

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22792082

研究課題名（和文）セルサイクル調整因子 p53 制御による歯周組織再生：膜透過性低分子化合物の利用

研究課題名（英文）Effect of p53 on regeneration of periodontal tissue: Using small molecule compounds

研究代表者

北垣 次郎太 (Jirouta Kitagaki)

大阪大学・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号：90570292

研究成果の概要（和文）：

膜透過性低分子化合物 HLI98 と HLI373 を用いて、セルサイクル調節因子 p53 の歯周組織構成細胞の分化に対する効果を検討した。これらの化合物は p53 の発現を誘導したが、p53 の誘導には化合物を高濃度で添加する必要があるため、長期間培養により細胞死を誘導した。そこで、p53 の分解抑制化合物 Bortezomib を低濃度用いて p53 を誘導したところ、細胞死を誘導せず、歯周組織構成細胞の一つである歯根膜細胞の石灰化を誘導した。以上の結果から、p53 の誘導により、歯根膜細胞の分化誘導が促進されることが見いだされた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the effect of p53 on differentiation of periodontal ligament tissue using the small molecule compounds HLI98 and HLI373. HLI98 and HLI373 increased the expression of p53 in osteoblast. However, these compounds enhanced cell death when we performed long-term cell culture because of the toxicity of these compounds. Therefore, we utilized Bortezomib which inhibits degradation of p53 and stabilizes p53 expression. Bortezomib clearly induced p53 expression and calcification of periodontal ligament cell line MPDL-22. These data indicate that p53 enhances differentiation of periodontal ligament cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：骨代謝、p53、低分子化合物、再生医学

1. 研究開始当初の背景

歯周病の進行により喪失された歯周組織を元通りに再生させることは、歯周治療学における理想的目的の一つであり、これまで数多くの歯周組織再生療法が提案されている。しかしながら、骨・セメント質等の硬組織形成を制御する分子機構は未だ十分に解明されているとは言いがたく、そのような詳細な分子機構を人為的に制御することにより、歯周組織の再生効率を高める取り組みは、有効かつ安全な新規歯周組織再生医療を開発する上で、極めて重要な研究課題として残されている。

近年、p73、cyclin、p53 といったセルサイクル調節因子が、細胞周期を調節することにより細胞の恒常性を司ることが明らかとなった。その中でも、p53 が骨代謝に影響を及ぼす可能性が、ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験により示唆され (Wang et al. J Cell Biol. 2005)、p53 が骨代謝において重要な役割を演じていることが推測されるようになったが、その詳細なメカニズムは十分に検討されていない。

そこで本研究では、p53 の歯周組織構成細胞の分化に対する効果を、膜透過性低分子化合物を用いて解明することを着想した。

2. 研究の目的

本研究においては、p53 のタンパク量を調節する膜透過性低分子化合物を用いて、p53 の歯周組織への関わりを解析する。すなわち、p53 の歯周組織構成細胞の一つである歯根膜細胞の増殖・分化に対する制御機構を *in vitro* で解析する。

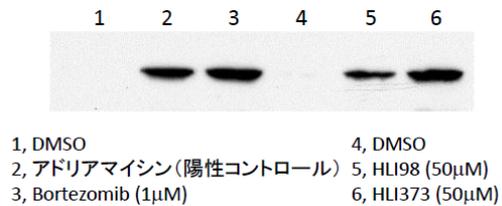
3. 研究の方法

実験には、本研究室にて樹立されたマウス歯根膜由来の細胞株 (MPDL-22) を供した。膜透過性低分子化合物としては HLI98、HLI373、Bortezomib を実験に供した。まず、MPDL-22 にこれらの化合物を添加し、p53 の発現量の変化をウェスタンブロット法にて検討した。MPDL-22 の分化に対するこれらの化合物の効果を検討するために、MPDL-22 を石灰化誘導培地 (α MEM 培地に β グリセロリン酸 5mM とアスコルビン酸 50mg/ml を添加) にて長期培養し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の検討を行うと同時に、アリザリンレッド染色を用いた石灰化ノジュール形成の検討を行った。

4. 研究成果

歯根膜細胞 (MPDL-22) に膜透過性低分子化合物を添加し、8 時間培養後、p53 の発現をウェスタンブロット法にて検討した。その結果、HLI98、HLI373、Bortezomib は MPDL-22

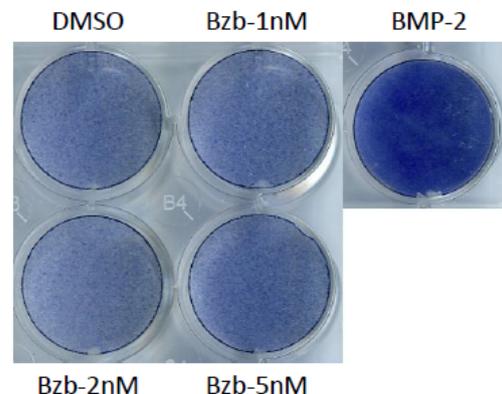
における p53 の発現を増加させた (図 1)。



(図 1 膜透過性低分子化合物の MPDL-22 における p53 の発現への効果)

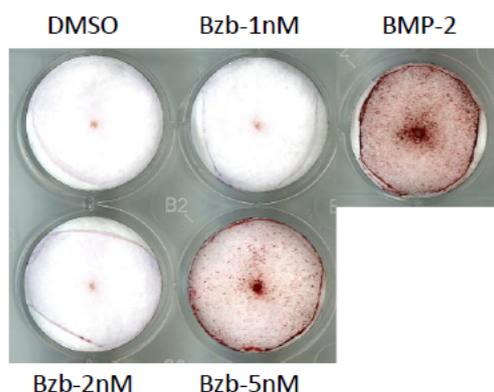
次に、これらの化合物の細胞増殖に対する役割を検討した。MPDL-22 に 2 日おきに低分子化合物を添加し、長期培養を行ったところ、HLI98 と HLI373 添加群では、p53 の誘導に高濃度の化合物が必要なことから、細胞死が誘導された。一方で Bortezomib 添加群では、p53 の誘導は比較的低濃度で可能なことから、細胞死は誘導されなかった (図には示さない)。以上のことから、以下の実験からは、膜透過性低分子化合物として Bortezomib を用いた。

歯根膜細胞を石灰化誘導培地を用いて長期培養すると、約 7 日目で ALP 活性が上昇し、約 14 日目で石灰化ノジュールの形成が認められることが知られている。そこで、Bortezomib の ALP 活性誘導能および石灰化ノジュール形成能を、それぞれ ALP 染色、アリザリンレッド染色を用いて検討した。Bortezomib 添加後 7 日後に細胞を播種し、ALP 染色を行ったところ、Bortezomib は ALP 活性を上昇させなかった (図 2)。またリアルタイム PCR にて、Bortezomib は ALP の mRNA 発現を上昇させないことを確認した (図には示さない)。



(図 2 Bortezomib の ALP 活性に対する効果、Bzb: Bortezomib、BMP-2 (50ng/ml) を陽性コントロールとして用いた)

しかしながら興味深いことに、添加後 14 日目の細胞を播種し、アリザリンレッド染色を行ったところ、Bortezomib 添加群では著明にアリザリンレッド陽性を呈し、石灰化ノジュールが形成されていることが明らかとなった (図 3)。



(図 3 Bortezomib の石灰化のジュール形成に対する影響、Bzb: Bortezomib、BMP-2 (50ng/ml) を陽性コントロールとして用いた)

以上の結果より、Bortezomib は歯根膜細胞の ALP 活性を上昇させなかったが、石灰化ノジュール形成を促進させることが明らかとなった。また同様の知見が、骨芽細胞株 C3H10T1/2 を用いた実験において既に報告されており (Qiang YW et al. Blood, 2009)、Bortezomib が歯根膜細胞においても ALP 活性の上昇は誘導させないものの、石灰化物を沈着させ、その分化を促進させることが示された。

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 DNA intercalator kormycin A preferentially kills transformed cells expressing wild type p53.
Kitagaki J and Yang Y
Biochemical and Biophysical Research Communications
414:186-191, 2011 (査読有り)

② Fgf8 is essential for formation of the ductal system in the male reproductive tract.
Kitagaki J, Ueda Y, Chi X, Sharma N, Elder C, Truffer E, Costantini F, Lewandoski M and Perantoni AO
Development

38:5369-78, 2011 (査読有り)

③ A novel Wilms tumor 1 (WT1) target gene negatively regulates the WNT signaling pathway.

Kim MS, Yoon SK, Bollig F, Kitagaki J, Hur W, Whye NJ, Wu YP, Rivera MN, Park JY, Kim HS, Malik K, Bell DW, Englert C, Perantoni AO and Lee SB

Journal of Biological Chemistry
285:14585-93, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

① Kormycin A は p53 依存的にガン細胞のアポトーシスを誘導する

北垣次郎太

第 34 回日本分子生物学会年会

2011 年 12 月 13 日、横浜

② SIRT1 による歯根膜細胞の石灰化制御
中村友美、山下元三、河原貴展、橋本悠平、梶川哲宏、森健太、前田憲一郎、北垣次郎太、柳田学、山田聡、北村正博、村上伸也
第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会
2011 年 10 月 21 日、大阪

③ p53 新規誘導化合物の同定とその作用機序の解析

北垣次郎太、村上伸也

第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会

2011 年 10 月 21 日、大阪

④ 歯周病病原菌 P. g 感染が血球新生に及ぼす影響

前田憲一郎、久保田実木子、大原廣之、伊山舜吉、沢田啓吾、竹立匡秀、山下元三、北垣次郎太、市川朋生、北村正博、村上伸也

第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会

2011 年 10 月 20 日、大阪

⑤ Fgf8 is essential for male reproductive tract development

Jirouta Kitagaki

第 33 回日本分子生物学会年会

2010 年 12 月 10 日、神戸

⑥ アポトーシス誘導遺伝子 p53 に対する選択誘導化合物の同定とその作用機序の解析

北垣次郎太、村上伸也

第 53 回日本歯周病学会秋季学術大会

2010 年 9 月 19 日、高松

⑦ FGF-2 は MAPK 依存性に BMP による Smad リン酸化を制御する

河原貴展、山下元三、橋本悠平、梶川哲宏、前田憲一郎、北垣次郎太、山田聡、北村正博、

村上伸也
第 132 回日本歯科保存学会春季学術大会
2010 年 6 月 4 日、熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北垣 次郎太 (Jirouta Kitagaki)
大阪大学・歯学部附属病院・特任助教
研究者番号：90570292