

平成22年4月19日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592391

研究課題名（和文）

歯根膜の伸展刺激に応答する fibulin がオキシタラン線維の制御に果たす役割

研究課題名（英文）

Fibulin upregulated by mechanical strain controls the formation of oxytalan fibers.

研究代表者

敦賀 英知 (TSURUGA EICHI)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：30295901

研究成果の概要（和文）：歯根膜のオキシタラン線維は、その形成機構など不明な点が多い。本研究では、fibulin-5 に着目し、ヒト歯根膜由来線維芽細胞に伸展力を付与した際のfibulin-5 とオキシタラン線維との関係を解析した。その結果、伸展刺激によりfibulin-5 の発現は増加し、オキシタラン線維が凝集し、線維の量が増加した。Fibulin-5の発現を抑制すると、オキシタラン線維束が疎になった。更に、インテグリン $\alpha v \beta 3$  の阻害により線維の形成は抑制された。これらの結果より、伸展刺激により発現が促進するfibulin-5 は、インテグリン $\alpha v \beta 3$  とともに、歯根膜におけるオキシタラン線維形成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）：Human periodontal ligaments (PDL) contain oxytalan fibers. However, the behavior of oxytalan fibers is unclear. We hypothesized that the fibulin-5 contributes to oxytalan fiber formation under mechanical strain. Fibrillin-1 contains the RGD motif. We subjected PDL fibroblasts to stretching strain. The oxytalan fibers coalesced by stretching. Fibulin-5 colocalizes on oxytalan fibers. Stretching increased fibulin-5 gene expression. The fibulin-5 suppression inhibited the coalescence of oxytalan fibers. The treatment with the integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonist inhibited fibrillin-1 deposition. These results suggest that fibulin-5 may control the formation of oxytalan fibers bundles in PDL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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。これらの構成分子の産生と分解はダイナミックな調節を受けており、その代謝異常と病変は組織破壊となる。しかし、従来、歯周組織における弾性系線維の役割およびその形成・分解機構は明らかにされていなかった。歯周組織の弾性系線維は、部位局在性を有する。すなわち、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。歯根膜におけるオキシタラン線維は、歯根膜線維に直交することにより（歯軸に平行）、歯根膜組織の機能維持に寄与していると考えられているが、その詳細は不明である。これまでに、歯周組織の特異性を利用して、細胞培養系を用いて、オキシタラン線維の形成および分解機構を明らかにしてきた。その結果、歯根膜線維芽細胞がオキシタラン線維の主成分である fibrillin を合成、分泌しており培養細胞層に線維形成していることを明らかにした。近年、組織再生を促進することで注目されている fibulin-5 が、fibrillin と結合能を有することが報告された。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機能的なオキシタラン線維を疑似するシステムを確立した。この培養系を用いて歯根膜のオキシタラン線維の形成機構を解析できると考えた。

### 2. 研究の目的

fibulin-5 が、fibrillin と結合能を有することが報告され、インテグリン  $\alpha v \beta 3$  のリガンド部位（RGD）を有する。これより、mechanical stress により、細胞膜上のインテグリン  $\alpha v \beta 3$  と fibulin-5 が、fibrillin を主成分とするオキシタラン線維の太さと方向性の調節をしていると考えられる。そこで、この仮説を検証するため、すなわち、オキシタラン線維の歯根膜における特異性を明らかにすること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週間付与する。遺伝子解析として fibrillin-1 および fibrillin-2 の Northern blot 法を用い、また Western blot 法にてタンパク質沈着量および培養細胞層の免疫染色を行った。

(2) 歯根膜線維芽細胞がインテグリン  $\alpha v \beta 3$  を発現しているか生化学的に解析した。次に、歯根膜線維芽細胞の培養系にインテグリン  $\alpha v \beta 3$  特異的阻害剤  $\alpha v \beta 3$ -specific antagonist（Cyclo[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val]RGDfV）を濃度依存的に添加し、オキシタラン線維の形成量を fibrillin-1 を指標に解析した。ネガティブコントロールとして（Cyclo[Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val]RADfV）peptide を添加し、同様に解析した。

(3) 歯根膜線維芽細胞の培養系で、fibulin-5 の局在を免疫染色で解析した。また、RNA 干渉法を用いて、fibulin-5 の発現を抑制した際の、オキシタラン線維の形成を解析した。解析は、fibrillin-1 を指標に、生化学的および免疫細胞化学的分析を行った。

(4) 歯根膜線維芽細胞の培養系で、fibulin-5 の局在を免疫染色で解析した。また、RNA 干渉法を用いて、fibulin-5 の発現を抑制した際の、オキシタラン線維の形成を解析した。解析は、fibrillin-1 を指標に、生化学的および免疫細胞化学的分析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 伸展群、非伸展群とも fibrillin-1、-2 の遺伝子発現は変化しなかった。しかし、タンパク質沈着量はいずれも30%有意に増加した。また、免疫染色により、伸展することによりオキシタラン線維は伸展軸に垂直に配列し凝集した。

(2) 抗  $\alpha v$  抗体を用いた Western blot 法により、歯根膜線維芽細胞がインテグリン  $\alpha v \beta 3$  を発現していることが示された（図1）。また、 $\alpha v \beta 3$  特異的阻害剤の添加により、オキシタラン線維の形成量は濃度依存的に減少した。すなわち、fibrillin-1 の沈着量は antagonist の濃度 1  $\mu\text{M}$  では60%、antagonist 5  $\mu\text{M}$  では90%の減少が認められた（図2）。

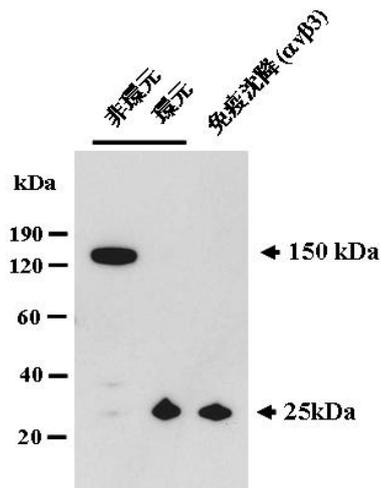


図 1

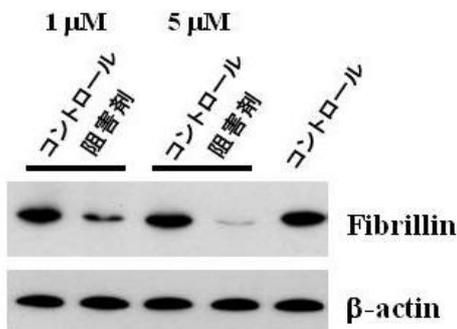


図 2

(3) 形成されたオキシタラン線維上に fibulin-5 が共存していた (図 3)。また、fibulin-5 の抑制に伴い、fibrillin-1 の沈着量が有意に減少し、免疫染色においても fibrillin-1 の染色性が低下した。

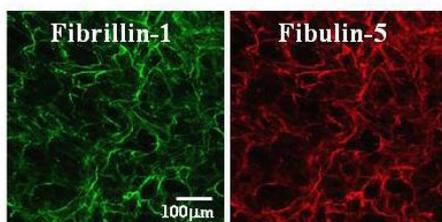


図 3

(4) 細胞伸展刺激により fibulin-5 の遺伝子発現は 20% 増加した。また、fibulin-5 の発現抑制に伴い、オキシタラン線維は方向

性を失い、凝集した線維の線維密度が低下した (図 4)。

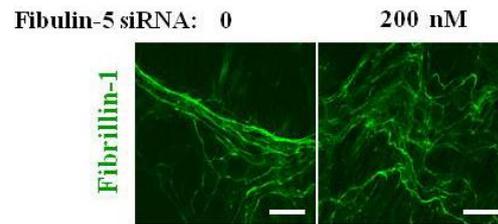


図 4

これまで組織再生に密接に関係する fibulin-5 は、弾性線維上に規則的に配列し、弾性線維の機能的配列の構成に寄与することが報告されてきた (Nakamura, T. *et al.*, *Nature* 415:171, 2002, Yanagisawa, H. *et al.*, *Nature* 415:168, 2002)。しかし、エラスチンの沈着を伴わないオキシタラン線維と fibulin-5 との関係は不明であった。合成ペプチドを用いた研究で、fibulin-5 は、fibrillin と結合能があることが報告されたことから、我々は、*in vitro* の系を用い、メカニカルな力を付与することにより歯根膜組織により擬似した条件で fibulin-5 とオキシタラン線維形成との解析を試みた。(1) ~ (4) の結果より、fibulin-5 とインテグリン  $\alpha v \beta 3$  がオキシタラン線維の方向と太さの成長に関与しているのではないかと考えられた。オキシタラン線維は、歯周組織のみならず、心臓や肺、骨膜など全身に分布し、重大な疾患とも密接に関連している。歯周組織を用いたこれらの実験系と本研究の成果は、弾性系線維性疾患の解明と治療への基礎を築くものとする。

#### 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 4 件)

1. Tsuruga E, Nakashima K, Ishikawa H, Yajima T, Sawa Y. Stretching modulates oxytalan fibers in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, **44**, 170-174, 2009. 査読有
2. Tsuruga E, Sato A, Ueki T, Nakashima K, Nakatomi Y, Ishikawa H, Yajima T, Sawa Y. Integrin  $\alpha v \beta 3$  regulates microfibril assembly in human

periodontal ligament cells. *Tissue and Cell*, **41**, 85-89, 2009. 査読有

3. Nakashima K, Tsuruga E, Hisanaga Y, Ishikawa H, Sawa Y. Stretching stimulates fibulin-5 expression and controls microfibril bundles in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, **44**, 622-627, 2009. 査読有
4. Hisanaga Y, Nakashima K, Tsuruga E, Nakatomi Y, Hatakeyama Y, Ishikawa H, Sawa Y. Fibulin-5 contributes to microfibril assembly in human periodontal ligament cells. *Acta Histochem Cytochem*, **42**, 151-157, 2009. 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 敦賀 英知、LTBP-2・fibulin-5 複合体によるオキシタラン線維形成の制御、第51回日本歯科基礎医学会、2009年9月11日、新潟コンベンションセンター
2. 敦賀 英知、Integrin  $\alpha v \beta 3$  regulates microfibril assembly in human periodontal ligament cells.、第50回日本歯科基礎医学会、2008年9月23日、TOC有明コンベンションホール
3. 敦賀 英知、Fibulin-5 は微細線維上に存在し、微細線維の形成を調節する、第49回歯科基礎医学会学術総会、2007年8月31日、北海道大学学術交流会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

敦賀 英知 (TSURUGA EICHI)  
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：