

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 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：2015～2016

課題番号：15H06437

研究課題名(和文) BDNFの細胞増殖、細胞死促進という二面性を用いた非外科的歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Distinction between cell proliferation and apoptosis signals regulated by brain-derived neurotrophic factor in human periodontal ligament cells and gingival epithelial cells

研究代表者

柏井 桂 (Kashiwai, Kei)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：20760747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脳由来神経栄養因子(BDNF)の細胞増殖促進・アポトーシス促進という相反する効果を利用し、歯周組織構成細胞を制御することで、非外科的な歯周組織再生療法を開発することである。

研究期間中に、BDNFが歯周靭帯細胞において、TrkB-ERKシグナリングを介して細胞増殖を促進することを明らかにした。一方、BDNFは歯肉上皮細胞の細胞増殖を抑制し、それはp75-JNKシグナリングを介したものであることを見出した。

これらの成果をJournal of Cellular Biochemistryに論文発表し、現在ビーグル犬を用いた前臨床試験に移行出来ている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish non-surgical periodontal tissue regenerative therapy by using BDNF. To this end, we investigated the effect of BDNF on cell proliferation and apoptosis in human periodontal ligament cells and human gingival epithelial cells and explored the molecular mechanism in vitro.

As a result, we revealed that TrkB-ERK signaling regulates BDNF-induced cell proliferation, whereas p75-JNK signaling plays roles in cell apoptotic and cytostatic effect of BDNF. Overall, BDNF activates periodontal ligament cells proliferation and inhibits the gingival epithelial cells growth via the distinct pathway. Based on these findings, in vivo study using beagle dog is ongoing to establish the non-surgical periodontal tissue regenerative therapy.

研究分野：歯周治療

キーワード：脳由来神経栄養因子 歯根膜細胞 歯肉上皮細胞 細胞増殖 アポトーシス ERK JNK

1. 研究開始当初の背景

歯周炎のために喪失した歯周組織に対し、残存組織中の細胞の増殖・分化能を活性化させるサイトカインを利用した歯周組織再生療法の開発研究が盛んに行われている。当研究室では、歯胚の発生に関与するといわれる脳由来神経栄養因子(BDNF)に着目し、BDNFの投与が歯周組織再生を促進することを明らかにしてきた(Takeda et al, 2005, Tissue Eng)。しかしながら、この投与方法は歯肉弁を剥離し肉芽組織を郭清する外科処置との併用であり、侵襲性の高い治療であった。一方、そのような侵襲性の観血処置を行わない場合、必然的にスケーリング・ルートプレーニング(SRP)を中心とした治療が選択される。SRPは感染源と不良肉芽組織を除去するが、その主な治癒形態は歯肉上皮細胞のダウングロースを原因とした上皮付着であり、セメント質・歯周靭帯から構成される再付着は得られない。そこで、申請者は、上皮細胞のダウングロースを阻害し、一方で歯根膜細胞の性質を活性化できる薬剤を併用すれば、SRPのみでも歯周組織再生を促進できると着想した。重要なことに、BDNFが神経細胞の増殖を促進する一方で、増殖抑制やアポトーシスを誘導するといった二面性を有していることが報告されている。

2. 研究の目的

上記の事実にもとづき、細胞増殖・抑制の相反する効果を発揮するBDNFを利用すれば、非外科的手技で歯周組織再生が達成できると仮説を立てた。そこで、本研究ではBDNFが歯根膜細胞および歯肉上皮細胞の細胞増殖のおよびアポトーシスに対する影響を調べ、その分子メカニズム機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト歯周靭帯細胞株(HPL cells)およびヒト歯肉上皮細胞株(OBA9)におけるBDNFの受容体 TrkB と p75 のタンパク発現を

western blottingにて解析した。BDNFの細胞増殖に与える影響をBrdU取り込み量にて評価し、アポトーシスの誘導はcleaved caspase3の発現レベルをwestern blottingにて評価し、さらにTUNEL染色にて死細胞数を定量した。さらにそのシグナル伝達経路としてERKおよびJNKのリン酸化量をwestern blottingにて解析し、TrkB siRNA、p75 siRNA、もしくは各種阻害剤の添加にてそれらの阻害実験を行った。さらに、HPL cellsにはp75強制発現ベクターを導入し、p75受容体の下流で生じるシグナル経路とTrkB受容体に制御されるシグナル経路とのクロストークについて解析した。

4. 研究成果

BDNF刺激が、HPL cellsの細胞増殖能を向上させたのに対し、OBA9の細胞増殖には影響を与えなかった。一方、BDNFはOBA9のアポトーシスを促進したのに対し、HPL cellsにおいては細胞死を誘導することはなかった(図1)。

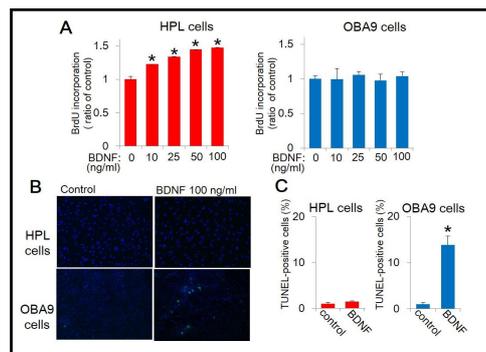


図1. BDNFの細胞増殖及びアポトーシスへの影響

HPL cellsはTrkBを強く発現している一方、p75の発現はわずかであった。OBA9ではTrkB、p75の両者とも強く発現していた。またBDNF刺激はHPL cellsにおいては主にERKのリン酸化を促進したのに対し、OBA9においてはJNKおよびERKのリン酸化を促進させた(図2)。

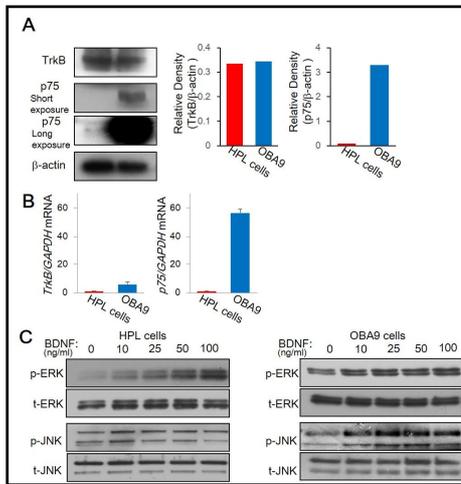


図 2. BDNF の受容体発現パターンおよび ERK、JNK のリン酸化

次に、OBA9 の BDNF によって誘導されるアポトーシスが、ERK の阻害剤 U0126 添加で影響を受けなかったのに対し、JNK 阻害剤 SP600125 によって阻害された(図 3)。さらに、TrkB siRNA は BDNF 誘導性のリン酸化 JNK 発現およびアポトーシスに影響を与えなかったのに対し、p75 siRNA 導入がその JNK のリン酸化及びアポトーシスを抑制した(図 4)。

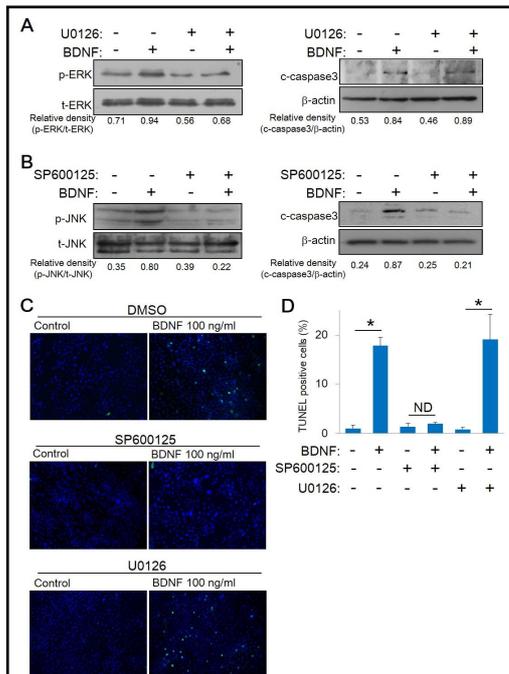


図 3. BDNF 誘導性のアポトーシスは JNK 阻害剤によって抑制される

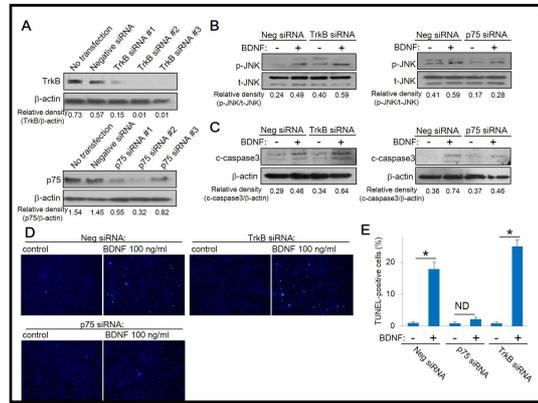


図 4. BDNF 誘導性のアポトーシスは p75-JNK シグナリングを介する

さらに、BDNF によって JNK のリン酸化およびアポトーシスが亢進しなかった HPL cells に p75 を強制発現させたところ、BDNF 刺激によってリン酸化 JNK の発現及びアポトーシスが上昇した(図 5)。

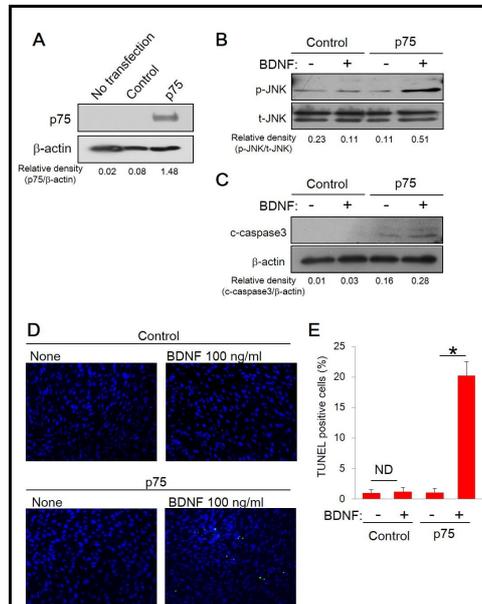


図 5. p75 過剰発現する HPL cells において BDNF 刺激は JNK のリン酸化及びアポトーシスを促進する

一方、HPL cells の BDNF によって誘導される細胞増殖が、ERK 阻害剤 U0126 の添加によって明らかに阻害された。また、TrkB siRNA の導入によって BDNF によって促進する ERK のリン酸化および細胞増殖の亢進が抑制された(図 6)。

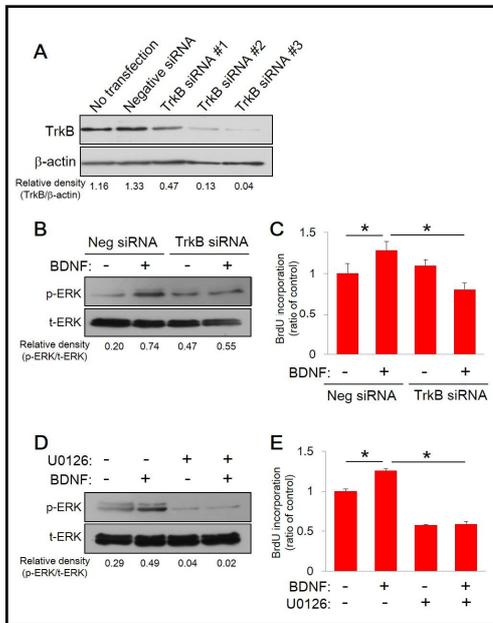


図 6. BDNF 誘導性の細胞増殖は TrkB-ERK シグナリングを介する

上記の結果から、BDNF は歯根膜細胞においては TrkB-ERK シグナリングを介し細胞増殖を促進することが明らかとなった。一方、歯肉上皮細胞においては、p75 受容体の発現レベルが高く、そのため、BDNF 刺激によって p75-JNK シグナリングが活性化することでアポトーシスが誘導されることが示された。

BDNF はこのような細胞ごとに相反する機能を有するため、歯根膜細胞を増殖させつつ、歯肉上皮細胞のダウングロースを抑制できるサイトカインであり、非外科的手技での歯周組織再生療法に利用できる可能性が考えられる。

これらの成果は Journal of Cellular Biochemistry 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)(査読有り)

Kei Kashiwai, Mikihito Kajiya, Shinji Matsuda, Kazuhisa Ouhara, Katsuhiro Takeda, Takashi Takata, Masae Kitagawa,

Tsuyoshi Fujita, Hideki Shiba, Hidemi Kurihara.

Distinction between cell proliferation and apoptosis signals regulated by brain-derived neurotrophic factor in human periodontal ligament cells and gingival epithelial cells. J Cell Biochem. 2016 Jul;117(7):1543-55

[学会発表](計 1 件)

Kei Kashiwai, Mikihito Kajiya, Tsuyoshi Fujita, Shinji Matsuda, Katsuhiro Takeda, Hideki Shiba, Hidemi Kurihara.

Distinction between cell proliferation and apoptosis signals regulated by brain-derived neurotrophic factor in human periodontal ligament cells and gingival epithelial cells. 6th Hiroshima Conference 2015-10/23, Hiroshima, Japan

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏井 圭 (Kei Kashiwai)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：20760747

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()