

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792128

研究課題名（和文） 生理活性リゾリン脂質の骨・歯周組織に対する影響の解明

研究課題名（英文） The elucidation of effect of LPA on bone and periodontal tissue

研究代表者

臼井 通彦 (USUI MICHHIKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10453630

研究成果の概要（和文）：LPA(Lysophosphatidic Acid)は様々な生理活性をもつことが知られている。今回、我々は、歯周組織を構成する歯肉上皮細胞と破骨細胞に対する影響を検討した。歯肉上皮細胞において、LPAは細胞増殖を亢進し、IL-6, IL-8といった炎症性サイトカインの産生を増強した。また、破骨細胞形成に必須であるRANKLの産生も増強した。一方、破骨細胞前駆細胞において、LPAはその細胞増殖に影響を与えなかったが、RANKLによる破骨細胞形成数を増強した。そのメカニズムを検討した所、LPAはCaspase3の活性化を抑制することにより、apoptosisを低下させ、破骨細胞数が増強していることが明らかとなった。以上の結果より、LPAは歯周組織において、組織破壊を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：LPA (Lysophosphatidic Acid) is known to be a biologically active protein. We examined the effect of LPA on gingival epithelial cell and osteoclast which constituted periodontium. In a gingival epithelial cell, LPA promoted cell proliferation and increased production of inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8. In addition, the production of RANKL which was indispensable to the osteoclast formation was also increased. On the other hand, LPA increased RANKL-induced osteoclast formation, although LPA did not affect the cell proliferation in osteoclast progenitor cell. To clarify this mechanism, we examined Caspase3, which is one of apoptosis related factors. We found that LPA increased osteoclast number through reduction of apoptosis by Caspase3 deactivation. These data suggested that LPA might promote destruction of periodontal tissue in periodontitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：①LPA ②骨代謝 ③歯周組織

1. 研究開始当初の背景

歯周病に罹患している患者の歯肉溝滲出液中には、マクロファージが産生する炎症性サイトカインなどが検出されることが知られている。我々は、脂質異常症（高脂血症）と歯周病との関連性を調査していく研究の中で、この GCF 中に酸化 LDL (Low density lipoprotein: 悪玉コレステロール) が含まれていることを見出した。LDL は 1 分子のアポ B 蛋白質と種々の脂質からなる粒子である。1 粒子の LDL 中に約 700 分子のリン脂質が含まれており、その半分以上はホスファチジルコリン (PC) である。LDL の酸化変性に伴い、この PC からリゾ PC が生じるほか、炎症反応の拡大に伴って LPA などが産生し、生理活性リゾリン脂質として働くことが知られている。すなわち、LPA などの生理活性リゾリン脂質が歯周組織で何らかの影響を及ぼす可能性が示唆されたのである。

リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic Acid: LPA) はリン酸—グリセロール—脂肪酸という極めて単純な構造をもつリン脂質であるが、細胞増殖、血小板増殖、血小板凝集効果、平滑筋収縮効果、癌の浸潤促進効果など非常に多岐にわたる薬理的作用を有している。LPA の作用は細胞表面の G 蛋白質共役型受容体を介して細胞内に伝えられるが、最近 4 種類の受容体 LPA1 (EDG2), LPA2 (EDG4), LPA3 (EDG7), LPA4 が同定された。しかし、その下流のシグナル伝達に関しては未だ明らかでないことが多い。上皮細胞において創傷治癒が促進されるとの報告もあるが、骨代謝を担う骨芽細胞や破骨細胞への影響や歯周組織における創傷治癒・組織再生に対する効果は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨・歯周組織における生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic Acid: LPA) の機能・影響を分子生物学的手法を用い、*in vivo*, *in vitro* の両面から明らかにし、歯周組織再生の治療手段としての可能性を検討することである。

3. 研究の方法

1. 生理活性リゾリン脂質 LPA の破骨細胞形成に対する影響を解明する。

破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞、並びにマウス脾臓から採取した脾臓細胞を

M-CSF で 3 日間培養し、マクロファージにまで分化させた細胞（破骨細胞前駆細胞）にリゾリン脂質 LPA で処理し、M-CSF, RANKL 存在下での破骨細胞分化に対する影響を検討する。また、形成された破骨細胞の吸収能に対する影響を評価するため、デンティンスライス上にリゾリン脂質 LPA で処理された破骨細胞前駆細胞を播種し破骨細胞を形成させ、形成された吸収窩の大きさを顕微鏡下で計測する (Pit formation assay)。

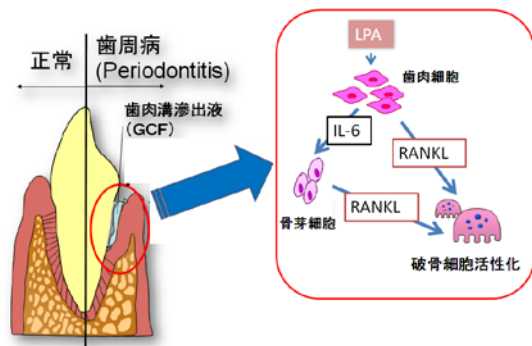
2. 生理活性リゾリン脂質 LPA の破骨細胞におけるシグナル伝達機構の解明

骨芽細胞・破骨細胞において、これら既存のシグナル伝達経路が活性化されるか否かをリアルタイム PCR・Western blotting 法を用いて確認する。また、各伝達経路の阻害剤を用いて、細胞増殖・分化に対する影響を検討する。これらのシグナル伝達分子が骨芽細胞において骨形成関連転写因子 Runx2, Osterix, Smad、破骨細胞において骨吸収関連転写因子 c-Fos, AP-1, NF- κ B, NFATc1 に及ぼす影響を各転写因子のプロモーターアッセイを Signal Finder 10 パスウェイ (SABioscience 社) を用いて網羅的に行い、各転写因子の関与を明らかにする。

4. 研究成果

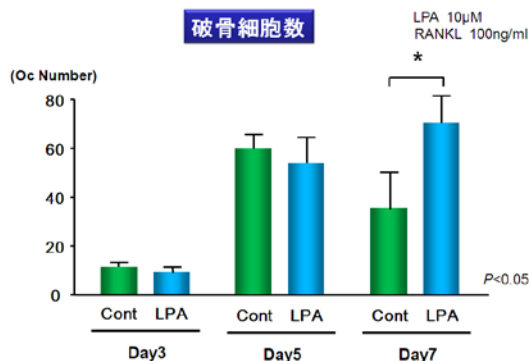
①LPA の歯肉上皮細胞に対する影響

リゾリン脂質 LPA が歯肉上皮細胞株 Ca9-22 に与える影響を検討した。Ca9-22 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて LPA 受容体・LPA1, 2, 3, 4 の発現の有無を調べたところ、LPA1, 3 の発現を確認することができた。次に、LPA の細胞増殖に対する影響を評価するために、MTT assay を行った。その結果、LPA 刺激により、細胞増殖が有意に亢進された。また、LPA の刺激により炎症性サイトカインの産生に変化がおきるか観察した。LPA 刺激 24 時間後に RNA を回収し、炎症性サイトカインの mRNA 発現を観察した結果、IL-6・IL-8 の発現が増強していた。さらに、ELISA 法を用いて上清中の IL-6 並びに IL-8 量を測定したところ、LPA 刺激により IL-6・IL-8 がタンパク質レベルにおいても有意に増強していることが明らかになった。最後に、破骨細胞形成に必須な因子、RANKL の mRNA 発現を確認したところ、LPA によりその発現が有意に増強された。



②LPA の破骨細胞に対する影響

リズリン脂質 LPA が破骨細胞前駆細胞株 Raw264.7 の細胞増殖、並びに破骨細胞形成に与える影響を検討した。Raw264.7 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて LPA 受容体・LPA1, 2, 3, 4 の発現の有無を調べたところ、LPA1 の発現のみを確認することができた。次に、LPA の細胞増殖に対する影響を評価するために、MTT assay を行ったが、LPA 刺激による細胞増殖には有意な差を認めなかった。次に破骨細胞形成に対する LPA の影響を観察した。LPA は培養 3 日目、5 日目では破骨細胞数に影響を与えなかったが、培養 7 日目において LPA 存在下の破骨細胞数は対象群と比較して有意に増加した。また、この破骨細胞数の増加は LPA 受容体アンタゴニスト Ki16425 により阻害された。このことから、LPA は破骨細胞の生存・apoptosis に関与している可能性が示唆された。

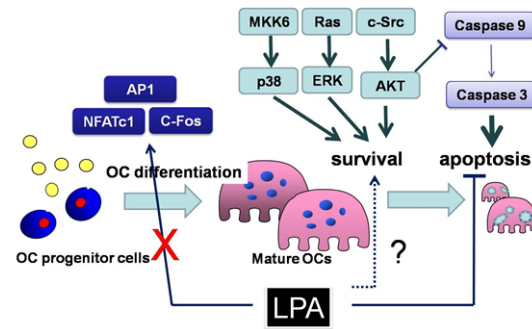


破骨細胞形成関連遺伝子である c-Fos, NFATc1, Fral, RANK に関してその発現量を Real Time PCR 法にて定量した。破骨細胞形成に関連するこれらの遺伝子発現は対照群と LPA 刺激群の間に有意な差を認めることはできなかった。

最後にアポトーシス関連因子の一つである Caspase3 の活性化について検討した。破骨細胞形成培養 5 日目に LPA で処理し、Caspase 3 の活性化を測定した。LPA 処理により Caspase3 の活性化は有意に抑制された。さらに、破骨細胞形成と同様に LPA のインヒ

ビターである Ki16425 で処理するとその抑制は解除された。すなわち、Caspase 3 活性化の抑制は LPA-LPA 受容体のシグナル伝達が関与することが示唆された。

以上の結果より、LPA は Caspase 3 の活性化を抑制し、apoptosis を低下させることにより、破骨細胞数を増加させることが明らかとなった。



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 6 件)

- ① 臼井通彦、宮園あがさ、山本松男 リズリン脂質・LPA (lysophosphatidic acid) の破骨細胞前駆細胞株 Raw264.7 に対する影響 口腔組織培養学会誌 査読無 19 巻 2009 49-50 頁
- ② Suzuki K, Sakiyama Y, Usui M, Obama T, Kato R, Itabe H, Yamamoto M. Oxidized low-density lipoproteins enhances IL-8 production in human gingival epithelial cell line Ca9-22. Journal of Periodontal Research 査読有 45(4) 2010 488-495.
- ③ Hayashi Y, Matsunaga T, Yamamoto G, Nishii K, Usui M, Yamamoto M, Tachikawa T. Comprehensive Analysis of Gene expression in the Junctional Epithelium by Laser Microdissection and Microarray Analysis. Journal of Periodontal Research 査読有 45(5) 2010 618-625.
- ④ T Sato, D Chida, T Iwata, M Usui, K Hatori, S Takeda, T Yoda Non-neuronal regulation and repertoire of cholinergic receptors in organs. BioMolecular Concepts 査読有 1 2010

357-366

⑤ 臼井通彦、山本松男 歯周病が全身に及ぼす影響 月刊糖尿病 査読無 2(13) 2010 15-20.

⑥ 臼井通彦、山本松男 歯周病と全身疾患リスクは？肥満と糖尿病 査読無 9(5) 2010 752-753

[学会発表] (計6件)

① 臼井通彦、宮園あがさ、山本松男 リゾリン脂質・LPA (lysophosphatidic acid) の歯肉上皮細胞に対する影響 第130回日本歯科保存学会春季学術大会 2009年6月9日 札幌国際会議場

② 臼井通彦、宮園あがさ、府川有紀子、林幸恵、山本松男 LPA(lysophosphatidic acid)の歯肉扁平上皮癌細胞株 Ca9-22 に対する影響 第27回日本骨代謝学会 2009年7月27日 大阪国際会議場

③ 臼井通彦、宮園あがさ、山本松男 リゾリン脂質・LPA (lysophosphatidic acid) の破骨細胞前駆細胞株 Raw264.7 に対する影響 第46回日本口腔組織培養学会 2009年12月5日 昭和大学上條講堂

④ 臼井通彦、宮園あがさ、府川有紀子、林幸恵、山本松男 LPA(lysophosphatidic acid)は破骨細胞の apoptosis を抑制する。昭和大学口腔癌包括的研究センター公開シンポジウム 2010年3月13日 昭和大学

⑤ 山本松男、史春、臼井通彦、滝口尚、菅野真莉加、野瀬冬樹、根岸洋一、富永和宏、西原達次 超音波照射の歯肉上皮細胞に対する影響について 第133回日本歯科保存学会秋季学術大会 2010年10月28日 岐阜

⑥ Michihiko Usui, Yukie Hayashi, Ryoichi Fujihara, Yoshimasa Okamatsu, Matsuo Yamamoto CCL7 promotes osteoclastogenesis via activation of NF- κ B and NFAT. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology 2010年11月1日 ホノルル (アメリカ)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www10.showa-u.ac.jp/~perio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 通彦 (USUI MICHIIHIKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10453630

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し