

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791605
 研究課題名（和文） セメント芽細胞におけるカルシウム受容体の発現と活性化機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of Calcium-sensing receptor activation in cementoblasts
 研究代表者
 金谷 聡介 (KANAYA SOUSUKE)
 東北大学・病院・医員
 研究者番号：80375097

研究成果の概要（和文）：申請者らはセメント芽細胞において、細胞外カルシウム刺激により Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) の発現が増強されることを見いだした。プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤である H89 およびアデニル酸シクラーゼ阻害剤である MDL-12330A により FGF-2 mRNA の発現増強は抑制され、プロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤である GF-209203X およびホスホリパーゼ C 阻害剤である U73122 では発現増強に影響がないことから、細胞外カルシウムによる FGF-2 発現増強は PKA 依存性かつ PKC 非依存性のシグナル伝達経路によることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that elevated levels of extracellular Ca^{2+} increase fibroblast growth factor (FGF)-2 gene expression in cementoblasts. Pretreatment with a protein kinase A (PKA) inhibitor, H89, or an adenylate cyclase inhibitor, MDL-12330A, inhibited Ca^{2+} -stimulated Fgf-2 expression. In contrast, pretreatment with the protein kinase C (PKC) inhibitor GF-109203X or the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 did not affect the expression of Fgf-2 transcripts, suggesting that the increase in Fgf-2 expression was dependent on the PKA but not the PLC/PKC signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
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：セメント芽細胞、細胞外カルシウム、FGF-2、

1. 研究開始当初の背景

(1) セメント質は歯根と歯周組織の付着に必須であることからセメント芽細胞は歯周組織再生に重要な役割を果たすと考えられ

る。

(2) 細胞外カルシウム (Ca^{2+}) を認識する G タンパク共役型受容体として Calcium

sensing receptor (CaR) がクローニングされて以来、CaR は Ca^{2+} 動態の活発な組織である骨組織で骨再生誘導に大きく関与することが示唆されてきた。

(3) 申請者は、マウスセメント芽細胞を細胞外カルシウム (10 mM) で刺激すると、6 時間をピークとして Platelet-derived growth factor A (PDGF-A) 産生を誘導する可能性を予備実験から得た。そこで、『セメント芽細胞は CaR を機能的に発現し、そのシグナルは、歯周組織再生に関わる遺伝子を誘導する』という仮説を立てた。

2. 研究の目的

(1) マウスセメント芽細胞における CaR の発現に関して分子生物学的手法を用いて証明するとともに、生体での発現に関しても免疫組織学的手段を用いてその機能的発現を証明する。

(2) CaR シグナルが歯周組織再生誘導を制御する機構を特に成長因子産生誘導に焦点を当てて明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), BMP-4, PDGF-A, PDGF-B, Insulin like growth factor-I (IGF-I) などの種々の成長因子について細胞外カルシウムがセメント芽細胞に及ぼす影響について調べる。

(2) 細胞外カルシウムの主要なレセプターである CaR の関与について調べる。

(3) シグナル伝達機構について解析する。

4. 研究成果

(1) マウスセメント芽細胞において、細胞外カルシウム 10mM 刺激して蛍光免疫染色法にて解析したところ、刺激後 6 時間をピークとして FGF-2 の強い発現誘導がみられた。(図 1)

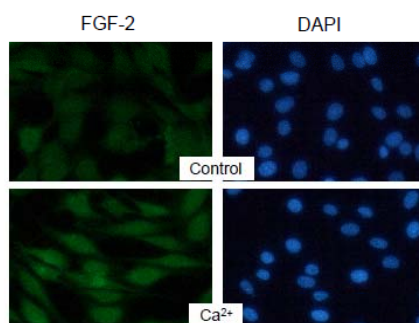


図1. FGF-2タンパクの誘導

(2) 細胞外カルシウム 10mM で 6 時間刺激すると、FGF-2 mRNA の誘導がみられたが、アデニル酸シクラーゼ阻害剤である MDL-12330A およびプロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤である H-89 で前処理したところ、FGF-2 mRNA の発現が濃度依存的に抑制された。(図 2)

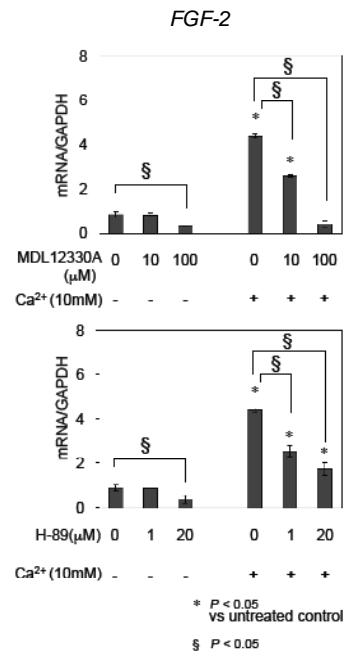


図2. MDL-12330AおよびH-89による FGF-2 mRNA誘導の抑制

活性化されたアデニル酸シクラーゼは cAMP の産生を促進し、PKA を活性化する。(図 3)

そこで、細胞内に産生される Cyclic AMP (cAMP) 濃度を測定したところ、細胞外カルシウム刺激により cAMP 濃度の上昇がみられた。(図 4)

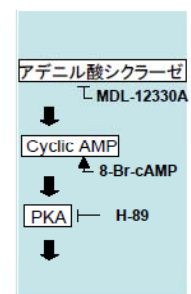


図3. プロテインキナーゼA (PKA) 経路

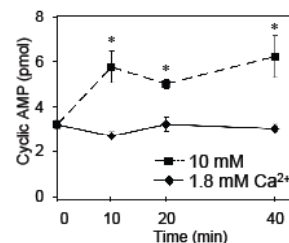
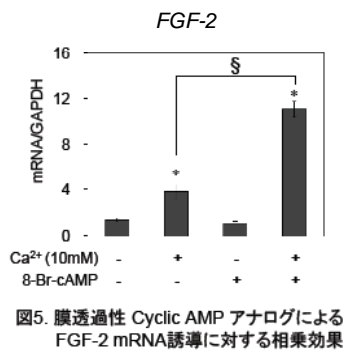


図4. Ca²⁺刺激による Cyclic AMPの産生

細胞内透過性の 8-Bromoadenosine-cAMP 存在下でカルシウム刺激したところ、FGF-2 mRNA

発現の相乗的な誘導がみられた。(図 5)



このことから PKA が関与していることが示唆された。

一方、ホスホオリパーゼ C 阻害剤である U73122 およびプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤である GF-109203X 前処理では、FGF-2 mRNA の発現誘導は抑制されなかった。

(3) カルシウムイオンチャンネル阻害剤である Nifedipine 存在下で 6 時間細胞外カルシウム刺激したところ、Nifedipine 処理では FGF-2 mRNA の発現は抑制されなかった。このことから、カルシウムイオンチャンネルの関与はないことが示唆された。

(4) 細胞外カルシウムの受容体である CaR mRNA の有無を解析したところ、マウスセメント芽細胞には発現がみられなかった。さらに CaR 特異的のアゴニストである R-568 刺激でも FGF-2 mRNA の発現はみられなかった。Mg²⁺ 刺激では FGF-2 mRNA 発現は誘導されなかったが、Sr, Al および Gd の陽イオンである Sr²⁺, Al³⁺, Gd³⁺ 刺激では FGF-2 mRNA の発現誘導がみられた。さらに Ca²⁺ と同様に、MDL-12330A で FGF-2 mRNA の発現が抑制された。

(5) 本研究の結果、セメント芽細胞には細胞外カルシウムを感知する機構が存在しており、その活性化は cAMP/プロテインキナーゼ A 依存性に FGF-2 の発現を誘導することが明らかとなった。また、カルシウムイオンチャンネルと CaR は関与せず、Sr や Gd などの 2 価および 3 価の陽イオンを認識する受容体が関与していることが示唆された。(図 6)

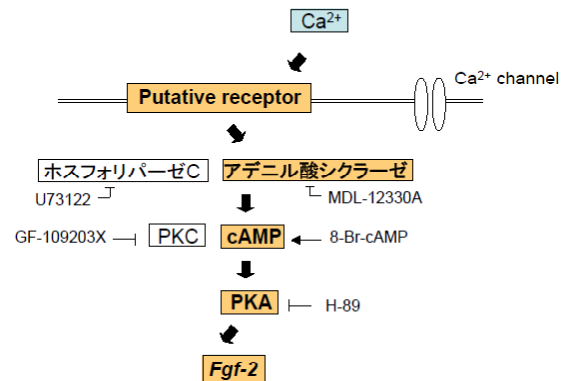


図6. Ca²⁺ 刺激による FGF-2 発現誘導におけるシグナル伝達経路

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 Tada H., E. Nemoto, S. Kanaya, N. Hamaji, H. Sato, and H. Shimauchi Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、vol.394, 2010, 1093-1097

② Kanaya S., E. Nemoto, T. Ogawa, and H. Shimauchi *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce unique dendritic cell subsets via Toll-like receptor 2. *J. Periodontal Res.* 査読有、vol.44, 2009, 543-549

③ Nemoto E., Y. Koshikawa, S. Kanaya, M. Tsuchiya, M. Tamura, M.J. Somerman, and H. Shimauchi Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone* 査読有、vol.44, 2009, 805-812

〔学会発表〕（計 2 件）

① 第 51 回春季日本歯周病学会学術大会
「マウスセメント芽細胞における細胞外
Ca²⁺刺激によるFGF-2 発現誘導」 金谷聡
介、根本英二、島内英俊 2008 年 4 月 24
日 大宮

② IADR 86th General Session “Elevated
extracellular Ca²⁺ induces fibroblast growth
factor-2 mRNA in cementoblasts” S. Kanaya, E.
Nemoto, M. Somerman, H. Shimauchi 2008 年
7 月 4 日 Toronto (Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金谷 聡介 (KANAYA SOUSUKE)

東北大学・病院・医員

研究者番号：80375097

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

