

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792330

研究課題名(和文) 脳由来神経栄養因子による歯周組織再生における歯肉上皮侵入阻害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of BDNF-induced suppression of gingival epithelium invasion in the process of periodontal tissue regeneration

研究代表者

松田 真司 (Matsuda, Shinji)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：30611321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子(BDNF)は歯肉上皮細胞においては、歯周靭帯細胞とは異なり、増殖を促進しなかった。またBDNF高濃度において、歯肉上皮細胞のアポトーシスを誘導した。これはtrkB-ERKカスケードではなく、p75受容体を介したJNKシグナル伝達経路が優位に働き、カスパーゼ3を活性化させ、アポトーシスを促進させていることが明らかとなった。これらの結果はBDNFが歯周組織再生過程における歯肉上皮の深部増殖抑制の一因と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) did not affect proliferation of human gingival epithelial cells (HGEC) while BDNF enhanced the proliferation of human periodontal ligament cells (HPL cells). Furthermore BDNF at high concentration induced apoptosis of HGEC. BDNF-induced apoptosis was activated by caspase-3 through p75 receptor and JNK signaling pathway. These findings suggested that BDNF can activate not trkB-ERK but p75-JNK signaling cascade, which do not affect gingival epithelial cells proliferation.

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：BDNF 歯周組織再生 歯肉上皮細胞 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は神経細胞のみならず、様々な細胞の増殖、分化に関与することが知られている。これまでに、BDNF が歯周組織再生に有用であることを、*in vivo*, *in vitro*の研究において明らかにしてきた (Takeda et al, 2005, Kajiya et al, 2008, Matsuda et al, 2012)。歯周組織再生はシャープリー繊維の埋入を伴った新生セメント質と歯槽骨、及び歯周靭帯を再構築することであるが、歯肉上皮の侵入はこれらの組織の再構築の場を占有し、歯周組織再生を阻害する

2. 研究の目的

ビーグル犬の根分岐部病変 級モデルを用いた実験では、BDNF による歯周組織再生過程で歯肉上皮の侵入は認められなかった。BDNF を安全で確実性の高い歯周組織再生療法として臨床応用するためには、この重要な知見をより詳細に分子レベルで理解し、再生のメカニズムを解明する必要がある。そこで、本研究では BDNF の歯肉上皮細胞に対する影響を明らかにするため、歯肉上皮細胞の増殖、またその増殖に関わるシグナル伝達経路に着目し、実験を行った。

3. 研究の方法

1. 供試細胞は、大阪大学村上教授から分与いただいた不死化ヒト歯肉上皮細胞株 (OBA9)、ヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) 及び広島大学高田教授から分与いただいた不死化ヒト歯周靭帯細胞株 (HPL cells) を供試した
2. BDNF の細胞増殖に及ぼす影響： OBA9、HGEC を KB2 で、HPL cells を DMEM で培養した。subconfluent に達した時点で、BDNF (0, 10, 25, 50, 100, 200 ng/ml) を各種時間で刺激し実験を行った。BDNF 24 時間刺激後の細胞増殖を、BrdU assay kit で測定し、アポトーシスを起こした細胞を TUNEL 染色にて解析した。
3. *trkB* および *p75* の発現： BDNF に対する受容体である *trkB* と *p75* の発現を、Western blotting 法によって検討を行った。
4. リン酸化 ERK およびリン酸化 JNK の検出： BDNF 刺激によるリン酸化 ERK とリン酸化 JNK

の発現を BDNF (0, 10, 50, 100, 200 ng/ml) 刺激後、Western blotting 法によって分析した。また、JNK のリン酸化の阻害剤である SP600125 の前処理や、*p75*, *trkB* の siRNA の導入による BDNF 刺激に対する影響を確認した。

4. 研究成果

1. BDNF 刺激は、HPL cells の増殖を促進したが、HGEC の増殖には影響を与えなかった。(Fig.1) また BDNF は HGEC のアポトーシスは誘導したが、HPL cells のアポトーシスは誘導しなかった (Fig.2)。
2. HPL cells と OBA9 は *trkB*, *p75* を発現していた (Fig.3)。また、BDNF 刺激は、HPL cells の *trkB* のリン酸化を明らかに促進したのに対し、OBA9 の *trkB* のリン酸化は微弱であった。
3. BDNF は HPL cells の ERK のリン酸化を促進したのに対し、HGEC の ERK のリン酸化は変化させなかった。また BDNF 刺激は、HPL cells の JNK のリン酸化には影響を与えなかったのに対し、OBA9 の JNK のリン酸化を促進した (Fig.4)。
4. BDNF 刺激は OBA9 のカスパーゼ 3 の活性化を促進し、この活性化は JNK 阻害剤 SP600125 前処理により抑制された (Fig.5)。
5. *p75* siRNA 導入は OBA9 の *p75* の発現を減弱させた。BDNF 刺激による、JNK のリン酸化、カスパーゼの活性化が *p75* siRNA 導入によって抑制された (Fig.6)。

Fig.1

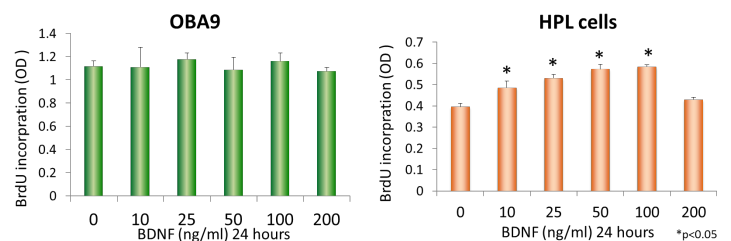


Fig.2

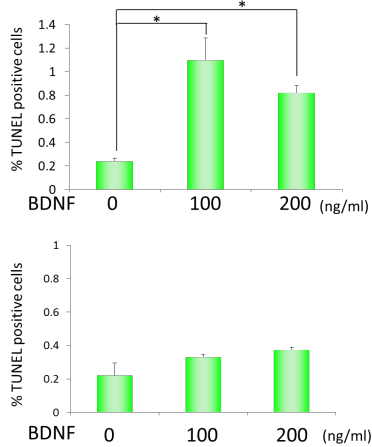


Fig.3

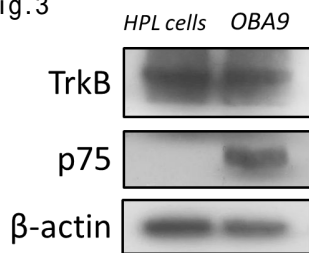


Fig.4

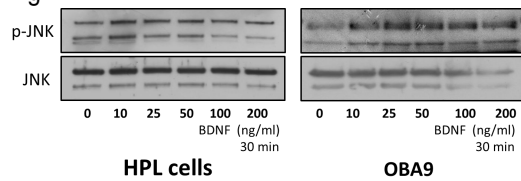


Fig.5

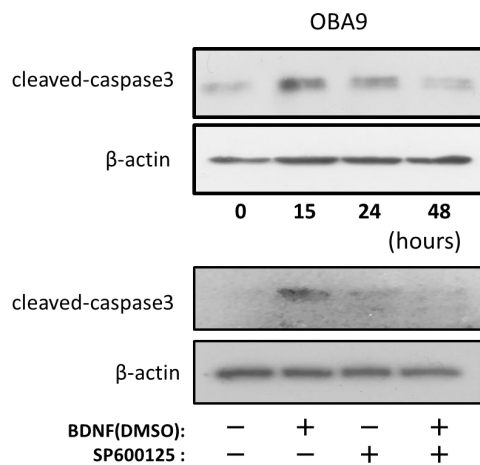
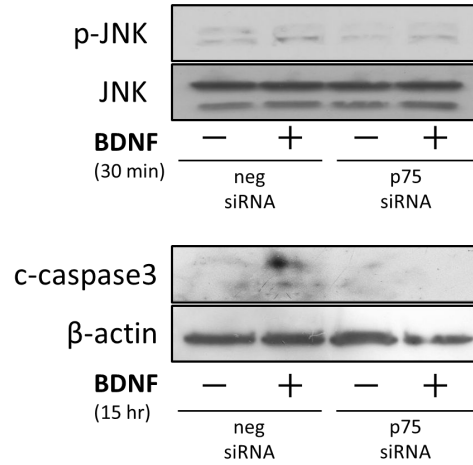


Fig.6



(考察) BDNFは歯肉上皮細胞においては、歯周靱帯細胞とは異なり、trkB-ERKカスケードではなく、p75受容体を介したJNKシグナル伝達経路が優位に働き、カスパーゼ3を活性化させ、アポトーシスを促進する可能性が示唆された。これらの結果からBDNFによる歯周組織再生過程における歯肉上皮の深部増殖抑制のメカニズムが明らかになった。

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 2 件)

1. BDNF mimetic compound LM22A-4 regulates cementoblast differentiation via the TrkB-ERK/Akt signaling cascade. Kajiya M, Takeshita K, Kittaka M, Matsuda S, Ouhara K, Takeda K, Takata T, Kitagawa M, Fujita T, Shiba H, Kurihara H Int Immunopharmacol. 2014 Apr; 19(2):245-52 査読有
2. Irsogladine maleate regulates the inflammatory related genes in human gingival epithelial cells stimulated by Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Miyagawa T, Fujita T, Ouhara K, Matsuda S, Kajiya M, Hayashida K, Imai H, Yoshimoto T, Iwata T, Shiba H, Abiko Y, Kurihara H. Int Immunopharmacol. 2013 Feb;15(2):340-7 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 脳由来神経栄養因子はヒト歯肉上皮細胞のアポトーシスカスケードを活性化する：柏井桂，加治屋幹人，藤田剛，松田真司，武田克浩，柴秀樹，栗原英見；日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会(第 139 回)(2013 年 10 月 17,18 日，秋田)
2. 脳由来神経栄養因子のヒト歯肉上皮細胞に与える影響：柏井桂，加治屋幹人，藤田剛，松田真司，武田克浩，柴秀樹，栗原英見；第 137 回日本歯科保存学会学術大会(秋季)(2012 年 11 月 22,23 日，広島)
3. The effect of BDNF on human gingival epithelial cells : K.Kashiwai, S.Matsuda, T.Fujita, M.Kajiya, K.Takeda, H.Shiba, H.Kurihara,: The American Academy of Periodontology (2012 年 9 月 29 日～10 月 2 日，ロサンゼルス，アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者：
松田 真司 (Shinji Matsuda)
広島大学・病院・病院助教
研究者番号：30611321

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：