

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 5月 10日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22592325

研究課題名（和文）

伸展刺激によりオキシタラン線維から遊離するLTBP-2の意義

研究課題名（英文）

LTBP-2 negatively regulates coalescence of oxytalan fibers induced by stretching stress.

研究代表者

敦賀 英知 (TSURUGA EICHI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30295901

研究成果の概要（和文）：オキシタラン線維は細胞外基質のひとつであり、微細線維により構成される。しかし、その形成過程における詳細な研究は成されていない。我々はこれまで、ヒト歯根膜線維芽細胞の培養系で細胞伸展刺激より fibulin-5 がオキシタラン線維の凝集機構を調節することを報告した。LTBP-2 は fibulin-5 と結合能を有する分子であり、本研究では LTBP-2 のオキシタラン線維凝集機構に果たす役割を解析した。免疫沈降により LTBP-2 は fibulin-5 と結合していた。伸展 LTBP-2 の発現には影響を与えないが、細胞層の 70% が減少し、fibulin-5 と結合する LTBP-2 の 60% が減少した。LTBP-2 の 95% の抑制によりオキシタラン線維の凝集が抑制されたのに対し、約 40% の抑制時には対照群と同様にオキシタラン線維の凝集は誘導された。これらの LTBP-2 抑制時にはいずれも、fibulin-5 はオキシタラン線維上に存在していた。これらの結果から、細胞伸展刺激により LTBP-2 は fibulin-5 のオキシタラン線維の凝集に果たす機能に対し負の調節を行っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oxytalan fibers are extracellular matrix components consisting of pure microfibrils. However, the mechanism whereby oxytalan fibers develop is not fully understood. We have previously reported that in human periodontal ligament (PDL) fibroblasts subjected to stretching stress, bundles of oxytalan fibers coalesce under the control of fibulin-5. LTBP-2 is known to bind to fibulin-5. The purpose of the present study was to clarify the role of LTBP-2 in the coalescence of oxytalan fibers. We subjected PDL fibroblasts to stretching to examine the effects of LTBP-2 on the coalescence of oxytalan fibers in cell/matrix layers. Interaction of LTBP-2 with fibulin-5 was examined by immunoprecipitation assay, and changes in LTBP-2 deposition upon stretching were investigated by Western blotting and immunofluorescence. We used siRNA against LTBP-2 in PDL cell culture and examined the appearance of oxytalan fibers on the basis of immunofluorescence. Stretching induced coalescence of oxytalan fibers, but did not affect LTBP-2 expression. The amount of extracellularly deposited LTBP-2 was decreased by about 70% as a result of stretching, compared with the control. LTBP-2 interacted with fibulin-5 on the fibers, and stretching decreased the amount of the LTBP-2 interacted with fibulin-5 by about 60%. Oxytalan fiber coalescence didn't occur when LTBP-2 was suppressed by about 95%, whereas it occurred when LTBP-2 was suppressed by about 40%, fibulin-5 being colocalized with oxytalan fibers. These results suggest that LTBP-2, in response to tension stress, may negatively control the function of fibulin-5, thereby modulating the mechanism of oxytalan fiber coalescence.

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	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯根膜、オキシタラン線維、弾性系線維、細胞外基質、線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周組織は、細胞と細胞外基質から成り、主要細胞外線維成分としてコラーゲン、弾性系線維が知られている。歯周組織の弾性系線維の分布は、歯肉にはエラスチンの沈着を伴う弾性系線維が存在するのに対し、歯根膜には主にエラスチンの沈着を伴わない弾性系線維（オキシタラン線維）が存在する。我々は歯根膜においては、咬合力等により機能的な外力（mechanical stress）が付加されることから、細胞伸展装置を用いた歯根膜線維芽細胞の培養系で形成されるオキシタラン線維が凝集し、fibulin-5が凝集を調節することを報告した。細胞外基質に存在するTGF- β binding proteinのひとつであるLTBP-2はfibulin-5と結合能を有し、オキシタラン線維上にも存在することからその機能解析を通してオキシタラン線維の形成過程解明の基礎データを提供できると考えた。

2. 研究の目的

我々は、fibulin-5がオキシタラン線維の凝集を調節する1分子であることを報告した（J Periodontal Res, 44:622-627, 2008）。fibulin-5と結合能を有しオキシタラン線維上に存在するLTBP-2のオキシタラン線維凝集に果たす役割を解析するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜由来線維芽細胞を細胞伸展装置

(ST-1400、ストレックス社)にて伸展率：5%、周期：1/10Hz（6 cycles/min）の伸展刺激を1週間付与した。遺伝子解析としてLTBP-2のNorthern blot法を用い、またWestern blot法にてLTBP-2およびfibulin-5のタンパク質沈着量および免疫染色を行いfibrillin-1、

LTBP-2、fibulin-5の培養細胞層における検出を行った。

(2) siRNAを用いてLTBP-2遺伝子発現の抑制を行った。Transient transfectionに用いたsiRNAの配列は以下の通りである。

Gene: human LTBP-2 (accession # NM_000428)

No. 579-601 bp

sense 5'-CAGCCAAGGUGUACAGUCUGU-3'

antisense

3'-AGACUGUACACCUUGGCUGCA-5'

negative controlとして

5'-AUCCGUUGACGUUAAGCGCAU-3'

antisense 3'-GCGCUAACGCUAACGGAUCC-5'

(3) 歯根膜線維芽細胞の培養系で、fibulin-5抗体を用いて免疫沈降を行い、培養細胞層においてLTBP-2がfibulin-5と結合していることを解析した。

(4) LTBP-2のnorthern blotを行った。使用したRNAプローブは以下の通りである。

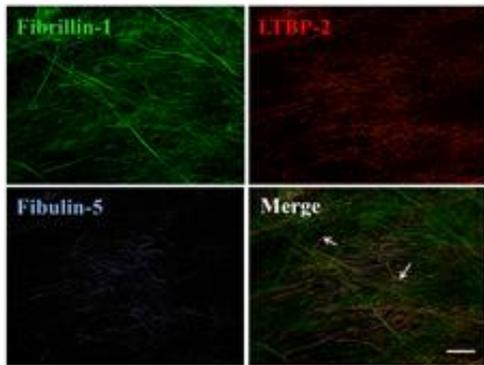
Gene: human LTBP-2 (accession # NM_000428)

No. 3190-4004 bp

生化学的分析はImage J program (NIH)により半定量解析を行った。

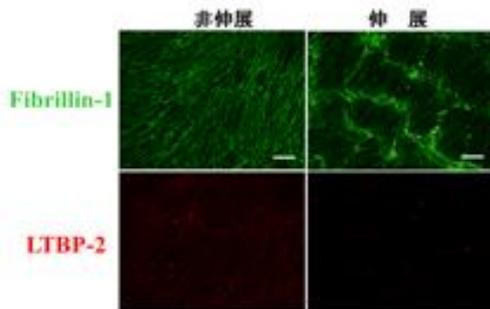
4. 研究成果

(1) 歯根膜線維芽細胞が形成するオキシタラン線維（fibrillin-1の免疫染色、green）上にLTBP-2（red）、fibulin-5（blue）が存在し、一部共在することが観察された（→が共在している領域）。(図1)



(図 1)

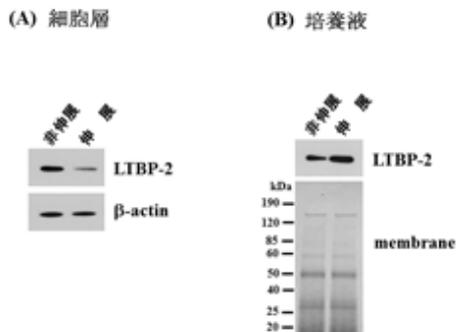
(2) 細胞伸展刺激によりオキシタラン線維の形成は方向性を持って凝集した (Green)。一方、LTBP-2 の培養細胞層における染色性は細胞伸展刺激により減少した (red)。 (図 2)



(図 2)

(3) 細胞伸展刺激により培養細胞層の LTBP-2 は減少し (図 3 A)、培地中の LTBP-2 は増加する (図 3 B)。

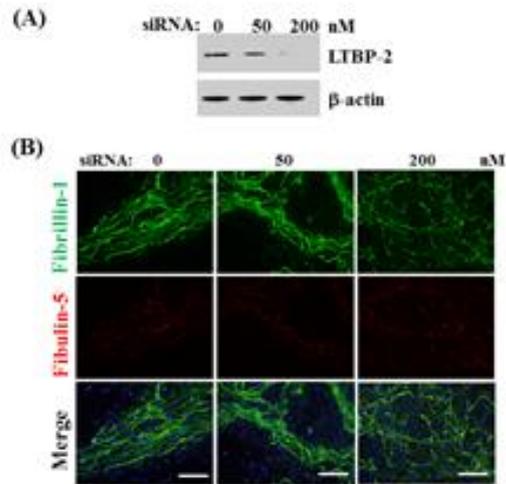
(図 3 は細胞層および培地の western blot による解析結果を示す)



(図 3)

(4) siRNA の導入により LTBP-2 の発現を 40% 抑制するとオキシタラン線維の凝集は誘導されるが、LTBP-2 の発現を 95% 抑制するとオキシタラン線維の凝集は生じなかった。いずれの場合も fibulin-5 は fibrillin-1 陽性のオキシタラン線維上に存在していた

(図 4 : A は western blot による LTBP-2 の抑制効果、B は免疫染色によるオキシタラン線維の凝集度の変化と fibulin-5 の分布を示す。免疫染色の scale bar は図 1, 2, 4 すべて 100 μm)



(図 4)

生体の歯根膜オキシタラン線維を擬似した細胞伸展装置を用いた培養系において、形成されるオキシタラン線維は方向性を持って凝集する (J Periodontal Res, 44:170-174, 2009)。また、我々は fibulin-5 がオキシタラン線維の凝集を調節することを報告した (J Periodontal Res, 44:622-627, 2009)。今回の結果から、オキシタラン線維上に LTBP-2 が存在し、その一部が fibulin-5 と結合していることが示された。また、細胞伸展刺激によりオキシタラン線維上の LTBP-2 が培地中に遊離すること、しかし、一定量の LTBP-2 はオキシタラン線維上に残留することがオキシタラン線維の凝集に必要なことが明らかとなった。このことは、オキシタラン線維の凝集の直接的調節因子である fibulin-5 の機能効率を LTBP-2 が調節している可能性を示唆している。今回の結果から LTBP-2 が直接 fibulin-5 と結合しているか、他分子を介しているかは解明されていない。他のオキシタラン線維関連分子を含めた総合的な解析が今後必要である。

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3件)

1. Nakashima K, Tsuruga E, Nakatomi Y, Yamauchi Y, Hata Y, Tamaoki S, Sawa Y, Ishikawa H.

Stretch stimuli increase fibulin-5/EMILIN-1 complex on oxytalan fibers in human periodontal ligament cells.

Orthodontic Waves, **70**:15-20, 2011.

査読有り

DOI:10.1016/j.odw.2010.09.001

2. Nakatomi Y, Tsuruga E, Yamauchi Y, Kawagoe M, Yamanouchi K, Nakashima K, Sawa Y, Ishikawa H.

Intracellular interaction of EMILIN-1 with fibrillin-1 in human periodontal ligament cells.

Orthodontic Waves, **71**:66-69, 2012.

査読有り

DOI:10.1016/j.odw.2012.01.002

3. Tsuruga E, Oka K, Hatakeyama Y, Isokawa K, Sawa Y.

Latent transforming growth factor- β binding protein 2 negatively regulates coalescence of oxytalan fibers induced by stretching stress.

Connective Tissue Research, **54**:14-20, 2013.

査読有り

DOI:10.3109/03008207.2012.702816

[学会発表] (計1件)

敦賀 英知、中島 一記、岡 暁子、石川 博之、沢 禎彦
LTBP-2・fibulin-5 複合体によるオキシタラン線維形成の制御

第42回日本結合組織学会 (平成22年8月19日、秋田)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

敦賀 英知 (TSURUGA EICHI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 30295901

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: