

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592427

研究課題名（和文） 生理活性リゾリン脂質による歯周病態形成制御

研究課題名（英文） Regulation of S1P in pathogenesis of periodontal disease

研究代表者 柳田 学（YANAGITA MANABU）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80379081

研究成果の概要（和文）：

血小板より産生される生理活性リゾリン脂質スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）の歯周病態形成への関与について検討した。本研究期間においては歯周組織構成細胞である歯肉線維芽細胞（HGF）に及ぼすS1Pの影響を検討した。S1P刺激によりHGFから炎症性サイトカイン(IL-6, IL-8)産生が誘導され、HGF上の接着分子CD54の発現も増大することが明らかとなった。S1Pによる効果はS1P2受容体アンタゴニスト存在下では抑制された。このことからS1Pによって誘導されるHGFの炎症性反応はS1P2受容体を介している可能性が示唆されるとともに、炎症性歯周疾患においてS1Pは炎症性メディエーターとしての役割を果たしている可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have investigated the effect of S1P on human gingival fibroblast (HGF). S1P upregulated to produce proinflammatory cytokine (IL-6 and IL-8) from HGF. Further, CD54 expression on HGF was induced by S1P in a dose-dependent manner. Antagonist of S1P2, one of the subsets of S1P receptor, reduced S1P-induced inflammatory cytokine production and CD54 expression on HGF. These findings indicate that S1P plays the important role as inflammatory mediator for establishment of periodontal disease.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 2010年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学、リゾリン脂質、歯肉線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周病の病態形成に関する免疫学的アプローチとして、好中球やリンパ球といった免疫系細胞の機能に焦点をあてて検討が重ね

られてきたが、歯周病の immunopathogenesis の十分な解明には未だ至っていない。実際の歯周炎病巣での個々の細胞の動向、細胞間のコミュニケーションを制御する炎症メディエーターの中において、脂質研究に関しては

立ち遅れていることから、より包括的な歯周病病態形成の解明に至っていない。そこで我々は生理活性リゾリン脂質の一つであり炎症メディエーターとしても近年注目されているスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) と歯周疾患との関わりについて検討するに至った。

2. 研究の目的

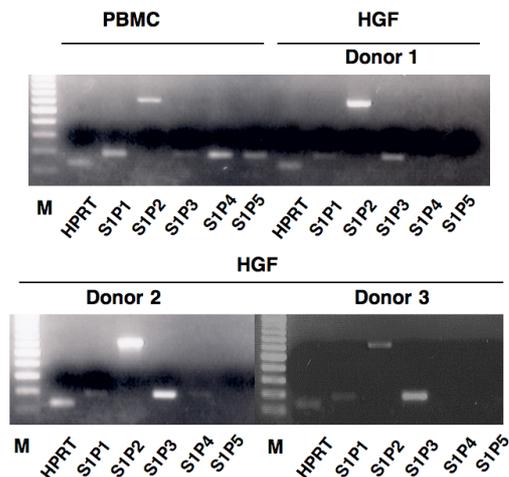
細菌感染によって惹起された炎症状態において、様々な細胞より誘導される生理活性リゾリン脂質であり、血小板より産生されるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) に焦点をあてて、S1P は歯周組織構成細胞である歯肉線維芽細胞に対してどのような機能制御に関わるかを検討する。

3. 研究の方法

ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)は大阪大学歯学部倫理委員会において、その採取の是非について審議され承諾を得た後に採取した。まず歯肉線維芽細胞におけるS1P受容体の発現をRT-PCR法にて検討した。次に、 $S1P10^{-8}$ - $10^{-4}M$ 存在下で歯周病原性細菌 *P. gingivalis* のリポポリサッカライド(LPS)刺激により産生されるIL-8、IL-6をRT-PCR法とELISA法を用いて検討した。歯肉線維芽細胞における細胞表面抗原の変化に関しては接着分子CD54(ICAM-1)の発現をフローサイトメトリー法にて検討した。さらに複数存在するS1P受容体のうち、どのS1P受容体が炎症性サイトカイン産生や接着分子の発現に関与しているかを検討するため、S1P受容体に対するアンタゴニストにて歯肉線維芽細胞を前処理した後、先述の実験をあわせて行った。

4. 研究成果

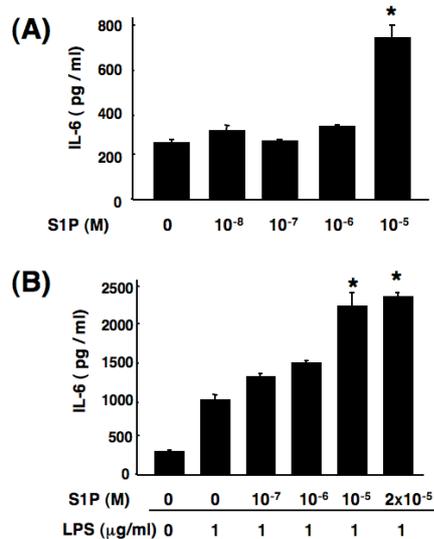
歯肉線維芽細胞(HGF)におけるS1P受容体の発現をRT-PCR法にて検討した結果、異なったドナー間でS1P1、S1P2、S1P3が共通して発現していることが明らかとなった(図1)。(PBMCは末梢単核球であり、陽性コントロールとして用いた。)



(図1 歯肉線維芽細胞におけるS1P受容体の発現)

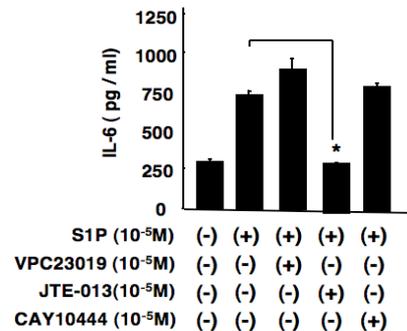
次に種々の濃度のS1Pにて歯肉線維芽細胞を刺激した後、歯肉線維芽細胞より発現誘導されるIL-6の産生量をELISA法にて測定した。その結果S1P濃度 $10^{-5}M$ において歯肉線維芽細胞からの顕著なIL-6産生が認められた(図2A)。その効果はLPS刺激により増強した(図2B)。IL-8の産生においても同様の結果が得られた(図には示さない)。

(図2 S1P刺激後に歯肉線維芽細胞より産生されるIL-6)

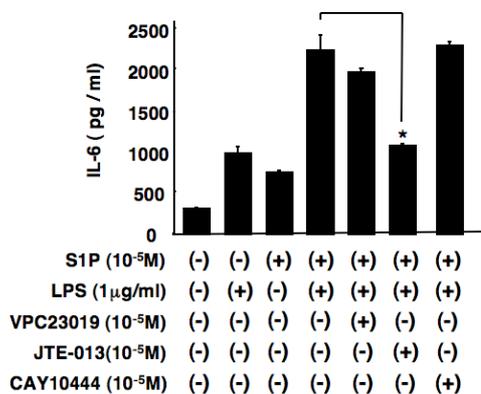


HGFには複数のS1P受容体がmRNAレベルで発現していることから、どの受容体サブセットを介してS1Pは炎症性サイトカインを誘導しているのかをS1P受容体であるS1P1、S1P2、S1P3に対するアンタゴニストを用いて検討した。

(A)



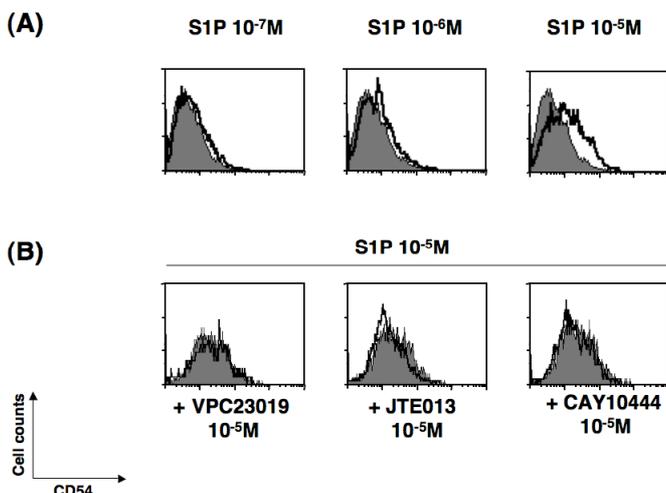
(B)



(図3 S1P 受容体アンタゴニスト前処理後、S1P 刺激後に歯肉線維芽細胞より産生される IL-6)

S1P1/S1P3 アンタゴニストとして VPC23019、S1P2 アンタゴニストとして JTE-013、S1P3 アンタゴニストとして CAY10444 を用いて S1P 刺激の一時間前に HGF に前処理した。図 3 に示すように S1P2 アンタゴニストである JTE-013 前処理群において IL-6 の発現が抑制された (図 3A)。その効果は LPS 刺激により増強した (図 3B)。IL-8 の産生においても同様の結果が得られた (図には示さない)。

S1P は HGF より IL-6 や IL-8 といった炎症性サイトカインの産生を誘導し、そのシグナル経路は主に S1P2 受容体を介している可能性が示された。次に炎症時に線維芽細胞上に発現が誘導される CD54 (ICAM-1) について検討した。



(図 4A S1P 刺激後に歯肉線維芽細胞より

産生される IL-6 図 4B S1P 受容体アンタゴニスト前処理したもの)

図 4A に示すように S1P 濃度依存的に HGF 上の CD54 発現量は増加した。また HGF を S1P2 受容体アンタゴニストである JTE-013 で前処理することにより、他の受容体のアンタゴニスト前処理群と比較して CD54 の発現は抑制された。

以上の知見から生理活性脂質である S1P は HGF においては S1P2 受容体を介して炎症性サイトカインの産生誘導、接着分子 CD54 の発現誘導に関与していることが示唆された。このことから歯周組織においても血小板より産生される S1P は歯周組織構成細胞に対して炎症を惹起させる炎症メディエーターとして振舞うことが予想された。また S1P による炎症性反応に対して S1P2 を介したシグナルを抑制することを応用した抗炎症性薬剤開発への可能性も示唆された。

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 3 件)

① Shimabukuro Y, Terashima H, Takedachi M, Maeda K, Nakamura T, Sawada K, Kobashi M, Awata T, Oohara H, Kawahara T, Iwayama T, Hashikawa T, Yanagita M, Yamada S and Murakami S. Fibroblast growth factor-2 stimulates directed migration of periodontal ligament cells via PI3-K/akt signaling and CD44/hyaluronan interaction J. Cell. Physiol. (査読有り) 2011. 226: 809-821

② Yanagita M, Kojima Y, Kawahara T, Kajikawa T, Oohara H, Takedachi M, Yamada S, and Murakami S. Suppressive effects of nicotine on the cytodifferentiation of murine periodontal ligament cells. **Oral Diseases** (査読有り) 2010. 16: 812-817

③ Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, Anzai J, Takedachi M, Yanagita M, Ito M, Hashikawa T, Yamada S and Murakami S. Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells. J. Endodont. (査読有り) 2009. 35: 1529-1535

[学会発表] (計 2 件)

① 児嶋由子、柳田学、その他、FGF-2 刺激によるマウス歯根膜細胞からの VEGF の誘導、第 132 回秋季日本歯科保存学会、2010。

10.28、岐阜市

②柳田学、小林良平、その他、ニコチンは歯髄細胞・歯根膜細胞の石灰化ノジュール形成を抑制する、第131回秋季日本歯科保存学会、2009.10.30、仙台市

〔図書〕(計1件)

①柳田学、村上伸也、永末書店、(2009)、ザ・ペリオドントロジー、p45-47

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田 学 (YANAGITA MANABU)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80379081

(2) 研究分担者

山田 聡 (YAMADA SATORU)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：40359849

橋川 智子 (HASHIKAWA TOMOKO)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：00362682

島袋 善夫 (SHIMABUKURO YOSHIO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50231361
(H20 まで分担者として参画)