

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23792487

研究課題名（和文） 歯肉上皮組織における RANKL の発現・機能解明

研究課題名（英文） Expression and function of RANKL in gingival epithelium

研究代表者 臼井 通彦

(USUI MICHIIHIKO)

九州歯科大学・歯学部・歯周病学分野・准教授

研究者番号：10453630

研究成果の概要（和文）：歯肉上皮細胞株であるCa9-22細胞からRNA、タンパクを抽出しRT-PCR法にてRANKL mRNA、western blotting法にてタンパク発現の有無を調べた結果、RANKLの発現を確認することができた。次にマウスの歯周組織に免疫染色を行い、RANKLタンパクの発現を検証した。付着上皮、歯肉溝内上皮、口腔歯肉上皮にその発現をみることもできた。次に、歯肉上皮細胞をTNF- α で刺激し、RANKL 発現に対する影響を検討した結果、RANKL発現はTNF- α 刺激により有意に増加した。最後にTNF- α がRANKL発現を誘導する経路を調べるために、PKA経路の阻害および活性化を行った。その結果、Ca9-22においてPKA阻害剤（H89）で処理されたTNF- α はRANKL mRNAおよびRANKLタンパクの発現を有意に減少させ、PKA活性化因子（Forskolin）で処理されたTNF- α はRANKL mRNAおよびRANKLタンパクの発現を有意に増加させた。次に、歯肉上皮細胞の発現するRANKLが実際に機能するか否かを検証するために、破骨細胞前駆細胞と歯肉上皮細胞を共存培養した。その結果、わずかではあるが破骨細胞が形成され、TNF- α 、Forskolin処理により、形成される破骨細胞数は増加した。歯肉上皮細胞はTNF- α -PKAシグナルを介したRANKL産生により破骨細胞形成を支持することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Periodontitis is a chronic inflammatory disease characterized by the destruction of alveolar bone. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) is known to be an essential factor for osteoclastogenesis. Recent clinical studies indicate that levels of RANKL in the gingival crevicular fluid are increased in periodontitis patients. Although the gingival sulcus is lined by gingival epithelial cells (GECs), RANKL expression in GECs is not fully understood. RT-PCR, western blotting and immunohistochemistry were performed to confirm RANKL expression in GECs and in gingival tissue. Ca9-22 cells, a human gingival epithelial cell line, were treated with tumor necrosis factor (TNF)- α , antibodies against TNF receptors, and an inhibitor and an activator of PKA signaling. The levels of RANKL expression were examined by real time PCR and western blotting. GECs and bone marrow-derived osteoclast precursors were co-cultured to examine the effect of GECs-produced RANKL on osteoclast formation. RANKL mRNA and protein were expressed in GECs. Immunohistochemistry

also showed RANKL and TNF- α expression in gingival epithelium, but not in gingival connective tissue. TNF- α increased the levels of RANKL expression in GECs. TNF- α -induced RANKL expression was inhibited by antibody against TNF receptor type 1 (TNFR1) and an inhibitor of PKA signaling. GECs constitutively induced osteoclast formation. This effect was increased significantly by TNF- α and activator of PKA signaling, and prevented by RANK-Fc. TNF- α induces RANKL expression through PKA signaling in GECs, which regulate osteoclastogenesis. GECs may take part in progression of alveolar bone destruction by periodontitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3200000 円	960000 円	4160000 円

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：歯肉上皮細胞 RANKL PKA signaling 破骨細胞形成

1. 研究開始当初の背景

歯周炎において歯周病原菌の侵襲により TNF- α や IL-1 などの炎症性サイトカインが産生され、歯周組織が破壊される。歯槽骨の吸収は破骨細胞によって引き起こされ、その分化には RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が必須である。近年、歯周炎に罹患した患者の歯肉溝内浸出液中で RANKL の量が増加し、その decoy 受容体である osteoprotegerin の量は減少していることが明らかとなった。歯肉溝は歯肉上皮組織で構成されているにも関わらず、歯肉上皮細胞における RANKL の発現については十分に知られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯肉上皮組織における RANKL, OPG の発現と歯肉上皮細胞においてどのような因子が RANKL 発現を制御しているのかを明らかにすることである。さらに、歯肉上皮細胞に発現する RANKL が破骨細胞形成能を持つか否かを検証することである。

3. 研究の方法

(1) 培養歯肉上皮細胞における RANKL, OPG の発現

ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 は DMEM (FBS10%)、HO1- μ -1 は RPMI/MEM (FBS10%)、初代培養ヒト口腔内上皮細胞 (PGE) は OKM (FBS10%) にて培養し、RT-PCR 法、リアルタイム

RT-PCR 法、Western blotting 法にて RANKL, OPG の発現を確認した。

(2) 歯肉上皮組織における RANKL, OPG, TNF- α 、TNF- α I 型受容体 (TNFR1) の発現

生後 4 週齢マウスの歯周組織を用いて、各蛋白の発現を免疫組織化学染色にて確認した。

(3) 阻害 assay

TNF- α による RANKL 発現誘導のシグナル pathway を明らかにするために、TNFR1, TNFR2, PKA シグナリング阻害剤 (PKI, H89), Erk 阻害剤 (PD98059), NF- κ B 阻害剤 (Bay11-7082), p38 阻害剤 (SB208350) を添加し、RANKL 発現をリアルタイム PCR にて定量的に計測した。

(4) 破骨細胞形成 assay (歯肉上皮細胞と破骨細胞前駆細胞との共培養)

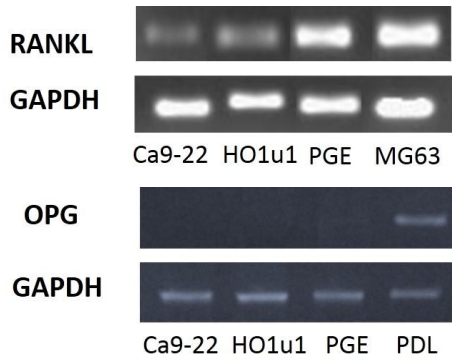
Ca9-22 細胞とマウス骨髄細胞より分離した破骨細胞前駆細胞を共培養した。また、TNF- α 、Forskolin (PKA シグナル activator) を添加し、形成される破骨細胞数を計測した。

4. 研究成果

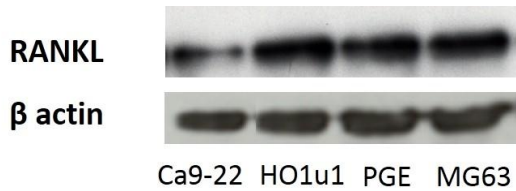
(1) 培養歯肉上皮細胞における RANKL, OPG の発現

ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22、HO1- μ -1, PGE において RANKL を mRNA レベルで発

現していた。一方、OPG の発現を確認することはできなかった。

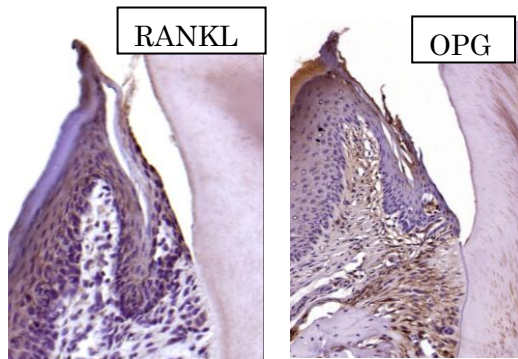


また、Western blotting 法による蛋白質発現でも、RANKL 蛋白の発現は認められたが、OPG 蛋白に関しては、その発現を認めることはできなかった。

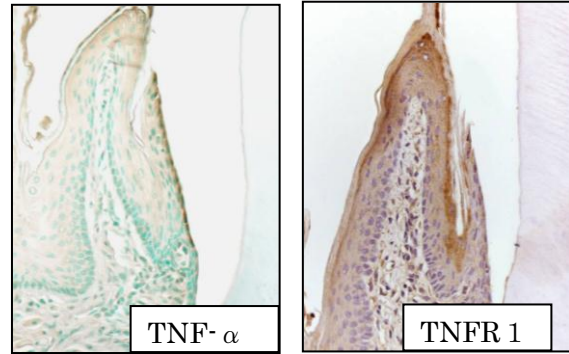


(2) 歯肉上皮組織における RANKL、OPG、TNF- α 、TNF- α I 型受容体 (TNFR1) の発現

マウス歯肉上皮組織において、RANKL、OPG 抗体で免疫染色を行った結果、RANKL を発現していたが、OPG は発現してなかった。また、RANKL の発現は歯肉溝上皮や口腔上皮にもみられるものの、付着上皮に強くかった。

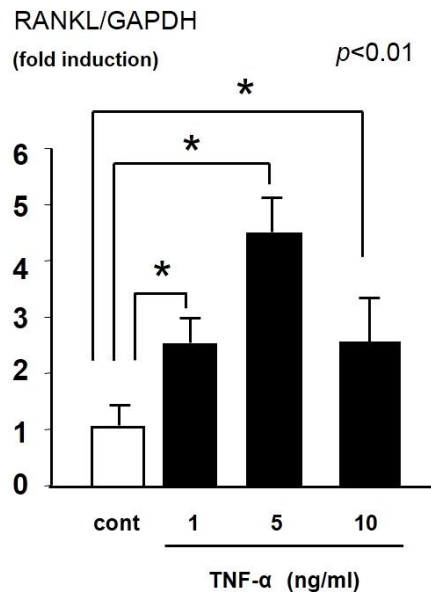


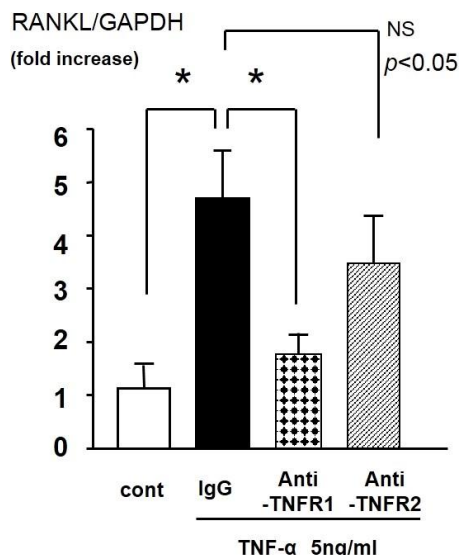
次に、RANKL 発現を制御していると考えられる、TNF- α とその受容体 TNFR1 も同様に免疫染色をおこなった。両者共に、歯肉上皮における RANKL の発現部位とは完全に一致しないものの、やはり付着上皮に強く発現していた。以上の結果より、歯肉上皮において、RANKL 発現を TNF- α -TNFR1 が制御している可能性が示唆された。



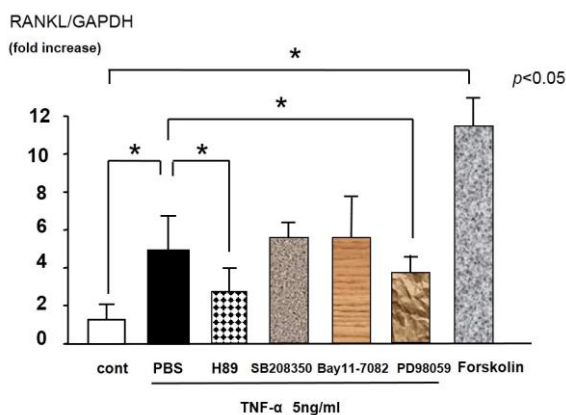
(3) 歯肉上皮細胞における RANKL 発現は PKA シグナリングを介する

歯肉上皮細胞における RANKL 発現に関与するシグナルを明らかにするために、中和抗体ならびに阻害剤を用いた実験を行った。まず、TNF- α の添加により、RANKL 発現への影響を検証した結果、TNF- α により RANKL 発現は増強した。次に、TNF- α の受容体を確認するために、TNFR1 と TNFR2 の中和抗体を用いて、RANKL 発現を計測したところ、TNFR2 中和抗体ではその発現は変化が見られなかったが、TNFR1 中和抗体では抑制された。この結果より、歯肉上皮細胞における TNF- α による RANKL 発現は TNFR1 を介していることが示唆された。





次に、RANKL 発現を制御するシグナルとして知られる PKA シグナリングについて、inhibitor である H89 と activator である forskolin を用いて、RANKL 発現に対する影響を検証した。TNF- α によって誘導される RANKL 発現は H89 によって抑制され、forskolin によって上昇した。また、細胞内シグナリング因子として知られる NF- κ B, Erk, p38 に関して、阻害剤をしようして RANKL 発現に対する影響を検証した。Erk 阻害剤である SB208350 は約 20% RANKL 発現を抑制したが、他の阻害剤は全く影響を与えなかった。以上の結果より、歯肉上皮細胞において、TNF- α による RANKL 発現誘導は PKA シグナリングを介することが示唆された。



(5) 歯肉上皮細胞の産生する RANKL は破骨細胞形成を支持する。

Ca9-22 細胞と破骨細胞前駆細胞を共培養したところ、わずかではあるが、破骨細胞の形成が見られた。また、この破骨細胞形成は RANK-Fc を添加することで、抑制されたため、歯肉上皮細胞の産生する RANKL が破骨細胞形成に関与しているこ

とが示唆された。さらに、TNF- α や Forskolin の添加によって、形成される破骨細胞数は増加した。以上の結果より、歯肉上皮細胞による破骨細胞形成に TNF- α PKA シグナリングが関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文

(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. Morishita A, Ariyoshi W, Okinaga T, Usui M, Nakashima K, Nishihara T. A. actinomycetemcomitans LPS Enhances Foam Cell Formation Induced by LDL. *Journal of Dental Research* 92(3)巻 241-246 頁 2013 年

2. Nishii K, Usui M, Yamamoto G, Yajima S, Tsukamoto Y, Tanaka J, Tachikawa T, Yamamoto M. The distribution of S100A8 and S100A9 in gingival epithelium of mice. *Journal of Periodontal Research*. 48(2)巻 235-242 頁 2012 年

3. Tsukamoto Y, Usui M, Yamamoto G, Takagi Y, Tachikawa T, Yamamoto M, Nakamura M. Role of junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. *Journal of Periodontal Research* 47(6)巻 750-757 頁 2012 年

4. Nagahama Y, Obama T, Usui M, Kanazawa Y, Iwamoto S, Suzuki K, Miyazaki A, Yamaguchi T, Yamamoto M, Itabe H. Oxidized low-density lipoprotein-induced periodontal inflammation is associated with the up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin synthase 1 in human gingival epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 413(4)巻 566-71 頁 2011 年

5. 白井通彦, 滝口尚, 史春, Enkhzaya Guruudivaa, 宮澤康, 菅野真莉加, 野瀬冬樹, 斎藤彰大, 菊池真理子, 富永和宏, 西原達次, 根岸洋一, 山本松男 超音波照射のヒト歯肉上皮細胞に対する影響について *日本歯科保存学会誌* 54(6)巻 2011 年

[学会発表] (計6件)

1. **Usui M**, Fujihara R, Nishii K, Yamamoto M, Nakashima K. Gingival epithelial cells regulate osteoclast formation by producing RANKL. The 98th annual meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology. Los Angeles, USA, 2012年10月

2. Sato T, Chida D, Iwata T, **Usui M**, Enoki Y, Matsumoto M, Xu R, Sunamura S, Ochi H, Fukuda T, Takeda S, Yoda T. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis is essential for regulation of both bone and fat metabolism via melanocortin receptor 2. American Society of Bone and Mineral Research 34th Annual Meeting, Minneapolis, USA, 2012年10月

3. 藤原亮一、臼井通彦、西井浩介、塚本康巳、山本松男 TNF- α は歯肉上皮細胞において TNF I 型受容体-PKA シグナリングを介して RANKL 発現を誘導する。第136回日本歯科保存学会 沖縄 2012年6月

4. Takiguchi T, Kikuchi M, Saito A, **Usui M**, Yamamoto M. Effect of titanium surface decontamination using a newly developed ultrasonic water jet cleaner. 7th Conference of European Federation of Periodontology. Vienna, Austria, 2012年6月

5. 藤原亮一、臼井通彦、西井浩介、塚本康巳、山本松男 TNF- α induces RANKL Expression in Gingival Epithelial Cells through PKA Signaling. 第32回昭和歯学会総会 東京 2012年7月

6. **Usui M**, Fujihara R, Yano A, Saito A, Yamamoto M. TNF- α induces RANKL expression in gingival epithelial cells. American Society of Bone and Mineral Research 33rd Annual Meeting, San Diego, USA, 2011年9月

[図書] (計2件)

1. **Usui M**, Okamatsu Y, Fujihara R, Nishii K, Yajima S, Saito A, Nakashima K, Yamamoto M. The New Frontiers in Research for Oral Cancer
51-64頁 Maruzen 2013年

2. **臼井通彦*** 歯の全身的要因：代謝性疾患と喫煙 季刊歯科医療 2(26)巻 41-49頁 2012年

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井通彦 (USUI MICHHIKO)

昭和大学・歯学部・助教

九州歯科大学・歯学部・助教

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10453630

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

佐藤毅 (SATO TSUYOSHI)

埼玉医科大学・歯学部・講師

研究者番号：60406494