

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890188

研究課題名（和文）イノシトールリン脂質情報伝達系を介した
アディポネクチンの歯周疾患制御機構の解明研究課題名（英文）Functional roles of phosphatidylinositol signaling in relationship
between adiponectin and periodontal disease.

研究代表者

神尾 宜昌 (KAMIO NORIAKI)

日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号：60546472

研究成果の概要（和文）：イノシトールリン脂質情報伝達系において重要な役割を果たすジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）がアディポネクチン刺激による機能に対して、どのように関与しているのか解析した。その結果アディポネクチン刺激による活性酸素種（ROS）と一酸化窒素（NO）を介するアポトーシスに DGK が関与していること、またアディポネクチン刺激による IL-6 の分泌に DGK が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The present study investigated whether diacylglycerol kinases (DGKs), enzymes functioning in sub-cellular signaling pathways, had a role on adiponectin-induced apoptosis and IL-6 secretion. This study suggested that the adiponectin-induced apoptosis and secretion of IL-6 involves DGKs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：アディポネクチン、ジアシルグリセロールキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

口腔内の慢性疾患である歯周炎がメタボリックシンドロームと密接に関係する肥満、糖尿病及び心疾患の個々と強い関連性があることは周知の事実である。さらに、メタボリックシンドロームの構成要素の陽性項目数が多いほど平均歯周ポケットが2 mm 以上になるリスクが高くなることが報告されている。しかしながらメタボリックシンドロームと歯周病の分子機構的関連性については

不明な点が多い。

メタボリックシンドロームとその影響を理解するにあたって、脂肪細胞から生理活性物質（アディポカイン）が分泌されるという概念が大きな役割をはたしている。つまり、脂肪細胞の肥大化により脂肪細胞から分泌されるアディポカインの量も増減することから、アディポカインの分泌量変化がメタボリックシンドロームの成因とその影響の一部を説明しうることがわかってきた。そこで、

歯周疾患において自然免疫反応から始まる炎症性の破壊を調節する分子メカニズムにアディポカインが与える影響を理解することは、メタボリックシンドロームが歯周疾患を増悪させるメカニズムを解明する手掛かりとなると考えられる。

研究代表者らは、アディポカインのなかでも抗炎症作用があり、血中濃度が BMI と逆相関を示すことが知られている『アディポネクチン』に注目し、その生理的機能を明らかにするため実験を行ってきた。その結果、アディポネクチン刺激により破骨細胞分化が抑制されること、アディポネクチン刺激により G-CSF が分泌されること、アディポネクチン刺激によりアポトーシスが誘導されること、歯周病原菌由来 LPS 刺激に対してアディポネクチンが抗炎症機能を発揮することを報告している。

2. 研究の目的

これまで細胞膜脂質のイノシトールリン脂質がシグナル伝達系に深く関与していることが明らかにされているが、免疫機構の調節にこの伝達系がいかなる働きをしているのかはほとんど知られていない。

一方、研究代表者らはアディポネクチン誘導アポトーシスにジアシルグリセロールキナーゼが関与しているという結果を得ていた。DGK はイノシトールリン脂質分解産物であるジアシルグリセロール (DG) をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) を産生する。DG と PA はいずれもシグナル伝達分子の重要な因子であることから、DGK はこれらのシグナル伝達経路を調節している可能性がある。そこで本研究では DGK を介したアディポネクチンの免疫学的な役割を解明し、メタボリックシンドロームと歯周疾患の関係の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、アディポネクチンのうち、炎症局所でリンパ球由来のプロテアーゼにより N 末端のコラーゲン様ドメインが切断されたアディポネクチンのアイソフォームの一種である球状アディポネクチン (gAd) を用いた。

(1) アディポネクチン誘導アポトーシスへの DGK 関与の解明

マウスマクロファージ様細胞 (RAW264 細胞) を用いて、DGK 阻害剤 (R59022) 処理、

または DGK アイソフォームの一種である DGK α を RNA 干渉でノックダウンし、gAd 刺激時のアポトーシスの状態を解析する。

また、研究代表者らは gAd 刺激によるアポトーシスには活性酸素種 (ROS) と一酸化窒素 (NO) が関与していることを明らかにしている。そこで、DGK 阻害剤および DGK α をノックダウンした際の gAd 刺激時の ROS と NO の産生状態を調べる。

(2) アディポネクチン誘導 IL-6 分泌への DGK 関与の解明

RAW264 細胞を用いて、R59022 処理もしくは DGK α を RNA 干渉でノックダウンし、gAd 刺激時の IL-6 の遺伝子発現状態およびタンパク質分泌状態について調べる。さらに、シグナル伝達経路を明らかにするため、gAd 刺激により IL-6 が分泌するまでのシグナル伝達について解析する。

4. 研究成果

(1) アディポネクチン誘導アポトーシスへの DGK 関与の解明

R59022 前処理時の細胞内およびミトコンドリア内の ROS をフローサイトメトリーで測定したところ、gAd 誘導による細胞内 ROS の産生が有意に抑制された (図 1)。

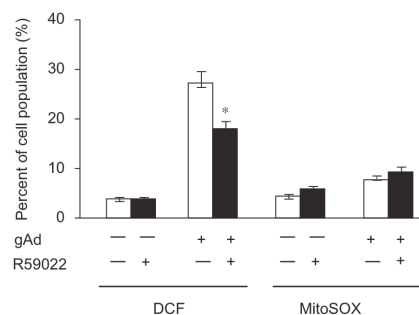


図 1

また R59022 前処理時の gAd 誘導 NO 産生量を測定したところ、有意に抑制された (図 2)。

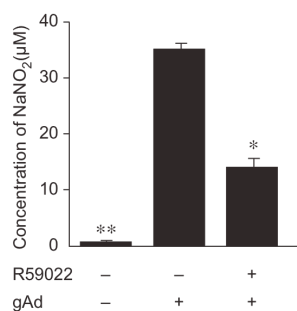


図 2

つぎに、DGK α を RNA 干渉によりノックダウンを行い、gAd 刺激を行った。その結果、ROS の産生は細胞内およびミトコンドリア内ともに抑制された (図 3)。

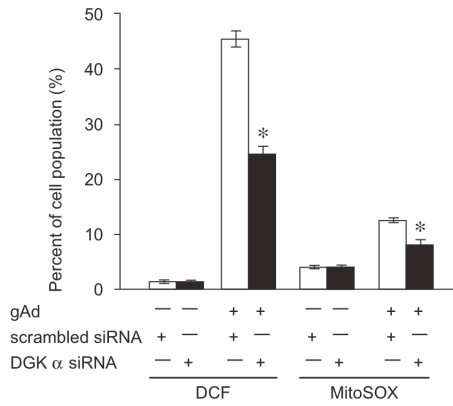


図 3

また、ROS の産生に關与する NOX1 の mRNA は gAd 単独刺激により誘導され、DGK α をノックダウンすると発現が抑制された (図 4)。

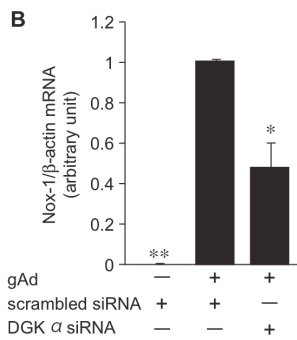


図 4

さらに gAd 刺激による NO の産生は DGK α のノックダウンにより抑制された (図 5)。

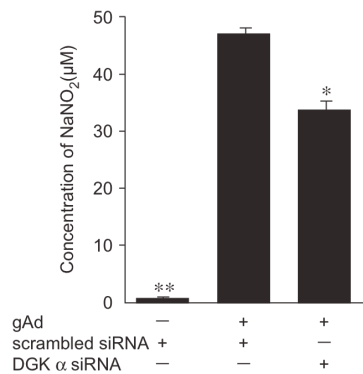


図 5

つぎに、gAd 誘導アポトーシスへの DGK の關与について検討した。その結果、R59022 前処理時および DGK α をノックダウンすると gAd 誘導アポトーシスが抑制された (図 6)。

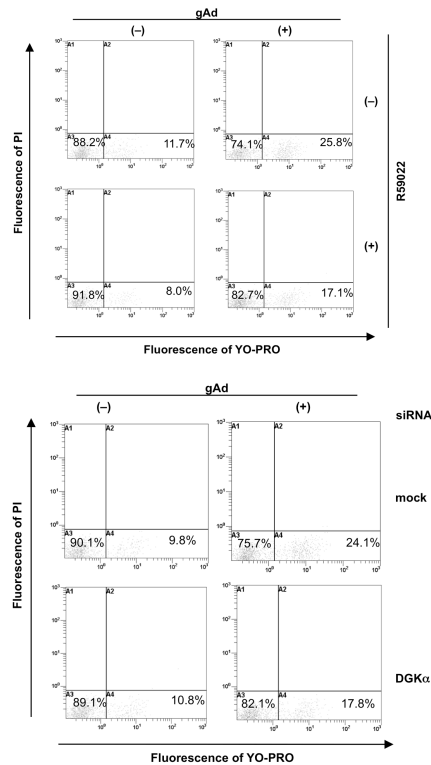


図 6

以上の結果から、gAd 刺激による ROS および NO の産生は DGK を介していること、さらに、gAd 誘導アポトーシスについても DGK が關与していることが示唆された。

(2) アディポネクチン誘導 IL-6 分泌への DGK 關与の解明

R59022 前処理時に gAd 刺激を行うと、IL-6 の mRNA 発現量およびタンパク質産生量が抑制された (図 7)。

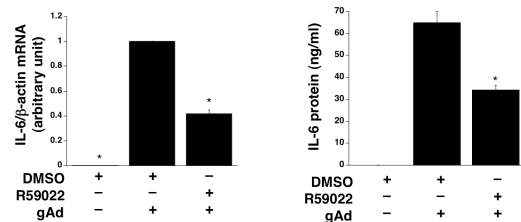


図 7

また R59022 前処理を行った際の gAd 刺激によるシグナル伝達について検討を行った

ところ、C/EBP β および Akt のリン酸化が抑制された (図 8)。

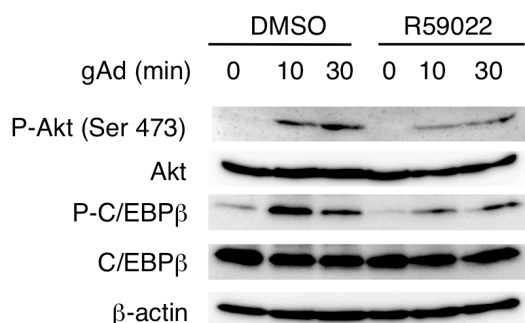


図 8

つぎに DGK α をノックダウンし gAd 刺激を行った。その結果 IL-6 の mRNA 発現量および IL-6 タンパク質量が抑制された (図 9)。

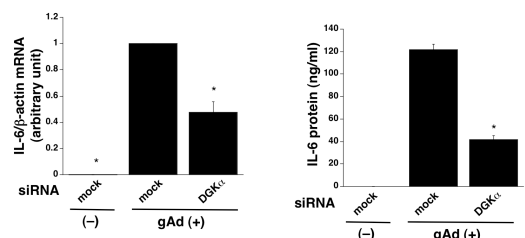


図 9

以上の結果から gAd 刺激による IL-6 の産生は DGK を介していることが示唆された。

(1) (2) の結果より、アディポネクチンによる免疫機構の調節に、イノシトールリン脂質情報伝達系が関与していることが示唆された。

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 5 件)

- ① Kamio N, Akifusa S, Yamashita Y. Diacylglycerol kinase α regulates globular adiponectin-induced reactive oxygen species. *Free Radic Res.* 45:336-341. 2011. 査読有
- ② Akifusa S, Kamio N, Shimazaki Y, Yamaguchi N, Nonaka K, Yamashita Y. Involvement of the JAK-STAT pathway

and SOCS3 in the regulation of adiponectin-generated reactive oxygen species in murine macrophage RAW 264 cells. *J Cell Biochem.* 111:597-606. 2010. 査読有

- ③ Yamaguchi N, Hamachi T, Kamio N, Akifusa S, Masuda K, Nakamura Y, Nonaka K, Maeda K, Hanazawa S, Yamashita Y. Expression levels of adiponectin receptors and periodontitis. *J Periodontol Res.* 45:296-300. 2010. 査読有
- ④ Fujimoto A, Akifusa S, Kamio N, Hirofuji T, Nonaka K, Yamashita Y. Involvement of mTOR in globular adiponectin-induced generation of reactive oxygen species. *Free Radic Res.* 44:128-134. 2010. 査読有
- ⑤ Kamio N, Akifusa S, Yamaguchi N, Nonaka K, Yamashita Y. Anti-inflammatory activity of a globular adiponectin function on RAW 264 cells stimulated by lipopolysaccharide from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 56:241-247. 2009. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 神尾 宜昌, 秋房 住郎, 山口 登, 野中和明, 山下 喜久, アディポネクチンはジアシルグリセロールキナーゼを介してアポトーシスを誘導する, 第 5 1 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 2 1 年 9 月 9 ~ 1 1 日, 朱鷺メッセ, 新潟県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神尾 宜昌 (KAMIO NORIAKI)

日本大学・歯学部・

ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号: 60546472