

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592364
 研究課題名（和文） 機械的刺激による血管内皮細胞の骨吸収抑制因子産生と骨形成における役割の解明
 研究課題名（英文） Study of mechanical tensile stress effects on the synthesis of osteoprotegerin in microvascular endothelium.

研究代表者

磯貝 恵美子 (ISOGAI EMIKO)
 北海道医療大学・歯学部・講師
 研究者番号：80113570

研究成果の概要：

矯正力により歯を移動させる際に、歯根膜に豊富に存在する微小血管は骨や歯根膜のリモデリングに重要な役割を果たす。我々は破骨細胞活性化抑制因子 (OPG) の血管内皮細胞に及ぼす作用と伸展刺激に伴う OPG の発現動態について検討を行った。OPG により、血管新生能の亢進および血管内皮細胞の著しい伸展や微小管の伸長が観察された。しかし、TNF α 刺激下、血管内皮細胞において、24 時間持続的伸展刺激による OPG 産生量の変化は認められなかった。本研究結果より、機械的刺激による歯周組織の OPG 濃度の変化に応じて血管の再構築などに作用している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：オステオプロテゲリン、マトリックス、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

1997 年に TNF (tumor necrosis factor) receptor スーパーファミリーのひとつでその過剰発現が大理石病を示すタンパクが見つかり、これを”骨を減るのを妨げるもの”という意味の osteoprotegerin(OPG) と名付けた。さらに OPG のノックアウトマウスは顕著な骨粗鬆症を示すことが報告され、そのことから OPG は骨吸収抑制活性を持つ因子と

して同定された。それ以後、OPG は破骨細胞への作用を中心に研究が進められてきた。それに加え、OPG ノックアウトマウスで血管の石灰化が著明に亢進していたために、OPG と血管の関係が注目されるようになった。

骨代謝における OPG の作用は、矯正治療の牽引側における歯槽骨形成を考える上で臨床的に重要である。そのために、歯周組織の OPG に関する研究は、破骨細胞活性抑制とい

う観点からの報告がほとんどである。しかし、現在、OPG は抗アポトーシス、血管新生亢進などいくつかの異なった作用や、癌の骨転移との関連が報告されている。

我々は歯牙の移動の際に、牽引側と圧迫側の歯肉溝滲出液の OPG 濃度が異なっているという報告に注目し、OPG が破骨細胞活性化抑制以上の役割を果たしているのではないかと考え研究を行った。

2. 研究の目的

我々は歯に機械的な刺激が加わった際に牽引側に生じる OPG の濃度の増加と血管内皮細胞の関与について明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。

- (1) 血管内皮細胞に持続的伸展力を付加した場合の、OPG の産生動態の検討。
- (2) OPG が血管内皮細胞の細胞骨格再編成および血管新生能に及ぼす作用についての検討。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

ヒト皮膚微小血管内皮細胞は(HMVEC)を生育培地である EGM-2MV を用い 25T フラスコにてコンフルエントまで培養し実験に使用した。細胞は継代数 2-5 代のものを使用した。

(2)細胞伸展実験

HMVEC をプラスチック (PL) またはフィブロネクチン(FN)、ビトロネクチン(VN) およびラミニン(LA)でコーティングしたプレート上にて 24 時間培養し、培養上清中の OPG 濃度を測定した。次に HMVEC を VN あるいは FN 上で培養し、炎症性サイトカインである TNF α を 2ng/ml の濃度で添加し STB-140(ストレックス社)にて 120%の持続伸展刺激を 24 時間かけ、培養上清中の OPG の濃度を ELISA にて測定した。

(3)蛍光染色

HMVEC をスライドチャンバーに播種し、細胞を定着させた。その後、OPG を終濃度 0 から 2000 ng/ml の濃度になるように加え、6 時間の培養の後、細胞を固定し anti-tubulin または Texas Red-X phalloidin にて染色を行った。

(4)細胞増殖実験

HMVEC を 96 穴 プレートにて OPG による細胞増殖を検討した。培地は無血清培地を使用し、必要に応じて U0126 を使用した。細胞増殖は MTT Assay の変法である Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。

(5)細胞遊走実験

HMVEC の細胞遊走能を Falcon の FluoroBock Transwell system にて測定した。下部の無血清培地には 500 ng/ml の OPG を加え、上部に細胞を加えて 18 時間培養した。その後、下部へ遊走した細胞を calcein-AM にて蛍光染色し、細胞の遊走能を蛍光強度にて決定した。

(6)血管新生実験

成長因子が含まれていないマトリゲル (BD) をコーティングした 24 穴プレートに HMVEC を播種し、必要に応じて OPG を 500 ng/ml の濃度で添加した。さらに必要に応じて、OPG を添加する前に PP1 (10 μ M) および U0126 (10 μ M)を加え、30 分前培養を行った。その後 8 時間培養した後、細胞を固定し、ギムザ染色の後、branch point を測定することにより OPG による血管新生能を評価した。

4. 研究成果

フィブロネクチン、ビトロネクチン上で培養された HMVEC の培養上清中の OPG 濃度はプラスチックまたはラミニン上で培養された HMVEC の培養上清中の OPG 濃度より有意に高いことが示された。しかし、TNF α 刺激の有無にかかわらず、伸展刺激による培養上清中の OPG 産生量の変化は、いずれのマトリックス上でも認められなかった。一方、歯の機械的刺激に伴い歯肉溝浸出液中の OPG 濃度が変化することが知られており、機械的刺激による歯肉溝浸出液中の OPG 濃度の変化に応じて OPG が歯根膜中の血管の再構築などに作用している可能性は充分考えられる。その仮定の下に、OPG の血管内皮細胞の細胞骨格および血管新生に対する作用を検討した。

HMVEC を、OPG を添加した無血清培地で培

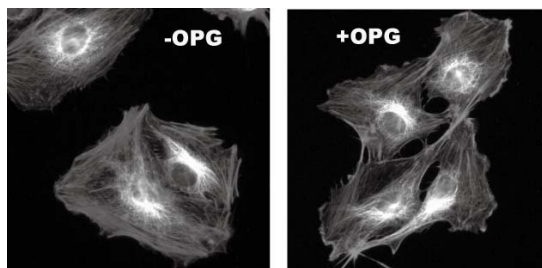
養し、アクチン、微小管を染色することによりその細胞骨格への作用を検討した。OPG の添加により細胞は伸長し、ストレスファイバーは厚みを増した。OPG を添加しなかった細胞は短く丸くなり、アクチン繊維も細胞と細胞の境界にしか認めることはできなかった。さらにチューブリンは OPG の濃度依存的に伸長した (図 1)。

また、細胞基底膜に類似したマトリゲルを用いた実験により、OPG は濃度依存的に血管新生を促すことが示された (図 2)。

さらに、c-Src キナーゼ阻害剤 PP1 は OPG により誘導される血管新生を完全に抑制したが、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) の阻害剤である U0126 は OPG が誘導する血管新生を抑制することはできなかった (図 3)。その結果より、OPG によって誘導される血管新生には Src の活性化が必要であることも示した。一方、OPG により誘導される細胞増殖には ERK の活性化が必要だが、血管新生には必要不可欠ではないことも示した (図 4)。このことは OPG により誘導される情報伝達が OPG を介するものと介さないものの 2 種ある可能性を示唆している (現在投稿準備中)。

OPG の血管内皮細胞における情報伝達についての報告はまだなく、国内外で我々が初めてである。今後、歯牙の移動を含む歯周組織における OPG の役割を引き続き検討して行く予定である。

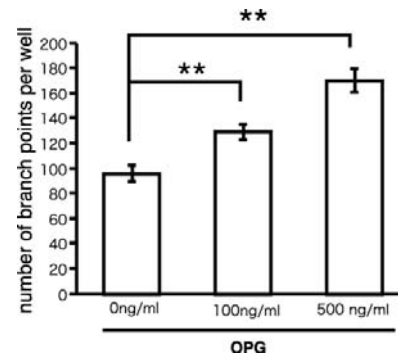
図 1



OPG による血管内皮細胞の細胞骨格形態変化

血管内皮細胞を無血清培地中で OPG を添加 (+OPG) または無添加 (-OPG) で培養し、アクチンおよび微小管を蛍光染色した。

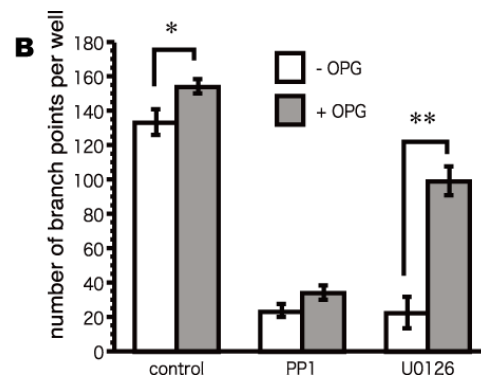
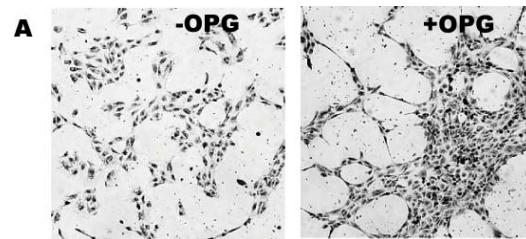
図 2



HMVEC による OPG 誘発管腔形成 (血管新生) 促進

HMVEC を、OPG を添加した無血清培地に懸濁し、Matrigel 上に播種した。8 時間培養した後、ギムザ染色を行い、branch point について評価した。**P<0.01

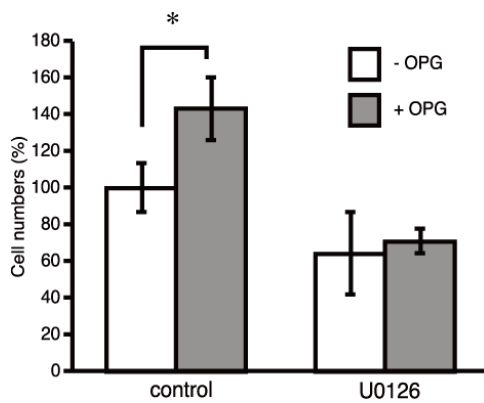
図 3



HMVEC における OPG 誘発管腔形成 (血管新生) 促進にたいする U0126 の管腔形成抑制作用

(A) HMVEC を U0126 にて 30 分前培養を行った後 OPG を添加した無血清培地に懸濁し、Matrigel 上に播種した。8 時間培養した後、ギムザ染色を行った。(B) 血管新生能を branch point number を測定することにより、検討した。*P<0.05, **P<0.01

図 4



OPG が誘導する HUVEC の細胞増殖と ERK 活性阻害剤の影響

HMVECs を 96 well plate に播種し、ERK の阻害剤である U0126 (10 μ M) を加えた。次に OPG を 500 ng/ml の濃度で添加してさらに 24 時間培養し、細胞増殖を cell-counting kit にて測定した。*P<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

- ①. Isogai, E., Isogai, H., Takahashi, K., Kobayashi-Sakamoto, M. & Okumura, K. Antimicrobial activity of three tick defensins and four mammalian cathelicidin-derived synthetic peptides against Lyme disease spirochetes and bacteria isolated from the midgut. *Exp Appl Acarol* (2009). (査読あり)
- ②. Isogai, E., Isogai, H., Takahashi, K., Okumura, K. & Savage, P. B. Ceragenin CSA-13 exhibits antimicrobial activity against cariogenic and periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* **24**, 170-172 (2009). (査読あり)
- ③. Kobayashi-Sakamoto, M., Isogai, E., Hirose, K. & Chiba, I. Role of alphav integrin in osteoprotegerin-induced endothelial cell migration and proliferation. *Microvasc Res* **76**, 139-144 (2008). (査読あり)
- ④. Takaya, A., Tabuchi, F., Tsuchiya, H., Isogai, E. & Yamamoto, T. Negative regulation of quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* by ATP-dependent Lon protease. *J Bacteriol* **190**, 4181-4188 (2008). (査読あり)
- ⑤. Kaneko, F., Oyama, N., Yanagihori, H., Isogai, E., et al. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behçet's Disease. *Eur J Dermatol* **18**, 489-498 (2008). (査読あり)
- ⑥. Isogai, H., Isogai, E., Takahashi, K. & Kurebayashi, Y. Effect of catechin diet on gingivitis in cats. *Int J Applres Vet M* **6**, 82-86 (2008). (査読あり)
- ⑦. Isogai E., Isogai H, Hayashi S. Tick biology and tick-borne infections, *Current Trend in Microbiology* (in press) (2008). (査読あり)
- ⑧. Kurashige, Y., Saitoh, M., Nishimura, M., Noro, D., Kaku, T., Igarashi, S., Takuma, T., Arakawa, T., Inoue, T., and Abiko, Y. Profiling of differentially expressed genes in porcine epithelial cells derived from periodontal ligament and gingiva by DNA microarray. *Arch Oral Biol* **53**, 437-442. (2008). (査読あり)
- ⑨. Mbonye, U.R., Yuan, C., Harris, C.E., Sidhu, R.S., Song, I., Arakawa, T., and Smith, W.L. Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation. *J Biol Chem* **283**, 8611-623 (2008). (査読あり)
- ⑩. 磯貝恵美子、小林美智代、奥村一彦、磯貝 浩、樽林陽一、林 俊治, 歯科病院環境の真菌学的検討—病院環境に

おける *Stachybotrys chartarum*,
Aspergillus niger, *Chaetomium funicola*の
分離、環境感染、**22(4)**: 260-265 (2007),
(査読あり)

〔学会発表〕(計8件)

- ①. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai, E,
Hirose, K, Reid P, Chiba I, and Holen
I, Osteoprotegerin-mediated
cytoskeletal reorganization in
microvascular endothelium,
IADR/AADR/CADR 87th General
Session and Exhibition , April 1-4,
2009, Miami, USA
- ②. Isogai E, Isogai H, Takahashi K,
Kobayashi-Sakamoto M,
Pathogenesis of skin lesions in Lyme
disease. 11th International Conference
on Lyme Borreliosis and other
tick-borne diseases, Oct. 19-23, 2008,
Irvine, USA
- ③. Isogai E ,Isogai H, Okumura K,
Kobayashi-Sakamoto M, Kaneko F,
Ohgami K, Ohno S, Savage
PBFunctional properties of cationic
antimicrobial compounds on the
neutrophils and endothelial cells,
13th Int Conf for Behcet's disease,
May 24-27, 2008, Klagenfurt
- ④. Isogai H, Isogai E, Protective effects
of antimicrobial steroid (CSA-13)
against bacterial infection with
ocular manifestations, 13th Int Conf
for Behcet's disease, May 24-27, 2008,
Klagenfurt
- ⑤. 小林 美智代, 磯貝 恵美子
Osteoprotegerin promotes
proliferation and migration of

human microvascular endothelial
cells, 第57回日本口腔衛生学会総会,
2008年10月3日, 大宮

- ⑥. Isogai H, Isogai E, Gingival damages
and oxidative stress in canine
periodontitis, ASM General 107th
Meeting, ASM General 107th
Meeting, May 21-25, 2007, Toronto,
Canada
- ⑦. Okumura K, Sawada N, Muraoka.K,
Isogai E, Hosokawa Y, Shibata T,
Isogai H, Expression of hCAP18 is
resistant factor against
hCAP18-induced apoptosis, 42th
annual meeting IADR, Sep.24-Oct. 4,
2007, Greece, Thessaloniki
- ⑧. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E,
Hirose K, Chiba I, Osteoprotegerin
promotes integrin α v β
3-dependnent endothelial cell
migration, 8-12 July 2007, Glasgow,
UK

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯貝 恵美子 (ISOGAI EMIKO)
研究者番号 : 40306254

(2) 研究分担者

小林 美智代 (KOBAYASHI MICHIO)
北海道医療大学・歯学部・助手
研究者番号 : 80316265
荒川 俊哉 (ARAKAWA TOSHIYA)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号 : 40306254