

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463196

研究課題名(和文) ヒト歯根膜におけるリゾリン脂質シグナルと歯根吸収メカニズムの解明

研究課題名(英文) Lysophosphatidic acid is involved in a cellular signaling of human periodontal ligament and tooth resorption

研究代表者

岡山 三紀(okayama, miki)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：30382500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯根膜線維芽細胞ではLPA1とLPA6の2つの受容体の強い発現とLPA合成酵素 lyso-PLDの発現が確認された。LPA刺激によりERK1/2のリン酸化が誘導された。マウス歯胚胎生14.5日齢でLPA5を除く全てのLPA受容体の発現、胎生18日齢で全てのLPA受容体の発現が確認された。In situ hybridization法により、胎生12日齢で歯蕾形成上皮と接する間葉にLPA1受容体の強い発現が認められ、胎生18日齢の鐘状期歯胚咬頭頂付近では、上皮のエナメル芽細胞分布部位にも観察された。LPAシグナルは歯の発生から歯根膜の細胞シグナル伝達まで広く制御に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of LPA receptors, synthetic enzymes of LPA and the intracellular signaling by LPA in human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs). The results showed a strong expression of LPA1, LPA6, and lyso-PLD in hPDLFs. There was LPA induced phosphorylation of ERK1/2 in the hPDLFs. We also analyzed the expression of LPA receptors in mouse tooth germs at the cap and bell stages by RT-PCR, and found that all LPA receptors were expressed during tooth development. Further, we also analyzed LPA1 in mouse tooth germs using in situ hybridization and determined LPA1 expression in the dental mesenchyme at the initial stage and in both the mesenchyme and epithelium from the bud to the bell stages. These results suggest that LPA signaling would play an important role in tooth development and periodontal ligament functions.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：リゾリン脂質 ヒト歯根膜 歯根吸収

## 1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療において矯正力が負荷される組織には、歯周組織（歯根膜、セメント質、歯肉、歯槽骨）と歯髄がある。この中で歯根膜は、歯周組織への栄養供給を行うと同時に、力学的負荷に対する緩衝材としての役割も担い、さらにメカニカルストレスを感知するセンサーとして機能しているのではないかと考えられている。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、Cyclooxygenase-2 (COX-2) が誘導される事を明らかにした。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(IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IGF-1、TGF- $\beta$ 、osteopontin、PTH-R など)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 Ca<sup>2+</sup> channel (VSCC) や Volume sensitive Ca<sup>2+</sup> channel (MSCC) のCa<sup>2+</sup>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。細胞膜は脂質2重層からなり、外層はフォスファチジルコリン(PC)が豊富で極性が、また内層のリン脂質は 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(青木淳賢、実験医学, 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合成酵素群が結合し、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DNAマクロアレイ、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、力学的負荷依存的に発現が上昇した。以上から、力学的負荷が誘導するLPAシグナルが強く示唆され、LPAシグナルが力学的負荷を受容する第5番目の経路で、歯根吸収・骨リモデリング・歯の移動に関与していることに着想した。

## 2. 研究の目的

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LPAを誘導し、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、歯も移動・歯根吸収メカニズムを明らかにする。それによって歯根吸収のない歯の移動をより的確に行うための基礎情報を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

メカニカルストレス負荷によるLPA合成と遊離の検討: ヒト歯根膜細胞を、伸展・圧縮可能なシリコンチャンパーまた、コラーゲンをコートした12 wellの細胞dish上で培養する。メカニカルストレス負荷方法: シリコンチャンパーにCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養後、任意の伸展・圧縮力を付与する。生理的

に近い同一条件下で圧迫側・牽引側のメカニカルストレスに応答するLPA群および関連遺伝子群を選択的、網羅的に検索し同定する。低速遠心機を用いて、1Gから100Gまで負荷依存性的、5分から数日までの時間依存的に重力を負荷する。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。LPA産生酵素のsiRNAを歯根膜細胞に導入し酵素をノックダウンさせ、歯根膜で実際に機能する産生酵素の同定を行う。LPA受容体の解析：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し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。細胞内シグナルの測定は細胞内Ca<sup>2+</sup>測定、ERKのリン酸化の解析を行う。LPA受容体のsiRNAを歯根膜細胞に導入し酵素をノックダウンさせ、歯根膜で実際に機能するLPA受容体の同定および確認を行う。LPA産生とLPA受容体のカップリングの解析：歯根膜細胞で作用するLPA産生酵素とLPA受容体をそれぞれノックダウンし、同様の結果が得られるかを解析する。他のLPA産生酵素やLPA受容体の発現ベクターを導入したとき、細胞内シグナルの増強効果が見られないことを確認する。

#### 4. 研究成果

歯根膜線維芽細胞におけるLPA受容体とLPA合成酵素のmRNA発現の検討：LPAの受容体のmRNA発現を検討するために、LPA1 - 6のそれぞれに特異的なプライマーを用いてRT-PCR法によりmRNAでの発現を検討した。その結果図1Aに示すように、LPA1とLPA6の強い発現が認められ、LPA3とLPA4に僅かな発現が認められた。LPA2とLPA5の発現は認められなかった。またゲノムDNAを鋳型にしたPCRで特異的発現が確認され（図1C）、RT (-) ではバンドが認められなかった（図1B）ことから、これらの増

幅された発現は特異的であることが確認された。

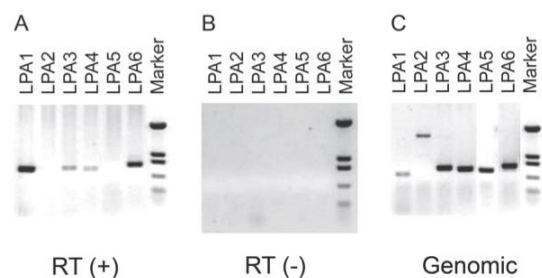
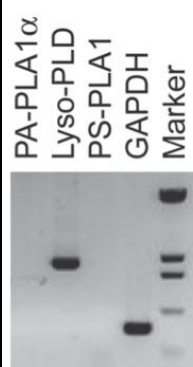


図1 ヒト歯根膜線維芽細胞におけるLPA受容体発現

次に、LPA合成に関する検討を行った。LPA

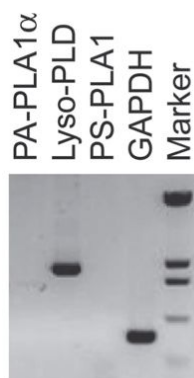


RT (+)

られなかった。

図2 ヒト歯根膜線維芽細胞におけるLPA合成酵素

ヒト歯根膜線維芽細胞における細胞内シグナルの検討：歯根膜線維芽細胞への重力負荷ではATPの誘導によって、ERK1 / 2がリン酸化される。その結果をコントロールとして、ATP



RT (+)

図3 ATP添加、重力負荷、LPS添加によるERK1 / 2のリン酸化

の合成経路にはlyso-PLDの他、ホスファチジン酸 (PA) からPA-PLA1 α によって合成される経路もあるため、2つの合成酵素、lyso-PLDとPA-PLA1 α の発現検討を

RT-PCR法にて行った。その結果、図2に示すように、

lyso-PLDの強い発現が認められたが、PA-PLA1 α は認め

添加と重力負荷をウエスタン解析した結果、図3に示すようにERK1 / 2のリン酸化が確認された。これらと同じタイムコースでLPAの添加によりERK1 / 2のリン酸化を検討した結果、ATP添加と重力負荷とほぼ同様なリン酸化結果が得られた。

Gタンパク質共役型受容体の阻害剤である Suramin を添加し、ATP 添加、重力負荷、LPA 添加を行った結果、いずれの場合も同様にリン酸化は消失したことから、これらのリン酸化反応は全てGタンパク質共役型受容体を介したもので、ATP と LPA は共にシグナル分子(アゴニスト)として歯根膜線維芽細胞で機能していることが明らかになった。

マウス胎児歯胚におけるLPA受容体現検討：マウスの胎生14.5日齢と胎生18日齢の歯胚からRNAを抽出し、RT-PCRによりLPA受容体の発現の検討を行った。その結果図4Aに示すように、胎生14.5日齢では、LPA5を除く全ての受容体の発現が認められ、特にLPA4の発現が強く認められた。次に図4Bに示すように、胎生18日齢では全ての受容体の発現が認められた。胎生14.5日齢と胎生18日齢での発現を比較すると、胎生18日齢でLPA1, LPA2, LPA6の発現が増加し、LPA3の発現が減少し、日齢の経過で受容体のサブタイプの発現に変化が生じることが認められた。

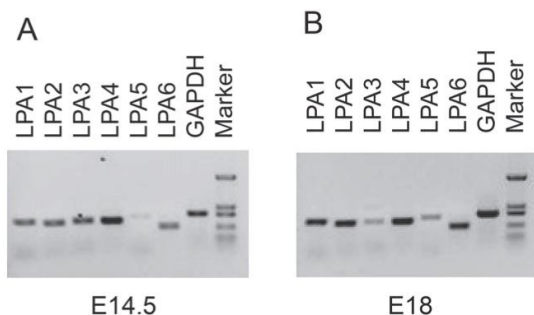


図4 マウス歯胚におけるLPA受容体のRT-PCR

マウス胎児歯胚におけるLPA1の発現部位の検討：In situ hybridization法によるLPA1の歯胚における発現分布の検討を行った。図5Aに示すように、胎生12日齢において、LPA1は歯蕾を形成しつつある上皮と接する間葉に強い発現が認められた(図5A)。蕾状期以降は歯小嚢とエナメル器に発現がみられ(図5B, C, E, F)、胎生18日の鐘状期歯胚では内エナメル上皮とエナメル芽細胞および象牙芽細胞にのみ発現が見られるようになった(図5H)。

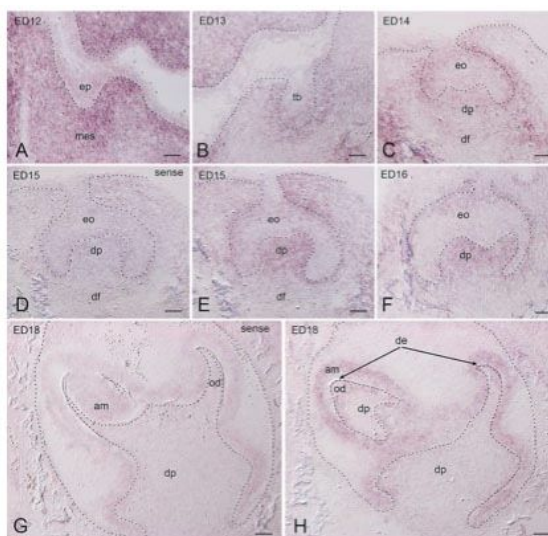


図5 マウス歯胚組織でのLPA1のin situ hybridization

### 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 6 件)

A Case report of crowding with unilateral Angle II malocclusion associated with asymmetric molar relationship. 中尾友也, 岡山三紀, 溝口到 北海道矯正歯誌 vol.44: 33-40, 2016. (査読有り)

Lysophosphatidic acid is involved in a cellular signaling of periodontal ligament and tooth development. Toshiya ARAKAWA, Nobuko OBARA, Miki OKAYAMA, Nattakarn HOSIRILUCK, Itaru MIZOGUCHI, Kazuharu IRIE, Taishin TAKUMA 北医療大歯誌 35-2:23-32, 2016. (査読有り)

Open bite case treated by using temporary anchorage device. Okayama miki, Oka yukie, Mizoguchi itaru 北医療大歯誌 35-2:37-44, 2016. (査読有り)

Gravity loading induces adenosine triphosphate release and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in human periodontal ligament cells. Ito M, Arakawa T, Okayama M, Shitara A, Mizoguchi I, Takuma T. J Invest Clin Dent. 2013 Jun 24. doi: 10.1111/jicd.12049. PMID: 23798356 (査読有り)

Isoproterenol stimulates transient SNAP23-VAMP2 interaction in rat parotid glands. Takuma T, Shitara A, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi I, Tajima Y. FEBS Lett. 2013 Mar 18;587(6):583-9. doi:

10.1016/j.febslet.2013.01.039. Epub 2013 Feb 1. PMID: 23380067 ( 査読有り )

VAMP4 is required to maintain the ribbon structure of the Golgi apparatus. Shitara A, Shibui T, Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi I, Sakakura Y, Takuma T. Mol Cell Biochem : 2013 Aug;380(1-2):11-21. doi: 10.1007/s11010-013-1652-4. PMID: 23677696 ( 査読有り )

〔学会発表〕(計 8件)

第 88 回日本生化学会大会 第 38 回日本分子生物大会(2015.12.1~12.4 神戸)SNAP23 および Syntaxin4 ノックアウト HAP-1 細胞における遺伝子発現と細胞機能の解析 荒川俊哉、岡山三紀、溝口到、田隈泰信

第 74 回日本矯正歯科学会学術大会 (2015.11.18~11.20 福岡) 歯科矯正用アンカースクリューを用いた上顎大白歯の圧下により治療した症例 岡由紀恵、岡山三紀、溝口到

第 73 回日本矯正歯科学会学術大会 (2014.10.20~22 千葉県幕張) 抜去歯バイオリサイクルシステムを用いた 2 症例 岡山三紀、村田勝、溝口到 (学術大会優秀発表賞)

第 87 回 日本生化学会学術大会 (2014 年 10 月 15 日~18 日 京都) TALEN を用いた SNAP23 タンパク質の KO と機能解析 田隈泰信、荒川俊哉、岡山三紀、溝口到

第 87 回 日本生化学会学術大会 (2014 年 10 月 15 日~18 日 京都) 歯根膜の機能維持におけるメカニカルストレスとオステオポンチンの役割 荒川俊哉、岡山三紀、溝口到、田隈泰信

第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (2014 年 9 月 25 日(木) - 9 月 27 日(土)福岡) SNARE タンパク質の TALEN を用いた機能解析 田隈泰信、荒川俊哉、岡山三紀、溝口到

第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (2014 年 9 月 25 日(木) - 9 月 27 日(土)福岡) ヒト歯根膜線維芽細胞の機能維持におけるオステオポンチンとメカニカルストレスの役割 荒川俊哉、岡山三紀、溝口到、田隈泰信

第 86 回日本生化学会(2013.9 月 11 日~13 日 神奈川県 横浜市) TALEN を用いた SNARE タンパク質の機能解析 荒川俊哉、岡山三紀、溝口到、田隈泰信

〔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)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
岡山 三紀 (Okayama, miki)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号 : 30382500  
(2) 研究分担者  
荒川 俊哉 (Arakawa, toshiya)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号 : 40306254  
田隈 泰信 (Takuma, taishin)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 40095336  
(3) 連携研究者  
池田 和貴 (Ikeda, kazutaka)  
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医  
科学研究センター・上級研究員  
研究者番号 : 10466732

(4) 研究協力者 ( )