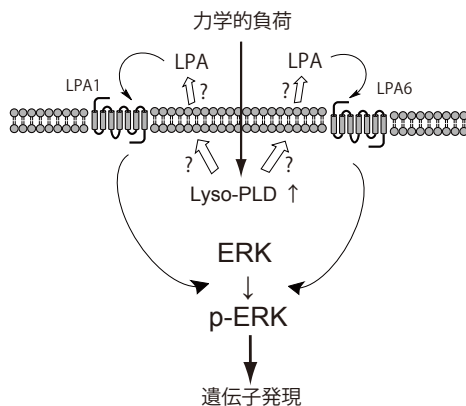


ep, epithelium (上皮); mes, mesenchymal (間葉); tb, tooth bud (歯蕾); eo, enamel organ (エナメル器); dp, dental papilla (歯乳頭); df, dental follicle (歯小胞); am, ameloblasts (エナメル芽細胞); od, odontoblasts (象牙芽細胞); de, dentin (象牙質); scale bar, 100 μm

次に、ヒト歯根膜線維芽細胞に、LPA (1μM)、ATP (10μM) および重力 (7G) を 10 分間負荷し、ERK のリン酸化を western blotting により解析した。また、LPA 受容体およびプリン受容体の阻害剤である suramin を用いて ERK リン酸化の抑制効果を検討した。結果：LPA と ATP の添加によって ERK のリン酸化は約 2.5 倍に増加した。また重力負荷では約 4 倍に増加した。suramin の添加によって、ERK のリン酸化は ATP 添加では完全に、LPA と重力負荷ではほぼ完全に抑制された。



以上より、下図に示すように、ヒト歯根膜線維芽細胞では、LPA の合成酵素の発現とメカニカルストレスによる誘導が見られたことから、歯根膜において、LPA とメカニカルストレスが、組織維持などにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。また、DNA マイクロアレイによって検出された遺伝子群が、歯根膜の機能維持に重要な働きをしている事が示唆され、これらのシグナルは歯根膜の維持や再生に有効である可能性が示唆された。



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 4 件)

1. Ito Mai, Arakawa Toshiya, Okayama Miki,

Shitara Akiko, Mizoguchi Itaru, Takuma Taishin. Gravity loading induces adenosine triphosphate release and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in human periodontal ligament cells. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 4, 2013, in press

2. Taishin Takuma, Akiko Shitara, Toshiya Arakawa, Miki Okayama, Itaru Mizoguchi, Yoshifumi Tajima. Isoproterenol stimulates transient SNAP23-VAMP2 interaction in rat parotid glands. *FEBS Letters*, 587, 2013, 583-589

3. Miki Okayama, Akiko Shitara, Toshiya Arakawa Yoshifumi, Tajima, Itaru Mizoguchi, Taishin Takuma. SNARE proteins are not excessive for the formation of post-Golgi SNARE complexes in HeLa cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012.

4. Toshiya Arakawa, Toru Ohta, Yoshihiro Abiko, Miki Okayama, Itaru Mizoguchi and Taishin Takuma, A PCR-based method for constructing a linear vector with site-specific DNA methylation. *Analytical Biochemistry*, 416, 2011, 211-217,

[学会発表] (計 15 件)

1. Toshiya Arakawa, Miki Okayama, Akiko Shitara, Itaru Mizoguchi, Taishin Takuma. Crosstalk Between Lysophosphatidic Acid and Mechanical Stress in Periodontal Ligament. IADR/AADR/CADR 91th General Session and Exhibition. March 21, 2013, Seattle convention center

2. 荒川俊哉, 岡山三紀, 設楽彰子, 溝口到, 田隈泰信. ヒト歯根膜におけるリゾホスファチジン酸の合成およびシグナル経路の解析. 第 85 回日本生化学会. 2012. 12. 14~16 福岡市

3. 岡山三紀, 荒川俊哉, 池田和貴, 田隈泰信, 溝口到. ヒト歯根膜細胞におけるリゾホスファチジン酸シグナルの解析. 第 71 回日本矯正歯科学会学術大会. 2012. 10. 17~20 岩手県 盛岡市.

4. 荒川俊哉, 岡山三紀, 小原伸子, 設楽彰子, 入江一元, 溝口到, 田隈泰信. ヒト歯根膜におけるリゾホスファチジン酸シグナル. 第

54 回歯科基礎医学会学術大会. 2012.9.14~16 福島県 郡山市.

5. Toshiya Arakawa, Miki Okayama, Nobuko Obara, Akiko Shitara, Itaru Mizoguchi, Taishin Takuma. Analysis of lysophosphatidic acid signaling in periodontal Ligament. 41st Annual Meeting & Exhibition of the AADR. 2012.3.24, Tampa convention center (Florida USA)

6. 荒川俊哉、岡山三紀、小原伸子、設楽彰子、柴田俊一、溝口到、田隈泰信. ヒト歯根膜におけるリゾホスファチジン酸シグナルの解析. 第 84 回日本生化学会 2011.9.21~24 京都国際会議場.

7. 岡山三紀、荒川俊哉、池田和貴、田隈泰信、溝口 到. メカニカルストレスに誘導されるヒト歯根膜細胞の遺伝子検索. 第 70 回日本矯正歯科学会学術大会. 2011.10.17~20 名古屋国際会議場.

8. 設楽彰子、渋井徹、岡山三紀、荒川俊哉、溝口 到、坂倉康則、田隈泰信. ゴルジ体のリボン構造形における VAMP 4 の重要性. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会. 2011.9.30~10.2 岐阜県 長良川国際会議場.

9. 荒川俊哉、岡山三紀、溝口到、設楽彰子、田隈泰信. ヒト歯根膜細胞のメカニカルストレスによる遺伝子発現. 2011.9.30~10.2 岐阜県 長良川国際会議場.

10. 田隈泰信、設楽彰子、岡山三紀、荒川俊哉、溝口到. ラット耳下腺調節開口分泌に関わる SNARE 複合. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会. 2011.9.30~10.2 岐阜県 長良川国際会議場.

11. Toshiya ARAKAWA, Miki OKAYAMA, Yoshihiro ABIKO, Itaru MIZOGUCHI, Akiko SHITARA, and Taishin TAKUMA. Gene expression by mechanical stress in human periodontal ligament cells. IADR/AADR/CADR 89th General Session and Exhibition. March 16-19, 2011 San Diego, CA USA.

12. 荒川 俊哉、岡山 三紀、溝口 到、設楽 彰子、田隈 泰信. ヒト歯根膜細胞のメカニカルストレスによる遺伝子発現. 第 83 回日本生化学会. 2010.12.7~10 神戸市.

13. 田隈 泰信、岡山 三紀、設楽 彰子、荒川 俊哉、溝口 到. 開口分泌の SNARE タンパク質は過剰に存在するか? 第 83 回日本生化学会.

2010.12.7~10 神戸市.

14. 荒川 俊哉、安彦 善裕、岡山 三紀、溝口 到、設楽 彰子、田隈 泰信. 点特異的メチル基導入ベクターの ES 細胞での発現調節. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会. 2010.9.20~22 東京都 船堀.

15. 設楽 彰子、岡山 三紀、荒川 俊哉、溝口 到、田隈 泰信. VAMP4 ノックダウン細胞におけるゴルジ体の断片化と初期エンドソームの分散化. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会. 2010.9.20~22 東京都 船堀.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 俊哉 (ARAKAWA TOSHIYA)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号: 40306254

(2) 研究分担者

田隈 泰信 (TAKUMA TAISHIN)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号: 40095336

設楽 彰子 (SHITARA AKIKO)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号: 30508718

(3) 連携研究者

()

研究者番号: