

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862046

研究課題名(和文) アデノシンによる歯周組織メカニカルストレス応答機構の制御

研究課題名(英文) Regulation of mechanical stress-induced responses by adenosine in periodontal tissue

研究代表者

竹立 匡秀 (Takedachi, Masahide)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60452447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、in vitro、in vivoの両面から歯周組織にメカニカルストレスを加えた際のアデノシンの役割について解析を行った。ヒト歯根膜細胞において伸展刺激下ではアデノシンレセプター(AdoR)の発現変化を認めなかったが、マウス矯正モデルでは牽引側において歯根膜組織におけるアデノシン産生酵素CD73分子の発現が上昇した。一方で、歯牙矯正力によって歯根膜組織が低酸素環境に誘導されること、さらに低酸素環境ではAdoRの発現が制御を受ける可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the roles of adenosine in mechanical stress-induced responses in periodontal tissue were analyzed. In vitro tensile mechanical stress didn't impact the adenosine receptor (AdoR) expressions of human periodontal ligament cells. On the other hand, the expression of CD73 was up-regulated at tension sites in the periodontal ligament under orthodontic tooth movement in a mouse model. In addition, orthodontic tooth movement made periodontal ligament a hypoxic condition. Moreover, hypoxic condition might affect the AdoR expression of human periodontal ligament cells in vitro.

研究分野：歯周病学

キーワード：アデノシン 歯根膜 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

咀嚼時咬合力などの生理的な範囲のメカニカルストレスは、歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担う。一方、早期接触やブラキシズムなどの外傷性咬合、あるいは過度の矯正力に伴う病的なメカニカルストレスは、歯周組織の恒常性を破綻させ、歯周病の進行による歯周組織の破壊を促進させることが知られている。このように歯周組織の特性を理解する上でメカノバイオロジ的な視点は欠くことができないにも関わらず、歯周組織におけるメカニカルストレス応答性の分子機構については未だ十分に解明されているとは言い難い。

一般に、組織を構成する各種細胞は、それぞれ伸展刺激や流れ刺激、重力などの多彩な外力に対し、メカノセンサーを駆使し細胞機能を調節することにより応答性を示す。この応答メカニズムにおいて重要な役割を担う分子の一つがアデノシン三リン酸(以下 ATP)である。ATP は、ミトコンドリアで産生され、エネルギー源として細胞質内に存在する一方で、各種メカニカルストレスに反応して細胞外に放出される。細胞外に放出された ATP は ATP 受容体であるイオンチャネル型 P2X 受容体、あるいは G タンパク質共役型 P2Y 受容体を活性化することにより、各種細胞機能を調節する。興味深いことに細胞外 ATP が骨芽細胞・破骨細胞に発現する P2X・P2Y 受容体の活性化を介してそれぞれの増殖や分化、細胞死など各種細胞機能を制御し、骨代謝の調節因子として重要な役割を担うことが *in vivo*、*in vitro* の研究から明らかとなっていた (Orriss et al. *Curr Opin Pharmacol*, 2010)。このことは、重力などの力学的刺激に応答する臓器としての骨組織を特徴付けるものと考えられた。

一方で、細胞外 ATP は、細胞膜上に発現する各種酵素群により脱リン酸化されることにより速やかにアデノシン (Ado) まで分解される。Ado は ATP 同様、細胞膜上に発現する Ado 受容体 (AdoR) を介して、様々な生体反応を制御することが知られている。AdoR には Ado の親和性と共役する G タンパク質の違いから A1、A2a、A2b、A3 の 4 つのサブタイプが存在する。研究代表者は細胞外 ATP の分解過程において Ado 産生を触媒する酵素である CD73 分子に着目し、CD73 ノックアウトマウス (CD73KO) を用いた解析から、CD73 により産生された細胞外 Ado が A2b AdoR の活性化を介して骨芽細胞の分化を促進的に制御し、骨の恒常性維持に重要な役割を担っていることを見出し、報告した (Takedachi et al. *J Cell Physiol*, 2012)。この報告は、*in vivo* における内因性 Ado の骨形成に果たす役割を初めて示したものであり、その後発表された A2b AdoR ノックアウトマウスを用いた研究により Ado の骨形成調節因子としての役割がさらに裏付けられた。

咬合力や矯正力などのメカニカルストレ

スに反応し硬組織と結合組織とのリモデリングにおいて中心的な役割を担うのは歯根膜である。歯根膜由来細胞を用いた研究では、メカニカルストレスによって放出された ATP が autocrine 的あるいは paracrine 的に作用し、P2Y1 受容体シグナルを介してオステオポンチンや RANKL の発現調節に関与していること、また P2X7 受容体活性化により IL-1 β の産生が誘導されることが報告されている。同様にして、研究代表者のこれまでの研究成果より、ATP の代謝産物である Ado も歯根膜の細胞機能の調節に関与しているものと想像されるが、Ado の歯根膜細胞に対する作用、さらに、歯周組織のメカニカルストレス応答性における CD73 あるいは Ado の役割については、ほとんど解析がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、歯根膜における Ado の役割と、人工的なメカニカルストレスを付加した際の歯周組織の応答過程における Ado の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化誘導

ヒト歯根膜細胞を 10 mM β -グリセロリン酸、50 μ g/mL アスコルビン酸、10% FCS 含有 α -MEM にて培養し、3 日毎に培地交換を行った。

(2) ヒト歯根膜細胞への伸展刺激

ヒト歯根膜細胞への進展刺激は、Menicon Life Science 社製培養細胞進展システム ShellPa[®] を用いて行った。なお、シリコーン樹脂製のストレッチチャンバーはフィブロンクチンコーティング処理を施し、細胞を播種した。

(3) マウス矯正モデルの解析

C57BL/6 の上顎第一臼歯と第二臼歯の歯間部に厚み 0.54mm の 0 リングエラストックモジュールを挿入し、歯牙にメカニカルストレスを加えた。過剰麻酔により屠殺後、上顎骨を採取し、4%PFA にて固定し、マイクロフォーカス 2D/3DXCT 装置を用いて断層撮影を行い、その後、三次元構築を行った。EDTA にて脱灰し、OCT コンパウンドに包埋後、凍結薄切切片を作成した。なお、一部の実験においては屠殺 1 時間前に低酸素部位に集積することが知られている 60 mg/kg ピモニダゾールを腹腔内投与した。

(4) 免疫染色

7mm の凍結薄切標本を 2.5% ヒアルロニダーゼ処理後、0.3% 過酸化水素にて処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。さらに 3% BSA にて 4-8 時間以上のブロッキング処理後、一次抗体として抗マウス CD73 抗体 (TY/23)、あるいは抗ピモニダゾール抗体を、二次抗体としてビオチン標識抗ラット IgG2a

抗体あるいはビオチン標識抗ラビット IgG 抗体を反応させ、ABC kit、DAB を用いて発色した。

(5) ヒト歯根膜細胞およびヒト歯肉線維芽細胞の低酸素環境下での培養

ヒト歯根膜細胞およびヒト歯肉線維芽細胞の低酸素環境下での培養は、O₂濃度を調整することができる O₂-CO₂ インキュベータを用いて行った。なお、本研究で用いた低酸素環境は O₂濃度 1%とした。

4. 研究成果

(1) ヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程におけるアデノシンレセプター発現

ヒト歯根膜細胞の石灰化誘導培地にて培養し、アデノシンレセプター発現について経時的に解析したところ、培養 7 日目および培養 14 日目において A1 アデノシンレセプターの遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。一方で、A2a および A2b アデノシンレセプターの遺伝子発現に著明な変化は認めなかった(図 1)。

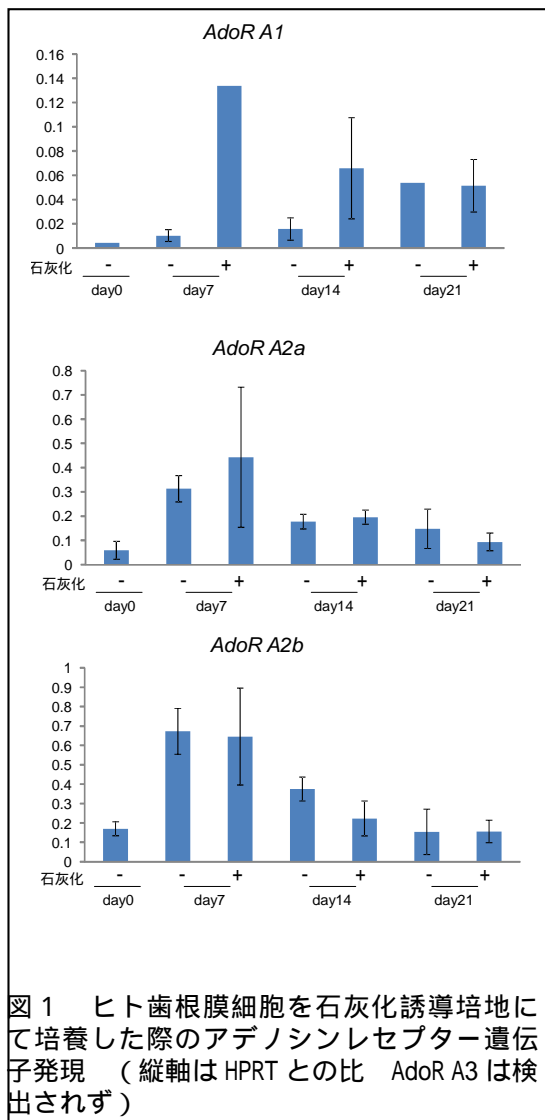


図 1 ヒト歯根膜細胞を石灰化誘導培地にて培養した際のアデノシンレセプター遺伝子発現 (縦軸は HPRT との比 AdoR A3 は検出されず)

(2) ヒト歯根膜細胞への伸展刺激を加えた際のアデノシンレセプター発現

ヒト歯根膜細胞に 30 回/分、伸展率 10%の刺激を 24 時間加えた際のアデノシンレセプター遺伝子発現を real-time PCR にて解析した結果、いずれのサブタイプにおいても著明な変化を認めなかった(図 2)。

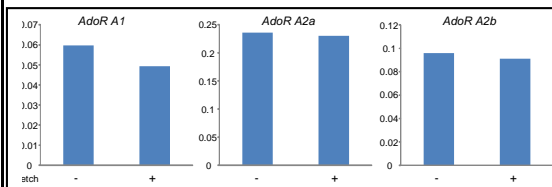


図 2 ヒト歯根膜細胞に伸展刺激を加えた際のアデノシンレセプター遺伝子発現 (縦軸は HPRT との比 AdoR A3 は検出されず)

(3) マウス矯正モデルにおける CD73 分子の発現および低酸素部位の同定

マウス矯正モデルにてエラスティックモジュールを挿入し 2 日後の歯根膜組織における CD73 分子の発現を免疫染色法にて検討した結果、牽引側にて発現が上昇していることが明らかとなった(図 3)。

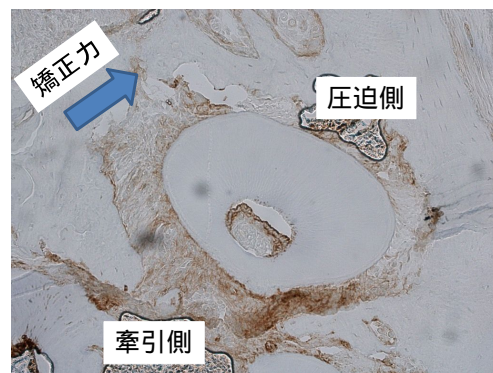


図 3 マウス歯牙矯正モデルにおける CD73 分子の発現

一方で、屠殺前にピモニダゾールを腹腔内投与し、歯周組織における同分子の集積を免疫染色法にて解析したところ、予想された通り圧迫側における歯周組織が低酸素状態となっていることが示唆される染色像が得られた。

(4) 低酸素環境での培養がヒト歯根膜細胞および歯肉線維芽細胞のアデノシンレセプターおよび CD73 の発現に及ぼす影響

歯根膜細胞あるいは歯肉線維芽細胞を 1%酸素濃度下にて 12 時間培養した際の各アデノシンレセプターおよび CD73 の遺伝子発現を解析したところ、歯根膜細胞においては A2a および A2b アデノシンレセプターの発現が上昇する傾向を示した(図 4)。

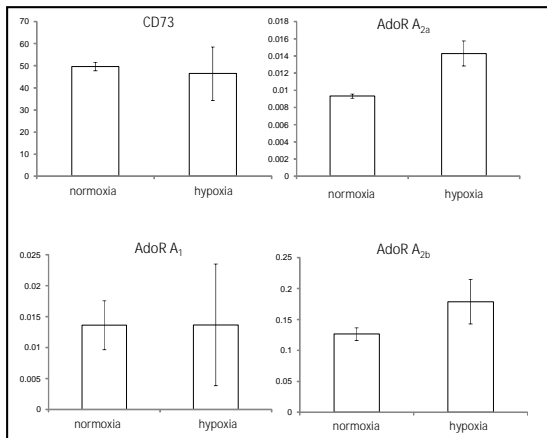


図4 ヒト歯根膜細胞を低酸素環境にて培養した際の CD73 およびアデノシンレセプターの遺伝子発現（縦軸は HPRT との比 AdoR A3 は検出されず）

一方で、歯肉線維芽細胞においては、A1 アデノシンレセプターの発現が低酸素で低下し、HIF-1 α 阻害剤存在下では、その低下が一部抑制された。同様の結果は deferoxamine 刺激によっても確認された（図5）

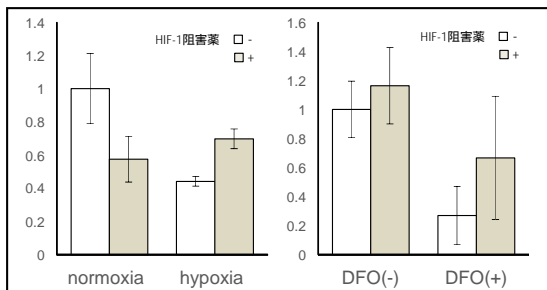


図5 ヒト歯肉線維芽細胞を低酸素環境あるいは deferoxamine(DFO)存在下にて培養した際のアデノシン A1 レセプター遺伝子発現（無刺激を1とした割合にて示す）

また A2b アデノシンレセプターの発現は低酸素および deferoxamine 刺激によって上昇し、同上昇は HIF-1 α 阻害剤存在下では抑制された（図6）

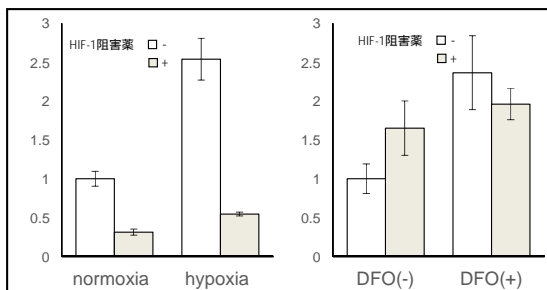


図6 ヒト歯肉線維芽細胞を低酸素環境あるいは deferoxamine(DFO)存在下にて培養した際のアデノシン A2b レセプター遺伝子発現（無刺激を1とした割合にて示す）

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）

〔学会発表〕(計 2 件)

山本智美、竹立匡秀、沢田啓吾、山羽聡子、森本千晶、山田聡、村上伸也：歯根膜細胞における低酸素誘導因子による PLAP-1 発現制御、第 141 回秋季歯科保存学会、2014 年 10 月 31 日、山形県山形市

森本千晶、竹立匡秀、山本智美、沢田啓吾、中村友美、山下元三、村上伸也：低酸素状態が歯肉線維芽細胞におけるコラーゲン産生に及ぼす影響、第 57 回秋季日本歯周病学会、2014 年 10 月 19 日、兵庫県神戸市

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹立 匡秀 (TAKEDACHI MASAhide)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60452447