

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890142

研究課題名(和文) 低分子リガンドによる TrkB トランスアクチベーションを用いた歯周組織再生療法開発

研究課題名(英文) Development of novel periodontal tissue regenerative therapy by small molecule ligands induced TrkB transactivation

研究代表者

加治屋 幹人 (Mikihito, Kajiya)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：00633041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：これまでに脳由来神経成長因子(BDNF)がその受容体であるTrkBを介してセメント芽細胞の分化を調節し歯周組織再生に有用であることが明らかとなっていた。申請者は、本研究においてBDNFの活性化ドメインの模倣化合物であるLM22A-4が同様にセメント芽細胞のTrkBシグナルを制御することによって分化誘導を促進することを明らかにした。

この成果はInternational Immunopharmacologyに掲載された。

研究成果の概要(英文)：It is previously reported that Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) stimulates cementoblast differentiation via its high affinity receptor, TrkB. In this present study, an applicant has discovered that small molecule BDNF mimetic, LM22A-4, also activates TrkB signaling cascade in cementoblast.

This result has been published in International Immunopharmacology.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、神経細胞のみならず、様々な細胞の増殖・分化をその高親和受容体である TrkB を介して制御することが知られている。これまでに、BDNF が TrkB-ERK シグナル伝達経路を介して歯周組織再生を促進することを、*in vivo*, *in vitro* の研究において明らかにしてきた(Takeda *et al.* 2005 *Tissue Eng*, Kajiya *et al.* 2008 *J Biol Chem*, Matsuda *et al.* 2012 *J Cell Physiol*)。一方、ごく最近になって、*in silico* スクリーニングの結果、BDNF の TrkB 活性化ドメインと類似構造体である化学物質 LM22A-4 が同定され、この LM22A-4 が神経系の細胞の TrkB を活性化し、神経保護作用を示すことが報告された(Massa SM *et al.*, 2010 *J Clin Invest*)。

2. 研究の目的

上記の事実に基づき、BDNF 模倣化合物である LM22A-4 が歯周組織において TrkB-ERK シグナリングを活性化し、歯周組織再生を促進すると仮説を立てた。そこで、本研究では LM22A-4 のセメント芽細胞の分化に対する影響、およびその分子機構を明らかとするために実験を行った。

3. 研究の方法

供試細胞は hTERT を導入し株化した不死化セメント芽細胞様細胞株 (human cementoblast-like cells, HCEMs) (Kitagawa *et al.* 2006 *Bone*)を用いた。HCEMs に LM22A-4 (5 μM)を各種時間作用し、骨・セメント関連タンパク (Osteopontin (OPN), Alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC) mRNA 発現をリアルタイム PCR にて、石灰化物形成能を Alizarin-red 染色にて、TrkB の構造変化を免疫沈降法にて、リン酸化 ERK およびリン酸化 Akt の発現をウェスタンブロッティング

法にて、ERK の局在を共焦点顕微鏡にて解析した。また、シグナル伝達経路の検討のため、Trk の阻害剤である K252a (100nM)、MEK-ERK 阻害剤である U0126(10μM)、もしくは PI3K-Akt 阻害剤である LY294002(5μM) は LM22A-4 作用の 30 分前に添加した。

4. 研究成果

LM22A-4 は HCEMs における OPN, ALP, OC mRNA 発現を時間依存的に上昇させ、そのピークは 6 時間から 12 時間の間に認められた。ドーズコースの検討においては、0.5 ~ 5μM の LM22A-4 が BDNF と同等以上の OPN, ALP, OC mRNA 発現上昇効果を示した。また LM22A-4 刺激が骨分化誘導培地にて培養されたセメント芽細胞の石灰化を促進することが Alizarin-red 染色および OPN, OC mRNA 発現の上昇によって示された(図 1)。

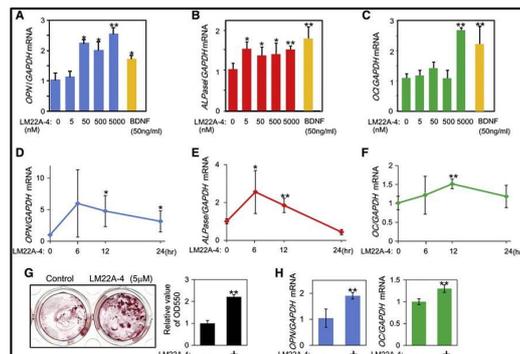


図 1. BDNF 模倣化合物 LM22A-4 はセメント芽細胞の石灰化を促進する

また LM22A-4 作用 10 分後に、HCEMs において、TrkB のリン酸化、およびアダプター蛋白である Shc, GRB2, SOS1 との結合が確認された(図 2)。

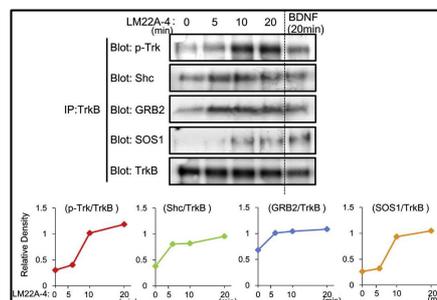


図 2. BDNF 模倣化合物 LM22A-4 はセメント芽細胞の石灰化を促進する

ト芽細胞の TrkB 受容体を活性化する

LM22A-4 刺激がリン酸化 ERK の発現量を上昇させ、そのリン酸化は TrkB 阻害剤 K252a 前処理によって抑制された。さらに LM22A-4 刺激は ERK の核内への集積を促進した(図 3)

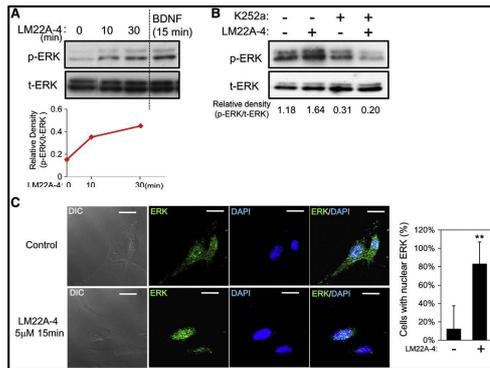


図 3 .LM22A-4 は TrkB を介して ERK シグナルを活性化する

また ERK 阻害剤である U0126 添加が、LM22A-4 によって促進した ERK のリン酸化および OPN mRNA 発現の上昇を抑制した (図 4)

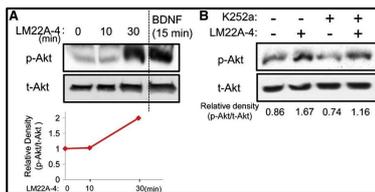


図 4 . LM22A-4 による OPNmRNA 発現の上昇は ERK シグナルを介する

さらに LM22A-4 刺激がリン酸化 Akt の発現量を上昇させ、そのリン酸化は TrkB 阻害剤 K252a 前処理によって抑制された。(図 5)

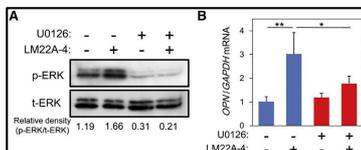


図 5 .LM22A-4 は TrkB を介して ERK シグナルを活性化する

また Akt 阻害剤である LY294002 添加が、LM22A-4 によって促進した Akt のリン酸化および OPN mRNA 発現の上昇を抑制した (図 6)

6)

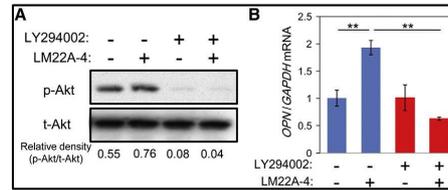


図 6 .LM22A-4 による OPNmRNA 発現の上昇は Akt シグナルを介する

上記の結果から、BDNF 模倣化合物である LM22A-4 が TrkB-ERK/Akt シグナル伝達経路を活性化することによって、セメント芽細胞の分化を制御することが明らかとなった(図 7)。LM22A-4 はセメント芽細胞の硬組織形成を促進することによって歯周組織再生を誘導する可能性が示唆された。

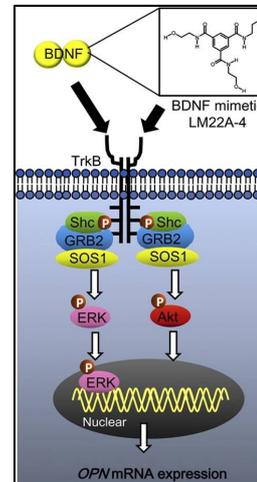


図 7 .LM22A-4 によるセメント芽細胞分化制御のメカニズム

サイトカインである BDNF(分子量 13.5kDa)と比較して、LM22A-4 は分子量 0.3kDa と非常に小さな分子であり、化学合成可能であるため、良好な組織浸透性や、安全かつ安価に合成されるなどの利点を有するため、サイトカイン療法に代わる、より有望な組織再生治療薬となり得る可能性が考えられる。

これらの結果は International Immunopharmacology に掲載された。

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 1 件)

1. Mikihito Kajiya, Kei Takeshita, Mizuho Kittaka, Shinji Matsuda, Kazuhisa Ouhara, Katsuhiro Takeda, Takashi Takata, Masae Kitagawa, Tsuyoshi Fujita, Hideki Shiba, and Hidemi Kurihara, BDNF mimetic compound LM22A-4 regulates cementoblast differentiation via the TrkB-ERK/Akt signaling cascade, International Immunopharmacology, peer review article, 19 (2014) 245-252

[学会発表](計 2 件)

1. Mikihito Kajiya, Hideki Shiba, Kazuhisa Ouhara, Katsuhiro Takeda, Mizuho Kittaka, Takashi Takata, Masae Kitagawa, Hidemi Kurihara, Small Molecule BDNF mimetic regulates cementoblast differentiation via TrkB signaling, International Association of Dental Research, 2013, 20th Mar, Seattle, USA

2. 加治屋幹人、柏井圭、竹下慶、Nguyen Quoc Truong、高田隆、北川雅恵、藤田剛、柴秀樹、栗原英見、低分子 BDNF 模倣化合物 LM22A-4 は TrkB シグナルを介してセメント芽細胞の分化を制御する、日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会(第 139 回)2013 年 6 月 27 日、福岡、日本

6. 研究組織

(1)研究代表者

加治屋 幹人 (Mikihito Kajiya)
広島大学・大学病院・助教

研究者番号：00633041

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：