

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462868

研究課題名(和文)細胞外カルシウムとPGE2受容体活性化による歯髄細胞のBMP-2発現増強の検討

研究課題名(英文) Extracellular calcium increases gene expression of fibroblast growth factor-2 via a PKA and ERK1/2 pathway in mouse dental papilla cells.

研究代表者

金谷 聡介 (Kanaya, Sousuke)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80375097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：象牙芽細胞の前駆細胞である不死化マウス歯乳頭(mDP)細胞の細胞外Ca<sup>2+</sup>によるFgf-2遺伝子の発現増強機構について解析した。PKA阻害剤で前処理すると細胞外Ca<sup>2+</sup>によるFgf-2遺伝子の発現増強は抑制された。さらに、細胞外Ca<sup>2+</sup>刺激はMAPキナーゼp38およびERK1/2のリン酸化を誘導した。そこでp38およびERK1/2阻害剤で細胞を前処理したところ、ERK1/2阻害剤で前処理した場合のみ細胞外Ca<sup>2+</sup>によるFgf-2遺伝子の発現増強は抑制された。以上のことから、細胞外Ca<sup>2+</sup>はPKAおよびMAPキナーゼERK1/2を介してmDP細胞のFgf-2遺伝子発現を増強することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that elevated extracellular Ca<sup>2+</sup> increased bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) expression in human dental pulp (hDP) cells. In the present study, we examined the effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> on FGF-2 gene expression in immortalized mouse dental papilla cells (mDP). Extracellular Ca<sup>2+</sup> increased FGF-2 gene expression in mDP. Gene expression of calcium-sensing receptor and G protein-coupled receptor family C group 6 member A, both of which are known to be sensors for extracellular Ca<sup>2+</sup>, was not detected in mDP. Ca<sup>2+</sup>-mediated Fgf-2 gene expression was reduced by pretreatment with H-89, a protein kinase A (PKA) inhibitor, or PD98059, an ERK1/2 inhibitor, but not by pretreatment with GF-109203X, a PKC inhibitor, or SB203580, a p38 inhibitor. These findings indicate that elevated extracellular Ca<sup>2+</sup> increased Fgf-2 gene expression through PKA and ERK1/2 in mDP cells, and that this mechanism may assist in designing regenerative therapies for dentin.

研究分野：歯内治療系歯学

キーワード：歯乳頭細胞 細胞外Ca<sup>2+</sup> FGF-2

### 1. 研究開始当初の背景

露出歯髄に対する歯髄保存療法として、水酸化カルシウムを用いた直接覆髄法が行われている。本薬剤は高アルカリによる象牙芽細胞の壊死とそれに引き続く壊死層直下への未分化歯髄細胞の遊走を誘導することにより修復象牙質の形成を促進することが分かっている。しかし、その薬理作用の機序は明らかではない。また、本術式の5年後成功率は報告者により異なり(37%~92%)、安定した治療法とはいえない。

最近、骨形成タンパク質(BMP)-2が象牙質形成に重要であることが明らかにされている。歯髄中に存在する歯髄幹細胞は、BMP-2刺激により象牙芽細胞へと分化誘導され、さらに象牙芽細胞の分化マーカーである象牙質シアロリタンパク質(DSPP)発現が増強されることによって象牙質を形成することが報告されている。(中島 Cytokine Growth Factor Rev 2005、Chenら J Biol Chem 2008)。また、動物実験における露出歯髄への局所投与は、象牙質の形成を強く誘導する(中島ら J Dent Res 1994、庵原ら J Dent Res 2004)ことから、BMP-2の臨床応用に期待が高まっている。しかしながら、本タンパク質は半減期も短く多量の投与が必要なことからまだ実用化には至っていない。

### 2. 研究の目的

露出した歯髄の創傷治癒を促すためには、象牙芽細胞による修復象牙質の形成を誘導することが重要である。骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein; BMP)-2は象牙芽細胞の分化および石灰化を促進し、象牙質の形成を強く誘導する。申請者らはこれまで細胞外Ca<sup>2+</sup>は歯髄細胞のBMP-2発現を誘導することを報告してきた。本研究では、プロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)受容体シグナルがこの反応を増幅する可能性について解析を行い、歯髄細胞における細胞外Ca<sup>2+</sup>によるBMP-2産生およびPGE<sub>2</sub>受容体活性化によるBMP-2産生増強を軸とした新規歯内治療法の開発に繋げることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、PGE<sub>2</sub>受容体活性化が細胞外Ca<sup>2+</sup>刺激による歯髄由来細胞のBMP-2発現誘導を相乗的に増強し、象牙質形成を促進する可能性について検討する。すなわち、研究期間内にヒト歯髄細胞培養系を用いて以下の項目について検討を行う。

### 4. 研究成果

これまでに、ヒト歯髄細胞を高濃度細胞外Ca<sup>2+</sup>で刺激を行うことにより bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) の発現

が増強されることを報告した。しかしながら、歯髄細胞において細胞外Ca<sup>2+</sup>が fibroblast growth factor-2 (FGF-2) などの他の成長因子の発現に影響を与えるかについては知られていない。

本研究では、ヒト歯髄細胞、象牙芽細胞の前駆細胞である不死化マウス歯乳頭(mDP)細胞、並びに種々の間葉系幹細胞であるマウス歯小嚢細胞(SVF4)およびマウス胚由来細胞(C3H10T1/2)において細胞外Ca<sup>2+</sup>がFGF-2の発現に与える影響について解析を行ったところ、細胞外Ca<sup>2+</sup>はヒト歯髄細胞およびmDP細胞さらにはSVF4およびC3H10T1/2のFGF-2遺伝子の発現を増強することを見出した。また、我々のこれまでのヒト歯髄細胞での報告と同様、mDP細胞においても細胞外Ca<sup>2+</sup>はBmp-2遺伝子の発現を増強した。対照的にSVF4やC3H10T1/2においては細胞外Ca<sup>2+</sup>はBmp-2遺伝子の発現を抑制した。(図1)

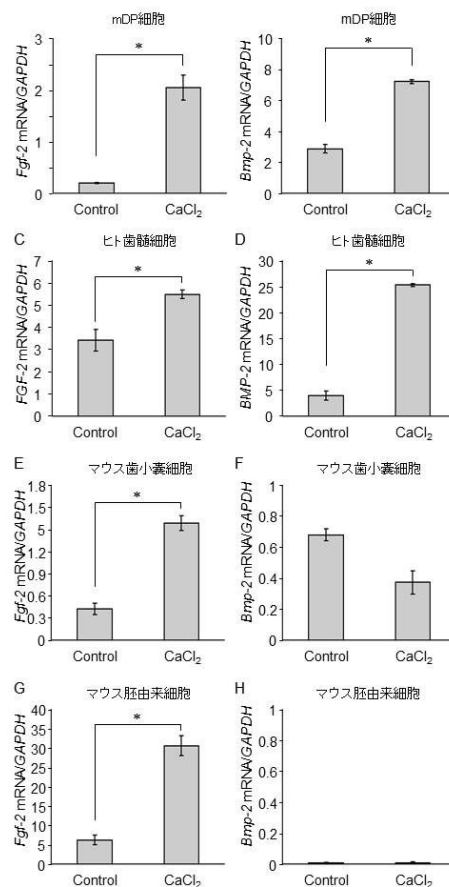


図1. 間葉系幹細胞における細胞外Ca<sup>2+</sup>によるFGF-2およびBMP-2遺伝子の発現増強

そこで、mDP細胞に着目し、細胞外Ca<sup>2+</sup>によるFgf-2遺伝子の発現増強機構について解析した。Ca<sup>2+</sup>などの2価の陽イオンを感知することが知られている Calcium sensing receptor (CaSR) や G protein-coupled receptor family C group 6 member A (GPCRC6A) がmDP細胞に発現しているかについて解析したところ、いずれの遺伝子の発現もみられなかった。さらに、Ca<sup>2+</sup>以外の2価の陽イオンとしてMgCl<sub>2</sub>を用いてmDP細胞を刺激した場合はFgf-2遺伝子の発現増

強はみられなかった。このことから、mDP細胞には CaSR および GPRC6A とは異なる受容体を介した、Ca<sup>2+</sup>に選択的な感知機構が存在し、そのシグナリングにより *Fgf-2* 遺伝子の発現が増強されることが示唆された。

次に、細胞外 Ca<sup>2+</sup>による *Fgf-2* 遺伝子の発現増強に関わるシグナル伝達機構について解析を行った。プロテインキナーゼ C(PKC) 阻害剤 (GF109203X) および PKA 阻害剤 (H-89) で細胞を前処理したところ、H-89 で前処理した場合のみ細胞外 Ca<sup>2+</sup>による *Fgf-2* 遺伝子の発現増強は抑制された。(図2)

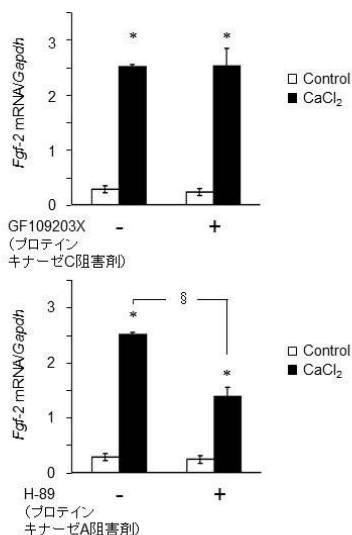


図2. プロテインキナーゼA阻害剤H-89によるFGF-2遺伝子の発現増強の抑制

さらに、細胞外 Ca<sup>2+</sup> 刺激は p38 mitogen-activated protein (MAP) キナーゼおよび extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2)のリン酸化を誘導した。そこでMAP キナーゼ阻害剤(p38 MAP キナーゼ (SB203580) ERK1/2 (PD98059) で

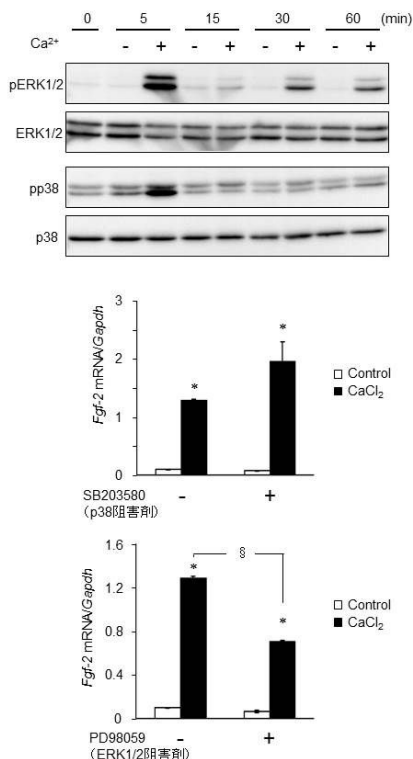


図3. mDP細胞における細胞外Ca<sup>2+</sup>によるMAPキナーゼp38およびERK1/2リン酸化誘導 ERK1/2阻害剤PD98059によるFGF-2遺伝子の発現増強の抑制

細胞を前処理したところ、PD98059 で前処理した場合のみ細胞外 Ca<sup>2+</sup>による *Fgf-2* 遺伝子の発現増強は抑制された。(図3)

以上のことから、細胞外 Ca<sup>2+</sup>は PKA および MAP キナーゼ ERK1/2 を介して mDP 細胞の *Fgf-2* 遺伝子発現を増強す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 3件)

1. Kanaya S, Komatsu H, Shimauchi H, Nemoto E. Metabotropic glutamate receptor 1 promotes cementoblast proliferation via MAP kinase signaling pathways. *Connect Tissue Res.* (査読有) 57:417-426.2016  
doi: 10.1080/03008207.2016.1195826.

2. Sakisaka Y, Kanaya S, Nakamura T, Tamura M, Shimauchi H, Nemoto E. p38 MAP kinase is required for Wnt3a-mediated osterix expression independently of Wnt-LRP5/6-GSK3β signaling axis in dental follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 478(2):527-532.2016  
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.076.

3. Nemoto E, Sakisaka Y, Tsuchiya M, Tamura M, Nakamura T, Kanaya S, Shimonishi M, Shimauchi H. Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. *J Periodontal Res.* (査読有) 51(2):164-174.2016  
doi: 10.1111/jre.12294.

(学会発表)(計 1件)

1. 肖ヒンロ、金谷聡介、向阪幸彦、須藤瑞樹、齋藤正寛、根本英二 「高濃度細胞外カルシウム刺激に対する間葉系未分化細胞の反応性の解析～fibroblast growth factor 2 および bone morphogenetic protein 2 の発現誘導～」第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会 2016 年 10 月 7 日 新潟

(図書)(計 0件)

(産業財産権)

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等（計 0 件）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

金谷 聡介 (KANAYA, Sousuke)  
東北大学大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：80375097

### (2)研究分担者

根本 英二 (NEMOTO, Eiji)  
東北大学大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：40292221

島内 英俊 (SHIMAUCHI, Hidetoshi)  
東北大学大学院歯学研究科・名誉教授  
研究者番号：70187425