

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 5 月 9 日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22792079
 研究課題名（和文） セメント芽細胞における細胞外カルシウムによる FGF-2 発現誘導機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of FGF-2 enhancement induced by extracellular calcium in cementoblasts
 研究代表者
 金谷 聡介 (KANAYA SOUSUKE)
 東北大学・病院・医員
 研究者番号：80375097

研究成果の概要（和文）：申請者らはセメント芽細胞において、細胞外刺激により cAMP/プロテインキナーゼ A 依存的に Fibroblast growth factor 2(FGF-2)の発現が増強されることを証明した。さらにプロテインキナーゼ作動物質である Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)刺激においても FGF-2 の発現が増強されることを見いだした。セメント芽細胞における FGF-2 発現増強には複数の機構が存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that extracellular calcium increases fibroblast growth factor-2 expression levels via a cAMP/Protein kinase A dependent pathway in cementoblasts. We also found that Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), the potent stimulator of Protein kinase C increases FGF-2 expression in cementoblasts. These indicate the presence of different pathways for FGF-2 enhancement in cementoblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：セメント芽細胞、細胞外カルシウム、PMA、FGF-2

1. 研究開始当初の背景

セメント質は歯根と歯周組織の付着に必須であることからセメント芽細胞は歯周組織再生に重要な役割を果たすと考えられる。

申請者らはセメント芽細胞において、細胞外カルシウムあるいは Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)刺激で Fibroblast growth factor 2(FGF-2)の発現が有意に増強することを見いだした。

2. 研究の目的

セメント芽細胞において異なる経路を介した FGF-2 発現増強機構が存在する可能性があることから、これらの機構におけるクロストークを含めその全容を解明し、新しい歯周再生治療の開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

マウスセメント芽細胞を細胞外カルシウムあるいは PMA 刺激し、FGF-2 発現増強に関

わるシグナル伝達機構について解析をおこなう。

4. 研究成果

(1) マウスセメント芽細胞において、細胞外カルシウム 10mM 刺激して蛍光免疫染色法にて解析したところ、刺激後6時間をピークとして FGF-2 の強い発現誘導がみられた。

(2) 細胞外カルシウム 10mM で6時間刺激すると、FGF-2 mRNA の誘導がみられたが、アデニル酸シクラーゼ阻害剤である MDL-12330A およびプロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤である H-89 で前処理したところ、FGF-2 mRNA の発現が濃度依存的に抑制された。

一方、ホスホリパーゼ C 阻害剤である U73122 およびプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤である GF-109203X 前処理では、FGF-2 mRNA の発現誘導は抑制されなかった。

(3) セメント芽細胞において細胞外カルシウムは cAMP/プロテインキナーゼ A 依存性に FGF-2 の発現を誘導することが明らかとなった。

(4) セメント芽細胞を 10nM PMA で刺激したところ、刺激後6時間をピークとして FGF-2 mRNA の強い発現増強がみられた。用量依存性を解析したところ、10nM からその増強効果がみられた。(図1)

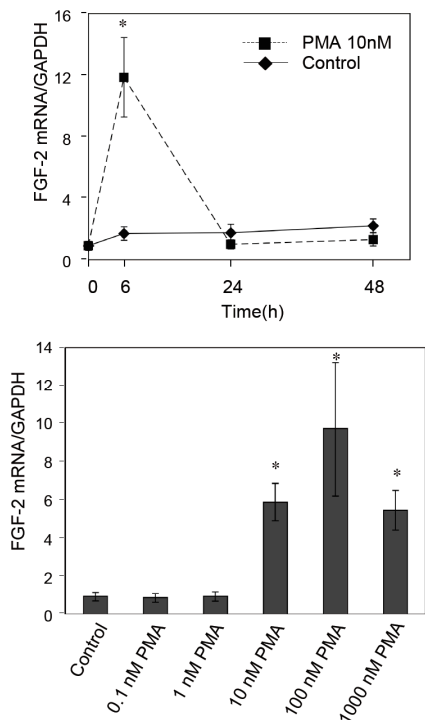


図1. セメント芽細胞におけるPMA刺激によるFGF-2 mRNAの発現増強

(5) FGF-2 タンパク発現の増強について蛍光免疫染色法にて解析したところ、細胞外カルシウムと同様、PMA12時間刺激において FGF-2 タンパクの発現増強がみられた。(図2)

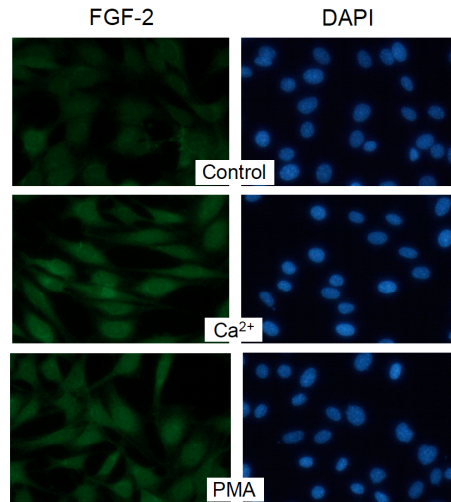


図2. セメント芽細胞におけるPMA刺激によるFGF-2 タンパクの発現増強

(6) プロテインキナーゼ C 阻害剤である GF-109203X により前処理したところ、FGF-2 mRNA の発現増強が濃度依存的に抑制された。このことからプロテインキナーゼ C が関与していることが分かった。(図3)

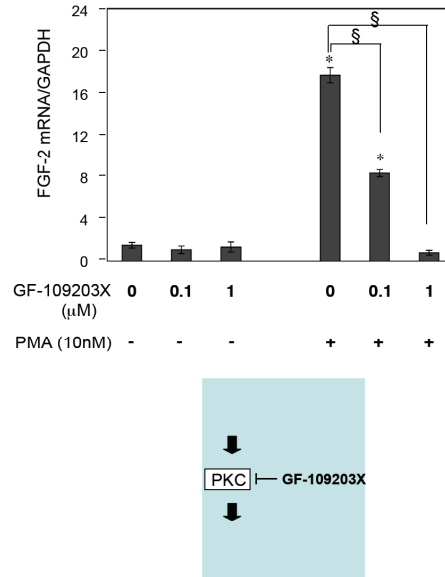


図3. PMA刺激によるFGF-2 mRNA発現増強へのプロテインキナーゼ (PKC)の関与に対する解析

(7) PMA と細胞外カルシウムによる FGF-2 の発現増強機構が異なるものであるかを検討するため、PMA 100nM 18時間前処理によるプロテインキナーゼ C の枯渇が FGF-2 mRNA の

発現増強に与える影響について解析した。

その結果、PMA 10nM 6 時間刺激では、PMA 100nM 18 時間前処理により FGF-2 の発現増強が完全に抑制されたのに対して、カルシウム 10mM 6 時間刺激では PMA 100nM 前処理でも全く抑制がみられなかった。

このことから、PMA による FGF-2 mRNA 発現増強機構はカルシウムによる PKA 経路とは独立した経路であることが分かった。(図 4)

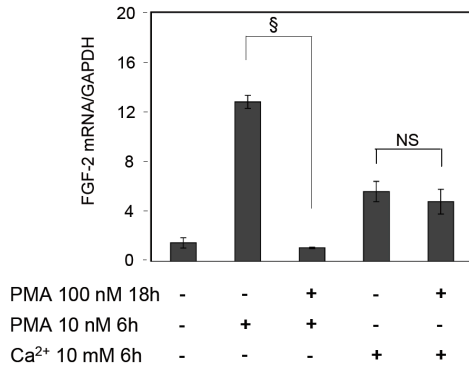


図4. PMAによるPKC枯渇が細胞外カルシウムによるFGF-2 mRNA発現増強に与える影響

(8) 次にL型カルシウムイオンチャンネル阻害剤である Nifedipine 存在下で 6 時間 PMA 刺激したところ、Nifedipine 処理では FGF-2 mRNA 発現増強の抑制はみられなかった。

このことから、カルシウムイオンチャンネルの関与はないことが分かった。(図 5)

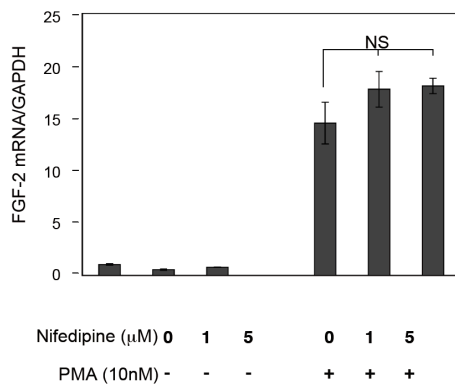


図5. FGF-2 mRNAの誘導における細胞外カルシウムの細胞内流入に対する解析

(9) さらに、MAP キナーゼ阻害剤により前処理したところ、p-38 阻害剤である SB203580 で FGF-2 mRNA の発現増強が強く抑えられた。Erk1/2 阻害剤である PD98059 前処理では部分的に抑制がみられたが、JNK 阻害剤である SP600125 前処理では FGF-2 mRNA の発現増強は抑制されず、むしろ亢進する傾向がみられた。(図 6)

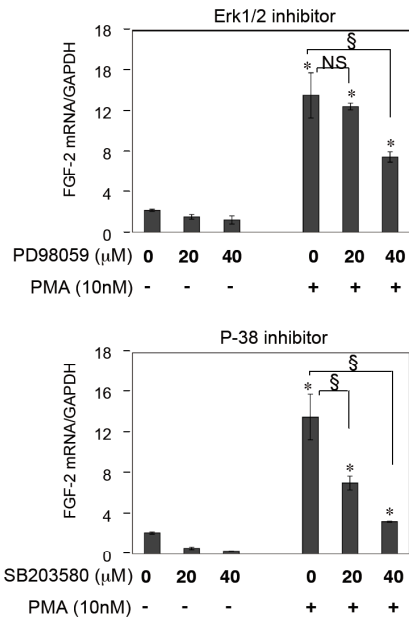


図6. PMAによるFGF-2 mRNA発現増強へのMAPキナーゼの関与に対する解析

(10) 本研究の結果、セメント芽細胞にはプロテインキナーゼC 依存性に FGF-2 の発現を増強する機構が存在しており、その伝達経路には MAP キナーゼである p-38 および Erk が関与していることが明らかとなった。(図 7)

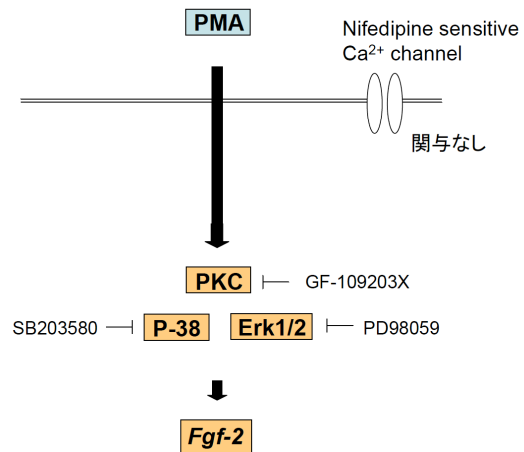


図7. PMA刺激によるFGF-2 mRNA発現増強機構

以上の結果から、セメント芽細胞における FGF-2 発現増強には複数の機構が存在するとが示唆される。(図 8)

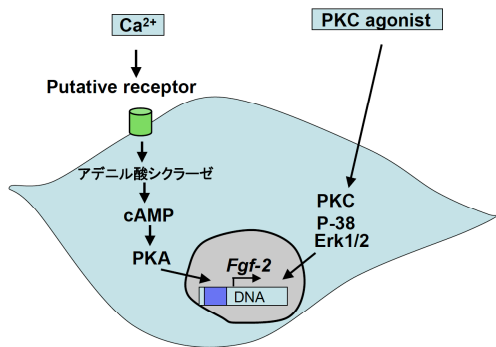


図8. セメント芽細胞におけるFGF-2 mRNA発現増強機構は複数存在する

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2件)

1. Kanaya S, Nemoto E, Ebe Y, Somerman MJ, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases fibroblast growth factor-2 gene and protein expression levels via a cAMP/PKA dependent pathway in cementoblasts. Bone. 査読有、47(3), 2010, 564-572.
2. Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, H. Shimauchi Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有、vol.394, 2010, 1093-1097

[学会発表] (計2件)

1. 第53回春季日本歯周病学会学術大会「セメント芽細胞において細胞外カルシウム刺激は cAMP/PKA 依存性に Fibroblast growth factor 2 の発現を誘導する」 金谷聡介、根本英二、江部由佳梨、島内英俊 2010年5月14日 岩手
2. 第132回春季日本歯科保存学会学術大会「セメント芽細胞におけるプロテインキナーゼ C 依存性 Fibroblast growth factor 2 発現増強作用」 金谷聡介、根本英二、後藤和宏、島内英俊 2010年6月4日 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金谷 聡介 (KANAYA SOUSUKE)
 東北大学・病院・医員
 研究者番号: 80375097