

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592381
 研究課題名 (和文) 転写因子レベルにおけるセメント芽細胞分化制御解析と歯周組織再生への応用
 研究課題名 (英文) Regulation of cementoblast differentiation by transcriptional factors and periodontal regeneration
 研究代表者
 野口 和行 (NOGUCHI KAZUYUKI)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：90218298

研究成果の概要：セメント芽細胞は PGE₂ によって石灰化の抑制が認められたのに対し、FK-506 および BMP-2 の添加により alkaline phosphatase 活性の上昇、転写因子 osterix の発現亢進が認められ、NFAT の関与が示唆された。イヌの歯周組織欠損では、bFGF や PDGF によって良好な歯周組織再生が認められ、これらの因子に関連する転写因子に関して今後解析が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・薬学

キーワード：セメント芽細胞、転写因子、石灰化、歯周組織再生

1. 研究開始当初の背景

歯周組織の機能維持あるいは再生には、線維性の付着、シャーパー線維の埋入したセメント質の形成が不可欠であり、この役割を担う主要な細胞がセメント芽細胞である。歯根膜組織形成あるいは再生のメカニズムを分子レベルで解明するには、セメント芽細胞を含む歯根膜組織特異的細胞の機能を解析することが重要である。しかし、細胞生物学的に

セメント芽細胞の増殖、分化、石灰化機構についてまだ十分に明らかにされていない。セメント芽細胞は骨芽細胞と類似した性質を有すると考えられているが、cementum-derived protein 23 (CP-23) が骨芽細胞ではその発現が認められず、セメント芽細胞や一部の歯根膜細胞に特異的に発現していることが明らかにされた。歯根膜組織の硬組織形成において alkaline phosphatase、

bone sialoprotein および osteocalcin などの分子の発現の制御に Runx2/Cbfa1, Osterix、さらには Msx-2 の転写因子の関与が示されている。骨芽細胞では、Runx2 および Osterix だけでなく cAMP-response element protein 2 として知られている ATF4 も特異的な遺伝子発現誘導に不可欠な転写因子であることが明らかにされている。しかしこれらの転写因子のセメント芽細胞での役割は解明されていない。また骨芽細胞では basic helix-loop-helix 転写因子である Twist が Runx2 の転写活性を抑制していることが明らかにされている。また免疫抑制剤である FK506 は骨芽細胞に作用し、転写因子である Nuclear factor of activated T cell (NFAT) c1, c2 を介して骨形成に関与するのに対し、セメント質形成においては、他種の免疫抑制剤である cyclosporin A によりセメント質形成亢進作用が報告され、骨芽細胞とセメント芽細胞では NFAT による制御が異なる可能性が考えられる。このようなことから、セメント芽細胞の機能解析において転写レベルでの制御が極めて重要であることが考えられる。本研究では、セメント芽細胞の機能と転写因子の発現との関係を解析することによって、セメント芽細胞の硬組織形成機構を解明し、歯周組織再生に応用することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、セメント芽細胞の機能と転写因子の発現との関係を解析することによって、セメント芽細胞の硬組織形成機構を解明し、歯周組織再生に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒトセメント芽細胞 HCEM、ヒト歯根膜

細胞、ヒト骨芽細胞、マウスセメント芽細胞において、alkaline phosphatase,

bone sialoprotein, osteocalcin の発現、石灰化誘導培地 (dexamethasone, beta-glycerophosphate, ascorbic acid を含有)による石灰化能を指標に細胞分化を解析する。

(2) 石灰化誘導培地による runx 2, osterix, AFT4, NFAT などの転写因子発現を調べる。

(3) NFAT の役割を調べるために、FK506、cyclosporin A の存在下で石灰化誘導培地添加による石灰化の影響を検討する。

(4) イヌに実験的 2 壁性骨欠損を作成し、成長因子 emdogain gel、basic FGF, PDGF による歯周組織再生と転写因子発現を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト歯根膜細胞のVEGF産生へのPGE₂の影響

ヒト歯根膜細胞およびマウスセメント芽細胞を用いてその細胞の機能解析を中心に行った。ヒト歯根膜細胞にPGE₂を添加したところ、有意な血管細胞増殖因子(VEGF)の産生が生じた。その産生は濃度・時間依存性であり、炎症性サイトカイン刺激によって産生されるレベルであった。PGE₂によるVEGF産生のメカニズムはEP2レセプターを介したものであった。興味あることに、一般的にEP2レセプターはcAMPが細胞内セカンドメッセンジャーであるが、cAMP刺激によってはVEGF産生が誘導されなかった。EP2レセプターのシグナリングを種々のキナーゼ阻害剤を用いて解析したところ、PI-3キナーゼ阻害剤により有意に抑制され、EP2レセプターの新規のシグナリング経路が存在する可能性が示唆された。またヒト歯

根膜細胞におけるエムドゲインゲルによる VEGF 産生への影響を調べたところ、エムドゲインゲル刺激によって有意な VEGF 産生が認められた。現在そのメカニズムを解析中である。

(2) マウスセメント芽細胞の石灰化への PGE₂ の影響

マウスセメント芽細胞の石灰化への PGE₂ の影響を検討したところ、PGE₂ によって石灰化が抑制された。その抑制は EP4 レセプターを介したものであり、alkaline phosphatase 活性の抑制、osteocalcin の発現抑制が生じた。その抑制機構として cAMP 経路が考えられる。また、matrix metalloproteinase-13 の産生亢進が認められ、PGE₂ は石灰化抑制に作用していると考えられる。すでに EP1 レセプターの活性化が石灰化亢進を誘導するとの報告があったが、確認されなかった。

(2) ヒトセメント芽細胞における石灰化関連分子と転写因子

in vitro の研究では、ヒトセメント芽細胞様細胞株 (HCEM) を用いて、免疫抑制剤の一つである FK-506 の骨関連遺伝子 (Runx2/Cbfa-1, Osterix, ALP, BSP, ALP) および ALP 活性に与える影響を検討した。まず、FK-506 (1 μg/ml) を添加、未添加の骨分化培地で 7 日間培養し解析したところ、骨関連遺伝子、ALP 活性ともに両群間での差は認められなかった。次に強力な骨分化因子である BMP-2 と FK-506 による共刺激で 7 日間培養したところ、BMP-2 単独刺激と比較して共刺激群では、ALP 活性の有意な上昇が認められた (図 1)。またリアルタイム PCR 法を用いて骨関連遺伝子の発現量を解析したところ、刺激後 7 日目において BMP-2 単独群と比較して共刺激群では Osterix の遺伝子発現の増加が認められた

(図 2)。現在、石灰化への影響を検討中である。

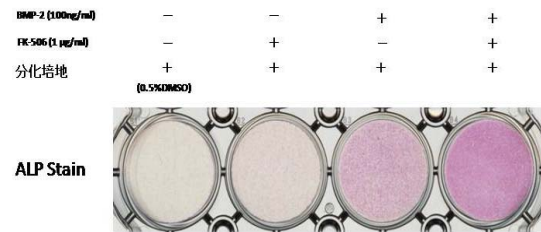


図 1. ALP 活性

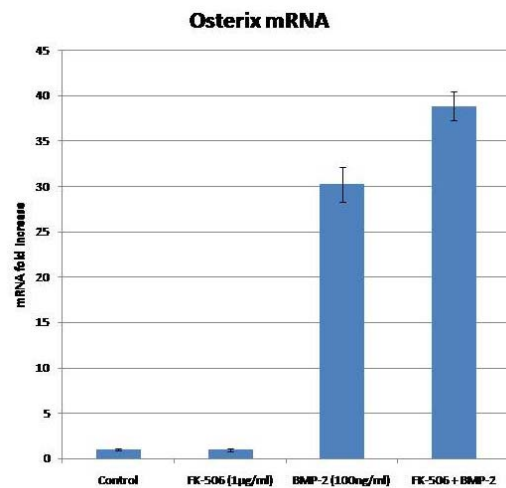


図 2. Osterix の遺伝子発現

(3) イヌ歯周組織欠損モデルにおける歯周組織再生

in vivo における歯周組織再生の研究として、emdogain gel (以下 EMD)、bFGF、GEM21S® (以下 PDGF / β-TCP) を用いイヌの 2 壁性骨欠損における歯周組織再生について組織学的に検討を行った。2 壁性骨欠損における EMD 群、FGF 群、PDGF / β-TCP 群で各々良好な歯周組織再生が認められた。しかしながら EMD のみではスペースメンテナンスが困難で、無細胞性セメント質の再生には有効であるがは顕著な骨誘導能を有さない可能性が示唆された。FGF 群は新生骨形成量が最も多く骨誘導能が極めて高いことが示唆された。PDGF / β-TCP 群では β-TCP の骨伝導能

の発現、安定した歯周組織再生が認められた。しかしFGF群と比較し骨形成量が少なかったことは8週の観察期間では残留TCPの骨置換が完了しておらず、むしろ治癒スペースが阻害されていた可能性が考えられた。このようにEMD、bFGF、PDGFによって歯周組織再生が認められたので、各種転写因子の発現を免疫組織学的に解析予定である。

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 4件)

1. Bando Y, Noguchi K, Kobayashi H, Yoshida N, Ishikawa I, Izumi Y.

Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E₂ is involved in vascular endothelial growth factor production in interleukin-1 α -stimulated human periodontal ligament cells.

J Periodontal Res, in press, 査読あり

2. Iwaya Y, Machigashira M, Kanbara K, Miyamoto M, Noguchi K, Izumi Y, Ban S. Surface properties and biocompatibility of acid-etched titanium. Dent Mater J, 27:415-421 (2008), 査読あり

3. Oka H, Miyauchi M, Sakamoto K, Kitagawa M, Noguchi K, Somerman MJ, Takata T. Prostaglandin E₂ inhibits mineralization and enhances matrix metalloproteinase-13 in mature cementoblasts mainly via the EP4 pathway. Arch Oral Biol, 53:243-249 (2008), 査読あり

4. Kiji M, Nagasawa T, Hormdee D, Yashiro R, Kobayashi H, Noguchi K, Nitta H, Izumi Y, Ishikawa I.

Internal prostaglandin synthesis augments osteoprotegerin production in human gingival fibroblasts stimulated by lipopolysaccharide. Clin Exp Immunol, 149:327-334 (2007), 査読あり

[学会発表] (計 2件)

1. 坂東由記子、野口和行、小林宏明、和泉雄一. 歯根膜細胞におけるPGE₂によるVEGF産生に関する研究. 日本歯科保存学会2008年秋季学術大会(第129回). 平成20年11月7日 富山国際会議場(富山市)

2. Bando Y, Noguchi K, Kobayashi H, Izumi Y. Effect of PGE₂ on VEGF production in IL-1 α -stimulated human periodontal ligament cells. The 7th International Meeting of Asian Pacific, Society of Periodontology. September 21, 2007, Beijing.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 和行 (NOGUCHI KAZUYUKI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 90218298

(2) 研究分担者

小林 宏明 (KOBAYASHI HIROAKI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 50396967

(3) 連携研究者

なし