

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09848

研究課題名(和文)ALP活性に依存するリン酸による歯根膜線維芽細胞の分化機序に関する基礎研究

研究課題名(英文)Basic Study on the Differentiation Mechanism of Periodontal Ligament Fibroblasts by Phosphoric Acid dependent on ALP Activity

研究代表者

石川 美佐緒 (Ishikawa, Misao)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90582445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜の再生治療やアンキローシスの原因解明には、歯根膜線維芽細胞の基礎データの構築が必須である。我々は、アルカリフォスファターゼ活性により高いリン酸濃度を維持している歯根膜組織の特異的な環境に着目し、歯根膜線維芽細胞のナトリウム依存性リン酸トランスポーターを介したリン酸の細胞内流入がシグナルとなり骨芽細胞分化が生じるという研究仮説を立て、その検証を行った。その結果、細胞外のリン酸濃度よりも、リン酸の細胞内流入が因子となり骨芽細胞分化マーカーを発現し、石灰化が生じることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜線維芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性とリン酸に着目し、ナトリウム依存性リン酸トランスポーターを介したリン酸の細胞内流入が引き金となって細胞の形質転換が起こり、石灰化が生じることが明らかになった。

これは同時に、細胞外リン酸濃度の恒常性が破綻し、リン酸濃度のわずかな上昇によって細胞が分化誘導され異所性石灰化が生じる可能性を示しており、学術的にも意義のある結果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：Basic data on periodontal ligament fibroblasts are essential for regenerative treatment of the periodontal ligament and for elucidating the cause of ankylosis. We focused on the specific environment of periodontal ligament tissue that maintains high phosphate levels by alkaline phosphatase activity. We then hypothesized that an increase in intracellular phosphate via the sodium-dependent phosphate co-transporters in periodontal ligament fibroblasts is the factor that leads to osteoblast differentiation. These results showed that an increase in intracellular phosphate concentration, rather than extracellular phosphate concentration, caused the expression of osteoblast markers and the production of calcification.

研究分野：口腔組織学

キーワード：歯根膜線維芽細胞 ナトリウム依存性リン酸トランスポーター リン酸 アルカリフォスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

矯正治療や歯周治療において重要なポイントとなってくるのは、歯周組織の中でも「歯根膜組織」の再生である。高齢社会の日本において、歯の喪失に伴う QOL の低下防止や向上対策に歯根膜組織の再生・治療に寄与する歯根膜線維芽細胞の基礎データが必須である。また、矯正治療や小児歯科治療の咬合誘導を行う際に遭遇する問題として、アンキローシス歯が挙げられる。これまでアンキローシスは外傷との関係が指摘され、その外傷による炎症が起因となりセメント質と歯槽骨の癒着が生じるとされているが、臨床の現場では、既往歴が無く多数のアンキローシス歯で悩んでいる患者さんに遭遇することがあり、このような歯根膜組織の現象について説明が難しく原因究明が急がれている。

歯周組織である歯根膜は線維芽細胞が主な細胞成分で、この線維芽細胞は形態学的に紡錘形を呈し、ターンオーバーやコラーゲン線維の代謝も早い細胞とされている。そして、最も特徴的な性質は、多くの研究において報告されてきた骨芽細胞やセメント芽細胞に分化する multipotency を示すことである (Takayanagi et al. Nature 408, 2000, Zhou et al. J Periodontal 79, 2008)。このことが、真皮や歯肉の線維芽細胞とは大きく異なる性質である。また、矯正治療における歯の移動時には、この歯根膜線維芽細胞による迅速なコラーゲン代謝が必須の条件であるため、骨芽細胞同様に高いアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を示すことが分かっている (Nakamura et al. Histochem Cell Biol 121, 2004)。

生体におけるリン酸 (Pi) は細胞膜の構成成分であり、タンパク質や生体内基質のリン酸化に関わり、骨の石灰化に必須の栄養素である。この Pi は、腎臓や消化器、骨などの組織の間で厳密に調整されている。そして、Pi は細胞膜の ALP 活性によりピロリン酸 (ePPi) から変換され、ナトリウム依存性リン酸トランスポーター (Pit-1, Pit-2) を介して細胞内に流入する。近年、腎障害に伴う血清リン濃度の増加により血管平滑筋細胞内へ Pi が流入し、Pi 濃度の上昇により骨芽細胞様細胞へ分化誘導が起こり、異所性石灰化である動脈硬化を惹起することが分かっている (Shuichi et al. Circ Res. 87, 2000, Xianwu et al. Circ Res. 98, 2006, Duala et al. PLOS one 8, 2013)。

歯根膜は他の部位に比べ ePPi が豊富に存在し、歯根膜線維芽細胞は高い ALP 活性を持つことからその働きにより他の歯周組織よりも Pi 濃度の高い状態で恒常性を維持していると考えられている (B. L. Foster et al. Calcif tissue Int. 78, 2006)。しかし、現時点では、この特異的な環境におかれている歯根膜線維芽細胞のナトリウム依存性リン酸トランスポーター (Pit-1, Pit-2) の発現や Pit-1、Pit-2 を介した Pi の細胞内流入の有無、細胞内 Pi 濃度に応じた遺伝子発現変化について報告した研究がない。そこで、multipotency を示す歯根膜線維芽細胞において細胞内 Pi 濃度の上昇がシグナルとなって骨芽細胞分化に関係する遺伝子発現調整がされていることが推測できる。

2. 研究の目的

歯根膜の再生治療やアンキローシスの原因解明には、歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞への分化機序について基礎データの構築が必須である。我々は、ALP 活性により高いリン酸濃度を維持していると考えられる歯根膜組織の特異的な環境に着目し、歯根膜線維芽細胞のナトリウム依存性リン酸トランスポーター (Pit-1, Pit-2) を介した Pi の細胞内流入がシグナルとなり骨芽細胞分化が生じるという研究仮説を立て、ヒト歯根膜線維芽細胞を用いた培養実験を中心にその仮説の検証を行うことを目的とする。

具体的な研究目標として次の3つを設定している。

(1) リン酸のナトリウム依存性リン酸トランスポーターを介した歯根膜線維芽細胞内流入について解析する。

このことから、歯根膜線維芽細胞の Pi 濃度変動について、Pi のナトリウム依存性リン酸トランスポーターを介した細胞内流入の有無について解明し、Pi と歯根膜組織のおかれている環境について考察できる。

(2) 歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞分化マーカー上流の転写因子の発現について、(1) の結果から Pi 濃度と比較検討する。

(3) 歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞分化マーカーの発現解析からその分化機序を考察する。Pi の細胞内流入と骨芽細胞分化マーカーとその上流の転写因子の経時的変化について解明し、また、歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞への分化機序について考察する。

以上の検証結果から、歯根膜線維芽細胞の特徴的な性質である multipotency について基盤となるデータの構築がなされ、歯周治療や歯の移動に伴う歯周組織の再生について新しい観点から捉えることが可能となり、未だ不明な点の多いアンキローシスの原因について新しい見解を提示できると考えている。

3. 研究の方法

(1) Piの細胞内濃度測定

はじめに、通常培地 (10% FBS + RPMI + streptomycin(100 μl/ml)/penicillin(100IU/ml) (Stand.M) で培養したヒト歯根膜線維芽細胞 (PDLf) の形質発現の確認のため、PDLfの発現が報告されている指標遺伝子やナトリウム依存性リン酸トランスポーター (Pit-1, Pit-2) の発現について、RT-PCRにて確認した。

次に、Piの細胞内外の濃度変更の測定 (Shuichi J., Circ Res. 87, 2000) のため、Stand.M や石灰化誘導培地 (1.0% ascorbic acid, 0.2% hydrocortisone, 2.0% - glycerophosphate) (Calc.M)、ナトリウム依存性リン酸トランスポーターの競合拮抗薬 (1.0mM フォスフォノノ酸) (PFA) を添加した石灰化誘導培地 (Calc.M + PFA) で培養したPDLfのPi濃度変動の測定を行った。

(2) 石灰化物産生の確認

PDLfの石灰化物産生の確認のため、Stand.M、Calc.M、Calc.M + PFAで4週間培養後、石灰化物の産生をアリザリンRed S染色、von Kossa染色により確認した。

(3) 骨芽細胞分化マーカーの測定

培養期間中のPi濃度変動測定と骨芽細胞分化マーカーの発現量測定をReal time RT-PCRにて比較、解析を行い、タンパク解析をWestern blotで確認した。

(4) 高リン酸濃度条件下での石灰化物産生の確認

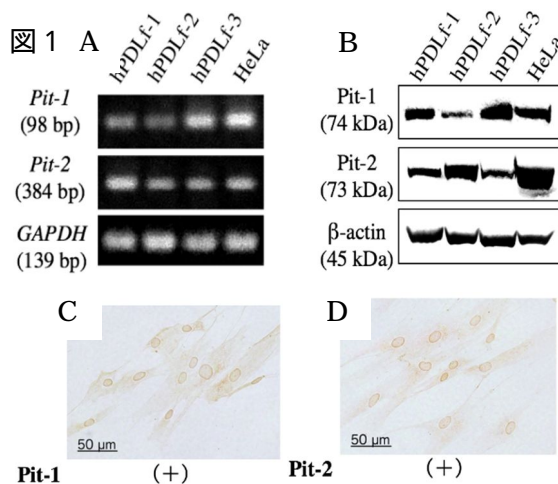
Stand.M や Calc.M や Calc.M + PFA または ALP 阻害薬 (200 μM レバミゾール) を加えた培養液に、高リン酸濃度 (1.5mM Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄) に調整した培養液で2週間培養を行い、石灰化物の産生をアリザリン Red S 染色により確認した。

(5) モデルラットを用いた *in vivo* 研究

高リン血症モデルラット (Sueyoshi et al. Clin Exp Nephrol 23, 2019) の血清Pi濃度を確認後、歯根膜を含めた口腔組織の組織学的観察と Pit-1, Pit-2 の局在について免疫組織化学染色にて観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯根膜線維芽細胞 (PDLf) の Pit-1, Pit-2 の発現について

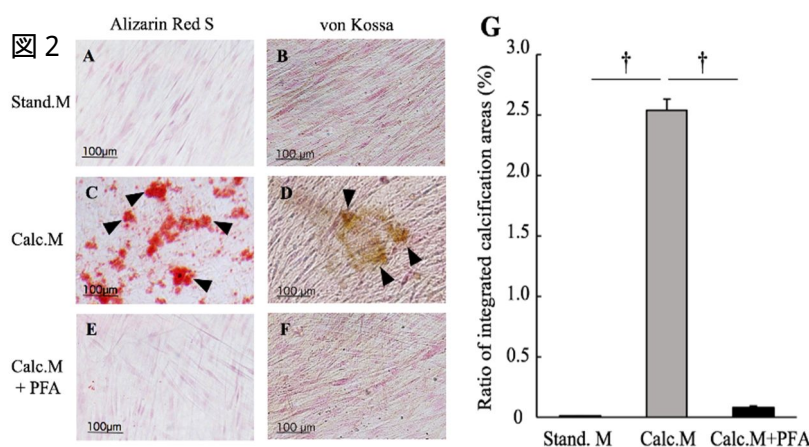


初めに、本研究で用いるヒトPDLf (hPDLf-1, 2, 3) について RT-PCR にて、ALPL, SPP1, OMD, COL1A1, PLAP-1, Periostin の発現が確認できたため、本研究ではこれらの細胞の5~7継代を使用することに決定した (Nomura et al. Histochem. Cell Biol. 137. 2012)。

次に hPDLf-1, 2, 3 の Pit-1, Pit-2 の発現を確認するため RT-PCR (図1A)、Western blot (図1B)、免疫組織化学染色 (図1C, D) を行い、それらの発現を認めた。

このことから、細胞間や Pit-1, Pit-2 の発現量に差がみられるものの PDLf で恒常的な発現があることが分かった。

(2) 石灰物産生について



hPDLf を3種の培養液 (Stand.M, Calc.M, Calc.M + PFA) で4週間培養し、石灰化物産生の有無をアリザリン Red S 染色、von Kossa 染色により確認した。その結果、Calc.M では石灰化物を確認できたが (図2C, D, G)、Calc.M + PFA ではほとんど確認できなかった (図2E-G)。

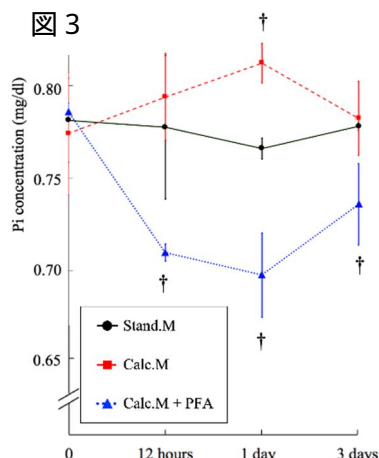
このことから、PDLf のナトリウム依存性リン

酸トランスポーターを阻害することで石灰化物の産生を抑制していることが分かった。

(3) Pi のナトリウム依存性リン酸トランスポーターを介した細胞内流入について

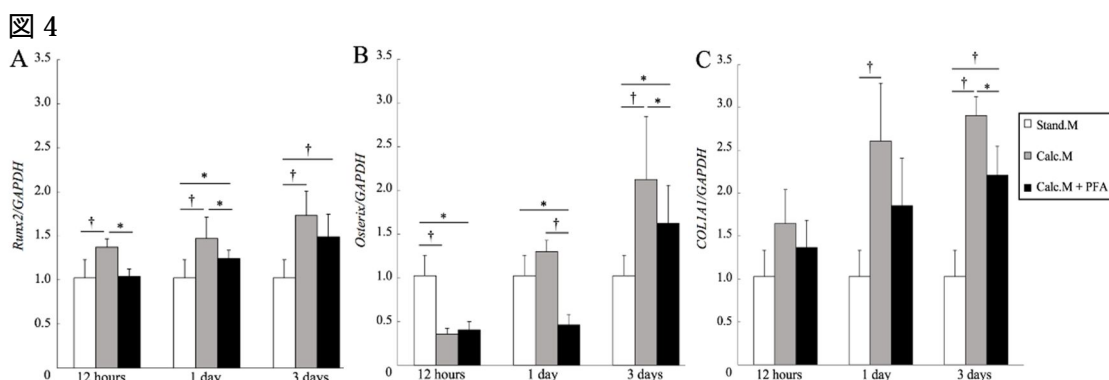
3種の培養液にて培養した PDLf の3日目までの細胞内 Pi 濃度を経時的に測定した。その結果、Stand.M で培養した細胞ではほとんど変化はみられなかったが、Calc.M で培養した細胞の1日後では有意な Pi 濃度の増加をみとめた。また、Calc.M + PFA で培養した細胞は12時間後から3日目まで有意な Pi 濃度の減少をみとめた (図3)。

このことから、Calc.M で培養した際には細胞内への著しい Pi 流入が生じていることが分かり、PFA を添加した際には細胞内への Pi 流入が減少していることから、PDLf においてナトリウム依存性リン酸トランスポーターを介し Pi 流入が生じていることが明らかになった。

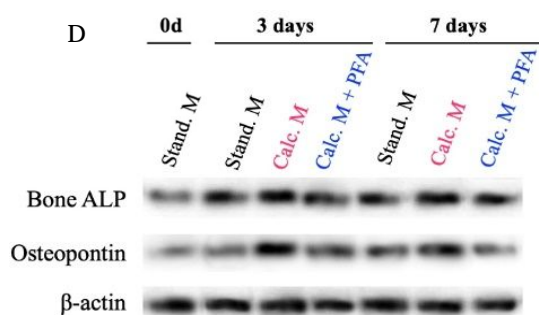


(4) 骨芽細胞分化マーカー発現について

3種の培養液にて3日目まで培養した PDLf から Total RNA を抽出し Real time RT-PCR にて骨芽細胞マーカーである *Runx2*, *Osterix*, *COL1A1* の発現を解析した。



その結果、Calc.M で培養した細胞の *Runx2* は12時間後から有意に上昇し、1日後では *Osterix* と *COL1A1* の有意な上昇がみられた (図4 A-C)。しかしながら、Calc.M + PFA で培養した細胞は Calc.M で培養した細胞と比較し、すべての発現が下回っていた (図4 A-C)。



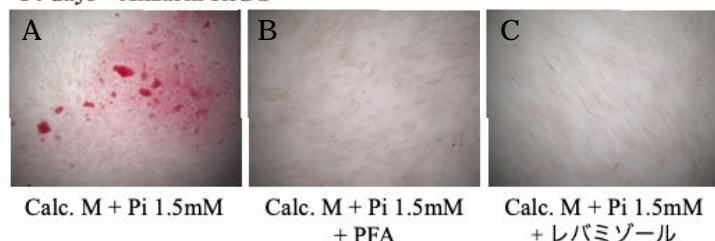
また、3種の培養液にて7日目まで培養した PDLf からタンパク抽出をおこない Western blot にて骨芽細胞分化マーカーである Bone ALP, Osteopontin の発現を解析したところ、両者ともに Calc.M + PFA で培養した細胞では発現量が抑えられていることが分かった。

以上のことから、Calc.M で培養した細胞は骨芽細胞に分化誘導されていることが分かり、Calc.M + PFA で培養した細胞ではその分化誘導が著しく抑制されていることが分かった。

(5) 高リン酸濃度条件下での石灰化物産生について

ヒト血清の Pi 濃度は 0.9mM が正常値であり、1.46mM 以上が高リン血症と定義されている。本研究で使用していた培養液の Pi 濃度は 0.9mM であったため、高リン血症を想定し Na_2HPO_4 と NaH_2PO_4 の添加による培養液 (Pi 1.5mM) を作製し、さらに、1.0mM PFA や 200 μM レバミゾールの添加をおこない14日間培養を行い、石灰化物産生についてアリザリン Red S 染色により確認した。

図5 14 days Alizarin Red S



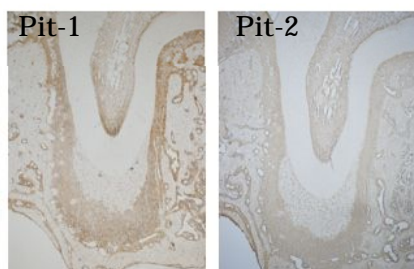
さらに、1.0mM PFA や 200 μM レバミゾールの添加をおこない14日間培養を行い、石灰化物産生についてアリザリン Red S 染色により確認した。

その結果、Calc.M で培養を行った際、石灰化物の確認ができるのは4週間後であったのに対し(図2C,D,G)、Calc.MにPi 1.5mMを添加し培養をした細胞では10~14日後には石灰物を確認することができた(図5A)。しかし、PFAやレバミゾールを添加し培養した細胞ではほとんど石灰化物を確認することができなかった(図5B,C)。

このことから、ヒト高リン血症を想定した高リン酸濃度の条件下ではPDLfが早期に骨芽細胞へ分化誘導されていると考えられた。しかし、細胞外の高リン酸濃度にも関わらず、PFAやレバミゾールを添加した細胞では分化誘導は著しく抑制されているため、細胞外のPi濃度よりもナトリウム依存性リン酸トランスポーターやALP活性による影響を強く受けている可能性があることが分かった。

(6) *in vivo* 研究による、Pit-1, Pit-2 について

図6 モデルラット免疫組織化学染色



高リン血症モデルラット (Sueyoshi et al. Clin Exp Nephrol 23, 2019) を用いて歯根膜の状態を組織学的に観察し、Pit-1, Pit-2の局在について免疫組織化学染色にて観察した。

モデルラットはコントロール群と比べて血清リン酸濃度は有意に高い状態を示し、大動脈の異所性石灰化の形成も確認できた。しかし、口腔組織の組織学的観察から、本研究で焦点を当てている歯根膜組織には大きな変化は認められなかった。また、Pit-1, Pit-2発現の局在についてもコントロール群と比べて大きな変化はなかった(図6)。

以上のことから、PDLfは細胞外リン酸の濃度にも影響を受けるが、ナトリウム依存性リン酸トランスポーターを介した細胞内リン酸濃度の増加が骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を誘導していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hayakawa Y., Suita K., Ohnuki Y., Mototani Y., Ishikawa M., Ito A., Nariyama M., Morii A., Kiyomoto K., Tsunoda M., Matsuo I., Kawahara H., Okumura S.	4. 巻 72(2)
2. 論文標題 Vidarabine, an anti-herpes agent, prevents occlusal-disharmony-induced cardiac dysfunction in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Physiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-022-00826-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsuo I., Ohnuki Y., Suita K., Ishikawa M., Mototani Y., Ito A., Hayakawa Y., Nariyama M., Morii A., Kiyomoto K., Tsunoda M., Gomi K., Okumura S.	4. 巻 63(4)
2. 論文標題 Effects of chronic Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide infusion on cardiac function in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Oral Biosci.	6. 最初と最後の頁 394-400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yagisawa Yuka, Suita Kenji, Ohnuki Yoshiki, Ishikawa Misao, Mototani Yasumasa, Ito Aiko, Matsuo Ichiro, Hayakawa Yoshio, Nariyama Megumi, Umeki Daisuke, Saeki Yasutake, Amitani Yasuharu, Nakamura Yoshiki, Tomonari Hiroshi, Okumura Satoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Effects of occlusal disharmony on cardiac fibrosis, myocyte apoptosis and myocyte oxidative DNA damage in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0236547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0236547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Misao, Matsuzawa Ayami, Itohiya Kanako, Nakamura Yoshiki	4. 巻 27
2. 論文標題 Phosphate Through the Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters, Pit-1 and Pit-2 is the Key Factor of Periodontal Ligament Calcification	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.27.321	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊藤愛子, 大貫芳樹, 吹田憲治, 石川美佐緒, 松尾一郎, 早川佳男, 成山明具美, 友成 博, 奥村 敏.
2. 発表標題 咬合異常によるストレスはレニンアンジオテンシン系を介し心筋のアポトーシスを引き起こす.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾一郎, 吹田憲治, 早川佳男, 伊藤愛子, 石川美佐緒, 清本賢一, 角田通則, 大貫芳樹, 五味一博, 奥村 敏.
2. 発表標題 Porphyomonas gingivalis 由来 LPS の慢性投与下における心疾患発症メカニズムの解明.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早川佳男, 大貫芳樹, 吹田憲治, 石川美佐緒, 伊藤愛子, 松尾一郎, 清本賢一, 角田通則, 河原 博, 奥村 敏.
2. 発表標題 咬合異常により惹起された慢性交感神経刺激状態による心機能障害に対する抗ヘルペス薬(ピダラビン)の予防効果.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清本賢一, 吹田憲治, 大貫芳樹, 松尾一郎, 角田通則, 森井彰伸, 伊藤愛子, 石川美佐緒, 奥村 敏, 五味一博.
2. 発表標題 レニン-アンジオテンシン系が歯周病菌由来 LPS による心筋線維化に及ぼす影響.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成山明具美, 大貫芳樹, 吹田憲治, 伊藤愛子, 石川美佐緒, 松尾一朗, 早川佳男, 朝田芳信, 奥村 敏.
2. 発表標題 Mitf 遺伝子変異は酸化ストレスにより咬筋組織リモデリングを誘導する.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井出信次, 石川美佐緒, 豊田長隆, 下田信治, 里村一人.
2. 発表標題 急性症状を伴った顎関節ピロリン酸カルシウム結晶沈着症の1例.
3. 学会等名 第55回NPO法人日本口腔科学会関東地方部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Misao Ishikawa, Ayami Matsuzawa, Shinji Shimoda
2. 発表標題 Phosphate via the Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters is the Key Factor of Periodontal Ligament Calcification
3. 学会等名 The 9th InternationalOrthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ito A, Umeki D, Ishikawa M, Yagisawa Y, Okumura S, Tomonari H
2. 発表標題 Role of renin-angiotensin system for the development of cardiac dysfunction induced by occlusal disharmony
3. 学会等名 The 9th InternationalOrthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤愛子、大貫芳樹、梅木大輔、吹田憲治、石川美佐緒、八木澤由佳、松尾一朗、早川佳男、友成 博、奥村 敏
2. 発表標題 咬合異常によるストレスはレニンアンジオテンシン系を介し心機能に影響を及ぼす
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早川佳男、大貫芳樹、吹田憲治、石川美佐緒、伊藤愛子、松尾一朗、清本賢一、角田通則、河原 博、奥村 敏
2. 発表標題 抗ヘルペス薬（ピダラピン）は咬合異常に起因する心機能障害に対して心機能に影響を及ぼすことなく予防効果を示す
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾一朗、吹田憲治、早川佳男、清本賢一、角田通則、伊藤愛子、石川美佐緒、大貫芳樹、五味一博、奥村 敏
2. 発表標題 Porphyllomonas gingivalis由来LPSの慢性投与下における α -アドレナリン受容体シグナルを介した心機能低下に対する影響
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早川佳男、吹田憲治、大貫芳樹、石川美佐緒、伊藤愛子、八木澤由佳、松尾一朗、奥村 敏、河原 博
2. 発表標題 口腔ストレスに起因する心疾患に対する抗ヘルペス薬（ピダラピン）の予防効果
3. 学会等名 第40回日本歯科薬物療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川美佐緒、松澤綾美、下田信治
2. 発表標題 歯根膜におけるナトリウム依存性リン酸トランスポーター (Pit-1/Pit-2) の発現とその局在
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	下田 信治 (Shimoda Shinji) (30139620)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	
研究 分担者	菅崎 弘幸 (Kanzaki Hiroyuki) (30333826)	鶴見大学・歯学部・准教授 (32710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------