

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 14 日現在

機関番号：15401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21792074
 研究課題名（和文） 歯周病原性菌（*A. a*）の LPS による骨芽細胞分化阻害のメカニズムの解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of osteoblast differentiation inhibition by LPS derived from *A. a*.
 研究代表者
 太刀掛 銘子（MEIKO TACHIKAKE）
 広島大学・病院・病院助教
 研究者番号：90530775

研究成果の概要（和文）：*A. a* の LPS が骨芽細胞分化を抑制し，*A. a* の LPS が細胞間ネットワークを阻害することを明らかにした。また，*A. a* の LPS による細胞間ネットワーク阻害と関連があるのは Cx43 の細胞内の局在の変化であり，免疫染色の結果とあわせても LPS が Cx43 の細胞膜への局在を阻害することで細胞間ネットワークを障害する可能性が高いと考えられ，細胞膜への輸送経路が障害されているのではないかと推察された。

研究成果の概要（英文）：

Lipopolysaccharide (LPS) derived from *A. gregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a*) suppressed osteoblast differentiation and LPS derived from *A. a* inhibits osteoblast differentiation through an intercellular network. LPS was a potential inhibitor. Alterations in intracellular Cx43 localization may be involved in intercellular network inhibition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学，矯正・小児系歯学

キーワード：歯周病原性菌，小児，細胞間ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

A. a による歯槽骨の破壊は，LPS による破骨細胞の分化促進が主たる原因であると説明されている。一方 *A. a* の LPS による骨形成系，すなわち骨芽細胞の分化へ影響について

は十分な検討がなされていない。

私はこれまでの研究で，*A. a* の LPS が宿主免疫システムを介することなく，直接的に骨芽細胞の分化を抑制するという結果を得た。この結果は *A. a* による歯槽骨の喪失が，骨吸収

の促進のみならず、骨分化の抑制にも影響を受けていることを示唆している。さらに LPS は骨芽細胞の細胞間ネットワークを抑制することで分化を阻害することが強く示唆された。細胞間ネットワークは、connexin と呼ばれるタンパクが細胞膜表面に形成するチャネル (gap junction) を通して、隣り合う細胞同士が直接細胞質内のセカンドメッセンジャーを交通させることで行われており、骨芽細胞の分化と増殖を調節していることが報告されている (Gramsch B, Exp Cell Res. 2001; Lecanda F, Mol Biol Cell. 1998)。現在までに骨芽細胞の分化と細胞間ネットワークの関係は数多く報告されており、いまだ詳細なメカニズムは不明なものの、細胞間ネットワークからの情報が MEK/ERK を介して核内に伝達され、DNA 結合タンパク Sp1 の活性化により骨分化マーカーの発現が起こることが分かってきた。

2. 研究の目的

私はこれまでの研究により *A. a* の LPS が骨芽細胞分化を抑制し、かつ細胞間ネットワークも抑制することを明らかにした。細胞間ネットワーク阻害と分化抑制の相関関係については、すでにいくつかの報告がなされていることから、本研究課題においては以下の点に着目して検討を行い、

(1) 細胞間ネットワークを司る connexin の発現に及ぼす LPS の影響

(2) connexin の細胞内局在に及ぼす LPS の影響

(3) LPS による分化抑制は TLR-4 を介して行われるか

(4) LPS により骨芽細胞内に引き起こされる signal transduction

以上から *A. a* の LPS による細胞間ネットワーク阻害のメカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞間ネットワークを司る connexin43 の発現に及ぼす LPS の影響の検討

以下の二つの方法で connexin43 の発現を検討する。

① connexin43 mRNA の定量

コンフルエントになったマウス由来正常骨芽細胞 MC3T3-E1 に 10nM LPS を添加し、24 時間培養後、Trizol 試薬を用いて RNA の抽出を行う (冷却遠心器: 設備希望)。mRNA の定量は PRISM7700 (Applied Biosystems: 現有設備) を用いて Real-time RT-PCR によって検討する。RT-PCR 反応には TaqMan EZ RT-PCR kit を用いる。

② connexin43 のタンパク発現の検討

A. a の LPS による処理後の骨芽細胞の connexin43 のタンパク発現をウエスタンブロットにて検討する。10nM LPS を添加し、24 時間培養した細胞に、1mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1mM disodium ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA.2Na) を含む 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) を加え、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離し、氷冷下で細胞を超音波 (UR-20P: 現有設備) で 30 秒間処理したものを総タンパク試料とする。そして、20% SDS の可溶化画分を回収し、ウエスタンブロットにて connexin43 の発現およびリン酸化を分析する。一次抗体にはウサギ由来抗 connexin43 抗体、二次抗体にはペルオキシダーゼ結合ヒツジ由来ウサギ抗体を用いる。発色には ECL-plus Western Blotting Detection Kit を用いる。この実験により、LPS 処理した細胞に存在する全 connexin 量および connexin のリン酸化の状態が明らかとなる。

(2) connexin の細胞内局在に及ぼす LPS の影響の検討

以下の二つの方法で connexin の細胞内局

在を検討する。

①膜タンパク画分に含まれる connexin の検討

細胞膜表面に露出しているタンパクのみを EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin in PBS (Pierce) を使用して回収し、膜タンパク画分とする。この試料を用いてウェスタンブロットを行うことで、connexin の局在が明らかとなる。

② connexin に対する免疫染色を行う MC3T3-E1 を 8 well glass slide (Lab-Tek II Chamber Slide System, Nalge Nunc international) に 30% コンフルエントとなるように播種し、6 時間培養後、10nM LPS を加え 24 時間培養する。ウサギ由来抗 connexin43 抗体を加え 4°C で 12 時間反応し、ついで二次抗体 Cy2 標識 goat polyclonal to rabbit IgG H&L (Abcam) を加え室温で 30 分間反応させる。Fluoromount-G にて封入し、倒立位相差蛍光顕微鏡 (Nikon : 現有設備) にて検討する。

4. 研究成果

私はこれまでの研究で *A. a* の LPS を MC3T3-E1 の培地に 1 nM および 10 nM 添加して培養し、LPS が分化へ及ぼす影響を検討し、5% *A. a* 培養上清中の LPS 濃度とほぼ等しい 10 nM *A. a*-LPS 添加時の阻害は 5% *A. a* 培養上清の阻害とほぼ同程度で、*A. a* の LPS が骨芽細胞分化を抑制することを明らかにした。5% *A. a* 培養上清添加に相当する 10 nM LPS を添加した場合にも *A. a* 培養上清を加えた場合と同様に細胞間ネットワークは阻害され、細胞間ネットワークも抑制することを明らかにした。細胞間ネットワーク阻害と分化抑制の相関関係については、すでにいくつかの報告がなされている。そこで、MC3T3-E1 を細

胞間ネットワークを司る Cx43 の発現に及ぼす *A. a* 培養上清の影響の検討と Cx43 の細胞内局在に及ぼす *A. a* 培養上清の影響の検討を行い、LPS による細胞間ネットワーク阻害と関連があるのは Cx43 の細胞内の局在の変化であり、免疫染色の結果とあわせても LPS が Cx43 の細胞膜への局在を阻害することで細胞間ネットワークを障害する可能性が高いと考えられた。Cx43 の細胞膜への局在が阻害されるためには、Cx43 の粗面小胞体からゴルジ装置を経て細胞膜に至る輸送の段階の阻害か、あるいは細胞膜から細胞質への取り込みの段階の活性化の二つの可能性が考えられる。細胞膜上の Cx43 が細胞質内に輸送される場合には Cx43 のリン酸化が生じるとの報告があるが、今回のウェスタンブロットの結果からは Cx43 のリン酸化は認められなかったことから、細胞膜から細胞質への取り込みの段階が活性化している可能性は少なく、細胞膜への輸送経路が障害されているのではないかと推察された。

今回の結果は小児における侵襲性歯周炎の発症メカニズムの限定的な一面を検討したに過ぎないが、これまでに十分検討がなされていなかった *A. a* の LPS の骨形成系への影響を明らかにしたものである。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太刀掛 銘子

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：90530775

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：