

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 18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792091

研究課題名（和文） スフィンゴシン-1-リン酸を用いた
新規歯槽骨再生薬の開発に関する研究研究課題名（英文） The development of new drug for alveolar bone regeneration using
sphingosine-1-phosphate

研究代表者

松崎 英津子（MATSUZAKI ETSUKO）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20432924

研究成果の概要（和文）：骨芽細胞と破骨細胞のカップリングに重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）を用いた歯槽骨再生薬の開発に関する研究を行った。S1Pシグナル伝達経路はPI3K/Akt経路を介してWnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化し、osteoprotegerinの遺伝子発現を増加させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Since it has been reported that sphingosine-1-phosphate (S1P) is related with bone resorption and bone formation, the effect of S1P on osteoblast gene expression was examined. We found that S1P activated the Wnt/ β -catenin signaling pathway through PI3K/Akt pathway, and increased osteoprotegerin gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯周治療学・歯周外科学

キーワード：骨芽細胞、スフィンゴシン-1-リン酸、骨、再生医学

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、「骨芽細胞による骨新生」と「破骨細胞による骨吸収」のバランスによって恒常性が維持されている。破骨細胞は、血球系の単球・マクロファージ由来の細胞で、前駆細胞が血中から骨表面に定着、そこで骨芽細胞が発現するRANKL（receptor activator of NF kappa B ligand）による刺激を受けることにより成熟破骨細胞に分化し、骨吸収を引き起こす。

スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は血中

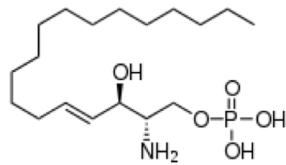
に存在する新しい生理活性物質として近年注目されている（図1）。S1Pは、生体膜を構成するスフィンゴ脂質の代謝産物であり、SPHK1という酵素により膜から切り出されて遊離した後に細胞膜上に発現している受容体に結合して細胞遊走などを引き起こす生理活性物質でもある。

これまでに、S1Pと骨関連の報告としては、S1Pが破骨細胞分化のレギュレーターであり、骨芽細胞と破骨細胞のカップリングに重要な役割を果たすことや、破骨細胞

の成熟阻害と骨吸収の抑制が明らかとなってきたが、S1Pが骨芽細胞の分化に対してどのような役割をはたしているかについては不明である。

本研究では、S1Pが骨芽細胞分化に重要なWnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響と、このシグナル伝達経路の標的遺伝子であり、骨芽細胞・破骨細胞のカップリングに重要な破骨細胞抑制因子として知られるosteoprotegerin (OPG)の発現にS1Pが及ぼす影響に着目して実験を行った。

図1 S1Pの構造式



2. 研究の目的

「歯槽骨の再生」は、歯周病治療及び歯周病研究のうえで大きな目標である。特に、人体に安全かつ有用で、どのような症例にも使用できる歯槽骨再生薬、再生材料の開発が望まれるところである。しかしながら、現時点では、骨芽細胞の分化メカニズムをはじめとして、未だ解明されていない部分が多い。よって、骨芽細胞と破骨細胞による骨吸収のカップリングに重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P)を用いた歯槽骨再生薬の開発に関する研究を行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

- (1) S1Pが骨芽細胞分化に及ぼす影響について、骨芽細胞分化マーカー遺伝子およびOPG発現を検討する。
- (2) S1PがWnt/ β -カテニンシグナル伝達経路へ及ぼす影響について検討する。
- (3) ラット歯槽骨欠損モデルを作製、S1Pを局所投与し、*in vivo*における骨再生を評価する。
- (4) S1Pが作用する転写因子についての検討を行う。

4. 研究成果

(1) S1Pは、骨芽細胞の増殖には影響を及ぼさなかったが、分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を上昇させた。また、S1Pが石灰化に及ぼす影響について、von kossa染色、アリザリンレッド染色を用いて検討したところ、S1Pは石灰化を促進することが明らかとなった(図2)。さらに、S1Pは

OPGのmRNA発現を増加させた(図3)。

図2

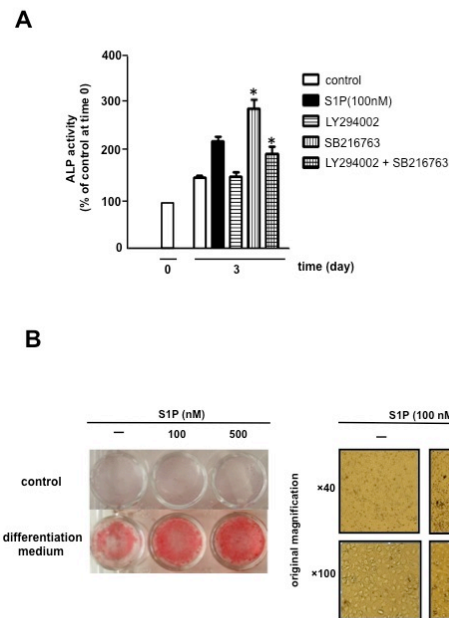
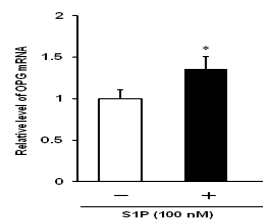


図3



(2) S1PはGSK-3 β の活性を阻害し(図4)、このシグナル伝達経路の転写因子であるTCF/LEFの転写活性を増加させた。また、蛍光免疫染色により β -カテニンの核移行を促進させた(図5)。

S1Pのシグナルとしては、S1P₁受容体がGiと共役し、その下流のシグナルにPI3K/Akt/GSK-3 β があることが知られているため、S1Pシグナル伝達経路(S1P/PI3K/Akt/GSK-3 β)とWnt/ β -カテニンシグナル伝達経路との関わりについてさらに検討した。すなわち、PI3Kの阻害剤であるLY294002を用いたところ、GSK-3 β の活性は阻害され、 β -カテニンの核移行は抑制された(図4-5)。

図 4

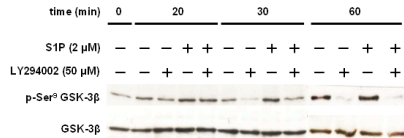
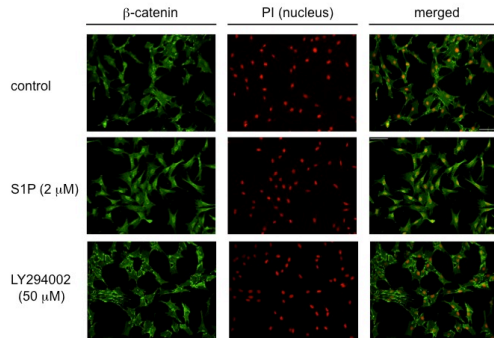


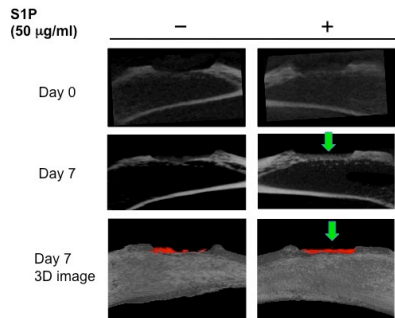
図 5



(3) *in vivo* においては、ラットの脛骨に骨欠損を作製し、S1P が骨形成に及ぼす影響について μ CT を用いて検討した。その結果、S1P は、新生骨の形成を促進させることが明らかとなった (図 6)。

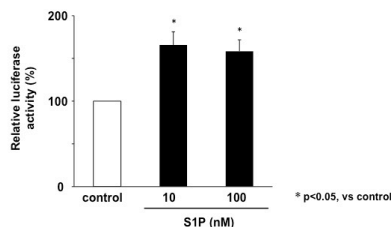
図 6

Rat (8w) tibia



(4) S1P が OPG 遺伝子プロモーターに及ぼす影響について、OPG レポータープラスミド (-1309/+205 bp) を作製し検討したところ、レポーター遺伝子の活性は S1P により増加した (図 7)。S1P が作用する転写因子については現在検討中である。

図 7



以上の結果から、S1P は、S1P シグナル伝達経路 (PI3K/Akt 経路) を介して Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化することにより、OPG 遺伝子発現を増加してい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)

[学会発表] (計 5 件)

平塚 俊志、松崎 英津子、他、**Sphingosine-1-phosphate and the canonical Wnt signaling pathway cooperate in the increase of osteoprotegerin gene expression in osteoblast**、The 13th Joint Scientific Meeting between Korean academy of Conservative Dentistry and Japanese Society of Conservative Dentistry、平成 23 年 11 月 11 日、大韓民国、ソウル、KimKoo Museum and Library

松崎 英津子、他、**The new approaches for bone regeneration through the activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway**、The 6th International joint symposium on 'Dental and craniofacial morphogenesis and tissue regeneration' and 'Oral health science' (シンポジウム)、平成 23 年 3 月 4 日、福岡県福岡市、福岡リーセントホテル

平塚 俊志、松崎 英津子、他、**Sphingosine-1-phosphate activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and increases osteoprotegerin gene expression**、The 6th International joint symposium on 'Dental and craniofacial morphogenesis and tissue regeneration' and 'Oral health science'、平成 23 年 3 月 4 日、福岡県福岡市、福岡リーセントホテル

松崎 英津子、他、**A possibility of bone regeneration through the activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway**、第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会・第 12 回日韓歯科保存学会学術大会日韓共催シンポジウム、平成 22 年 10 月 28 日、岐阜県岐阜市、長良川国際会議場

平塚 俊志、松崎 英津子、他、**The effect of sphingosine-1-phosphate on osteoblast differentiation**、The 96th annual meeting of American Academy of

periodontology in collaboration with the
Japanese society of periodontology、平成 22
年 11 月 1 日、USA、HI、Honolulu、Hawaii
convention center

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 英津子 (MATSUZAKI ETSUKO)
九州大学・大学病院歯周病科・助教
研究者番号：20432924

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：