

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20577

研究課題名(和文) 歯根膜におけるScleraxisのメカノトランスダクション機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanotransduction of Scleraxis expression in the periodontal ligament

研究代表者

川津 正慶 (KAWATSU, MASAYOSHI)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：70712925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養ヒト歯根膜細胞に伸展力を負荷し、腱・靭帯の分化および成熟に必須な転写因子 Scleraxis (Scx)の発現とTGF-βシグナリングの関係を解析した。伸展力を負荷して3時間後にScxの遺伝子発現が有意に上昇した。同時にp-Smad3の活性化亢進も認めた。TGF-beta type I receptorの阻害薬であるSB-431542もしくはSmad3のリン酸化を阻害するSIS3により、p-Smad3の活性化は濃度依存的に抑制された。さらにScxの発現も抑制された。従って歯根膜でのScx発現調節には伸展力によるTGF-β/Smadシグナリングの活性化が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied tensile force to human PDL fibroblasts to analyze relationship between Scleraxis (Scx), a transcription factor for tendon/ligament cell lineages, and TGF-β/Smad signaling. Scx mRNA expression was significantly up-regulated at 3 h. We also detected activation of p-Smad3. Pretreatment with SB-431542 or SIS3 showed not only inhibition of phosphorylation of Smad3 in a dose-dependent manner but also down-regulation of Scx mRNA. In conclusion, up-regulation of Scx mRNA in response to tensile force is regulated via TGF-β/Smad signaling.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Scleraxis 歯根膜細胞 メカノトランスダクション

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯槽骨とセメント質の二つの硬組織の間に存在し、主に type I collagen 線維から構成される線維性組織である。生理的狀態下においては歯の支持、感覚の受容、血管網による栄養の供給、および歯周組織の維持・再生に役割を果たしている。また歯根膜は、咬合などのメカニカルストレスを受容し緩衝作用を発揮することにより、歯と周囲組織をこれらの刺激から保護する。歯に矯正力を負荷すると、歯根膜では牽引および圧迫領域が生じる。牽引側では骨芽細胞分化が亢進し、骨形成が進行する。圧迫側では破骨細胞分化が亢進し歯槽骨の吸収が起こり、歯槽骨のリモデリングにより歯槽骨中を歯が移動する。このように、歯根膜中の歯根膜細胞はメカノセンサーを有しており、牽引力や圧迫力といったメカニカルストレスに反応して、様々な反応を引き起こされることが知られている。

Scleraxis (Scx)は胚発生に伴い腱・靭帯形成領域で発現する basic helix-loop-helix 型転写因子である。Scx のノックアウトマウスでは腱が低形成となることが明らかとなっており、Scx は腱細胞の分化および成熟において重要な役割を担っていると考えられている。腱や靭帯も、常にメカニカルストレスがかかる組織であり、メカニカルストレスに対して様々な反応を示すことが明らかになっている。マウスのアキレス腱を用いた実験モデルでは、腱組織を途中で切断し、ストレスフリーの状態にすることで腱細胞での Scx の発現が低下することから、生理的なメカニカルストレスが Scx の発現維持に必要であるという報告されている。しかしながら、腱・靭帯における外的な牽引と圧迫のメカニカルストレスに反応して、Scx の発現がどのように変化するか、またシグナル伝達経路の網羅的解析には至っていない。近年、申請者らのグループは靭帯組織である歯根膜でも、Scx が発現することを見出している。マウスの矯正的

歯の移動モデルでは、歯根膜の牽引側で Scx の発現が上昇し、圧迫側でその発現レベルが低下するのを認めている。さらに、牽引側では活性型 transforming growth factor-beta1 (TGF-β1)の検出と TGF-β シグナリング分子である Smad3 のリン酸化の亢進が認められた。牽引力による Scx の発現には、TGF-β/Smad シグナリング経路を介して調節されていることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの *in vivo* の実験を踏まえ、Scx 発現のメカノトランスダクション機構を、伸展装置を用いて明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜細胞培養

本研究で供用された歯根膜細胞は、臨床研究倫理委員会の承認に基づいて、東北大学歯学部附属病院を受診した健全な患者より同意を得た後、矯正治療上、小臼歯抜歯が必要と判断した抜去歯から採取した。抜去歯を phosphate buffer saline (PBS)で洗浄してから歯根中央部の歯根膜組織を採取して、メスにて細切後、アウトグロース法に従って 35 mm 培養ディッシュに播種した。10% fetal bovine serum (FBS) およびペニシリン含有 alpha-modified minimum essential medium (α-MEM)を使用して培養した 11 から 17 日間培養した後、0.05% trypsin-0.1% EDTA 処理を施してディッシュから剥がして継代操作を行った。培地交換を 3 日おきに行った。すべて 37 °C、5% CO₂ 条件下にて培養を行った。

(2) 伸展力負荷実験

歯根膜細胞を fibronectin でコーティングされたシリコンチャンバーに播種し、10% FBS およびペニシリン含有 α-MEM を使用してコンフルエントになるまで 3 日間培養した。細胞を播種して 24 時間後に培地交換を行った。細胞

伸展装置(STREX Co.)を用いて、歯根膜細胞に伸展力を負荷した。

(3) 阻害実験

TGFβ/Smad シグナリング分子の活性化と *Scx* の発現の関連を解明するために阻害実験を行った。阻害剤には SB-431542 および SIS3 を使用した。伸展力を負荷後、サンプルを回収して total RNA およびタンパク質を精製し、リアルタイム PCR にて *Scx* の遺伝子発現と western blotting にて Smad3 のリン酸化について解析した。

(4) リアルタイム PCR

抽出した total RNA を鋳型とし、逆転写反応を行い、cDNA を合成した。PCR 反応液は cDNA、酵素、forward と reverse のプライマーを含み、合計液量は 25μl であった。全てのサンプルの遺伝子発現量は glyceralhyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) によって補正し、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ を用いて算出した。PCR 反応は、95、5 秒および 60、30 秒間の条件で 40 サイクル行った。

(5) Western blotting

タンパク回収サンプルを sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルバッファーに溶解して加熱し、SDS ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した後、メンブレンに転写した。転写したメンブレンはブロッキングした後、4 で一晩、一次抗体反応を行った。洗浄後、二次抗体を用いて常温で 1 時間インキュベートした後、chemiluminescence detection reagent を用いて、ペルオキシダーゼ活性を検出した。

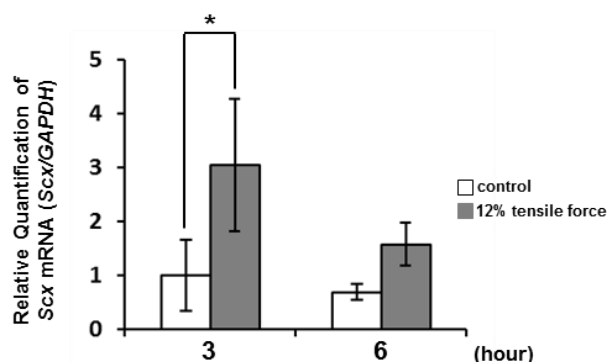
4. 研究成果

(1) 伸展力負荷による歯根膜細胞での *Scx* の発現の経時的変化

シリコンチャンバーに伸展力を負荷して 3 時間後に *Scx* の発現レベルが有意に上昇した

(図 1)。

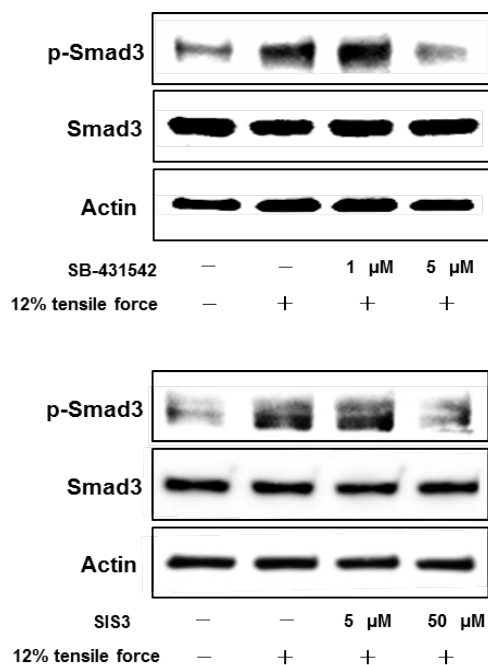
図 1



(2) 伸展力負荷による *Scx* の発現は TGF-β シグナリングの活性化により制御される

シリコンチャンバーに伸展力を負荷して 3 時間後の回収サンプルを解析した結果、伸展力により活性化された p-Smad3 の発現が、SB-431542; 1 μM および SIS; 5 μM では変化が認められなかったが、SB-431542; 5 μM および SIS; 50 μM では低下した (図 2)。

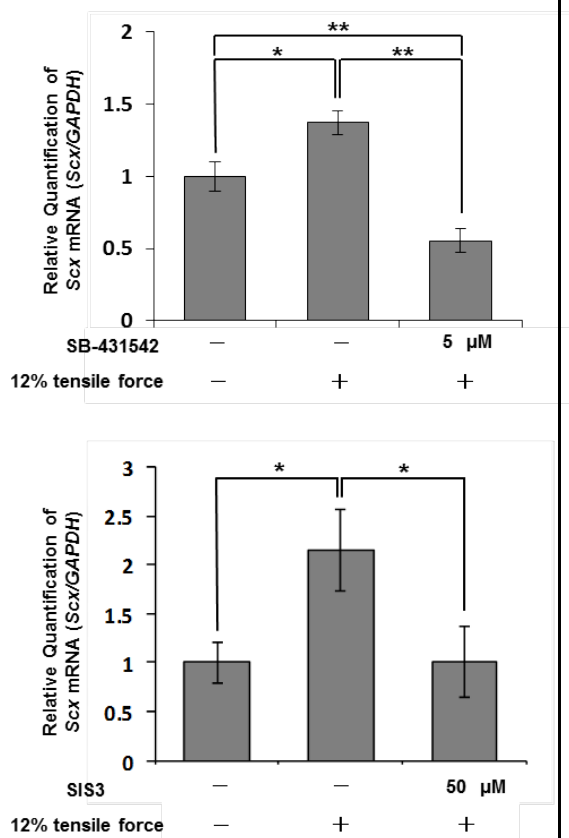
図 2



シリコンチャンバーに伸展力を負荷して 3 時間後の *Scx* の遺伝子発現についても SB-431542; 5 μM および SIS; 50 μM により抑制

されることを認めた(図3)。従って歯根膜での Scx発現調節には伸展力によるTGF- β /Smadシグナリングの活性化が関与していることが明らかとなった。

図3



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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

川津 正慶 (KAWATSU, MASAYOSHI)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：70712925