

〔原著〕

リゾホスファチジン酸は歯根膜での細胞情報伝達や歯牙発生シグナルに関与する

荒川 俊哉¹⁾, 小原 伸子²⁾, 岡山 三紀³⁾, ナタカーン ホシリラック^{1), 3)}, 溝口 到³⁾, 入江 一元²⁾, 田隈 泰信¹⁾

1) 北海道医療大学歯学部口腔生物学系生化学分野

2) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系組織学分野

3) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系矯正学分野

Lysophosphatidic acid is involved in a cellular signaling of periodontal ligament and tooth development

¹⁾Toshiya ARAKAWA, ²⁾Nobuko OBARA, ³⁾Miki OKAYAMA, ^{1), 3)}Nattakarn HOSIRILUCK,
³⁾Itaru MIZOGUCHI, ²⁾Kazuharu IRIE, ¹⁾Taishin TAKUMA

1) Division of Biochemistry, Department of Oral Biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

2) Division of Histology, Department of Oral Growth and Development,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan3) Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan**Key words** : lysophosphatidic acid (LPA), periodontal ligament (PDL), tooth development

Abstract

Lysophosphatidic acid (LPA) is a chemical mediator synthesized from phospholipid, that induces cell growth, vascular development, and hair follicle development through six subtypes of G protein-coupled receptors, LPA₁₋₆. However, little is known about the function of LPA signaling in oral tissue. We analyzed the expression of LPA receptors, synthetic enzymes of LPA and the intracellular signaling by LPA in human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs). The results showed a strong expression of LPA₁, LPA₆, and lyso-PLD in hPDLFs. There was LPA induced phosphoryla-

tion of ERK1/2 in the hPDLFs. We also analyzed the expression of LPA receptors in mouse tooth germs at the cap and bell stages by RT-PCR, and found that all LPA receptors were expressed during tooth development. Further, we also analyzed LPA₁ in mouse tooth germs using *in situ* hybridization and determined LPA₁ expression in the dental mesenchyme at the initial stage and in both the mesenchyme and epithelium from the bud to the bell stages. These results suggest that LPA signaling would play an important role in tooth development and oral functions.

和文抄録

リゾホスファチジン酸はリン脂質から合成される脂質メディエーターの一つで、LPA₁からLPA₆の6種類のサブタイプを有するGタンパク質共役型受容体を介して、細胞増殖、血管形成、体毛形成などの様々な機能を誘導する。しかしながら、口腔組織でのLPAシグナルの働きについては十分に理解されていない。そこで我々は、ヒト歯根膜線維芽細胞におけるLPA受容体とLPA合成酵素

の発現および細胞内シグナル伝達について、またマウス歯胚におけるLPA受容体の発現とその分布について解析を行なった。その結果、ヒト歯根膜線維芽細胞ではLPA₁とLPA₆の2つの受容体の強い発現とLPA合成酵素lyso-PLDの発現が確認された。また、LPA刺激によりERK1/2のリン酸化が誘導されることが明らかになった。マウス歯胚においては、胎生14.5日齢でLPA₅を除く全てのLPA受容体の発現が確認され、胎生18日齢で全てのLPA受容体の発現が確認された。更に歯胚組織での

LPA₁受容体の発現分布では、*in situ* hybridization法により、胎生12日齢で歯蕾を形成しつつある上皮と接する間葉に強い発現が認められ、この発現が胎生18日齢の鐘状期歯胚の咬頭頂付近では、上皮のエナメル芽細胞分布部位にも観察された。以上より、LPAシグナルは口腔組織において、歯牙の発生から歯根膜の細胞シグナル伝達まで広く制御に関わっていることが示唆された。

緒 論

リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid, LPA) は、リン脂質から合成されるシグナル分子で、主に、ホスファチジルコリン (PC) からホスホリパーゼA₂ (PLA₂) によって1つの脂肪酸が切り出された残りのリゾPCから、リゾPLD (lyso-PLD, Autotaxin, ENPP 2) によって合成される (Aikawa *et al.*, 2015)。LPAはこれまでその存在は知られていたものの、アラキドン酸代謝物のプロスタグランジン類に比較して、その役割が十分に明らかになっていなかった。しかし、近年の研究の進展により、細胞増殖、血管形成、抗アポトーシス、細胞遊走、神経細胞の突起退縮など、様々な役割を担っていることが明らかになってきた (Kihara *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2001; van Meeteren *et al.*, 2006; Fotopoulou *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2006; Teo *et al.*, 2009)。

LPAはGタンパク質共役型の受容体を介して作用し、現在までLPA₁からLPA₆までの6つのサブタイプが同定されている (Kihara *et al.*, 2015)。LPA受容体は、その大部分が内皮分化遺伝子 (endothelial differentiation gene, EDG) やATPをリガンドとするP2Yプリン受容体と共通であることが明らかになり、LPAだけでなく違った種類のリガンドにより機能選択されていることも示唆されている (Aikawa *et al.*, 2015)。これまでそれぞれの受容体の機能には、LPA₁ (EDG 2) が脳神経の発達や血管形成 (Harrison *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2005)、LPA₂ (EDG 4) が肺の炎症や繊維化 (Huang *et al.*, 2013)、LPA₃ (EDG 7) が受精卵の着床と着床間隔 (Ye *et al.*, 2005)、LPA₄ (P2Y 9) が胎生期の血管やリンパ管の形成や細胞の遊走 (Sumida *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008)、LPA₅ (GPR92) が疼痛反応 (Callaerts-Vegh *et al.*, 2012)、LPA₆ (P2Y 5) が体毛形成 (Pasternack *et al.*, 2008; Shimomura *et al.*, 2008) に関与していることが報告され、受容体のバリエーションにより様々な機能と関係していることが明らかになった。歯の発生は上皮と間葉の接触が必要な点で体毛の発生と共通しているため、これらの受容体サブタイプの中で、LPA₆ (P2Y 5) の関与の可能性が示唆される。Pasternackらおよび

Shimomuraらの2つのグループは、それぞれ毛髪に変異のある家系で、LPA₆ (P2Y 5) の塩基配列に変異があることを見出し、点変異で無毛症に、挿入・欠失でワール毛になることを報告した (Pasternack *et al.*, 2008; Shimomura *et al.*, 2008)。またLPAの合成酵素の一つであるホスファチジン酸特異的PLA₁α (PA-PLA₁α) (LIPH) の変異でも貧毛症を引き起こし、LPAシグナルが体毛形成で重要な働きをしていることが明らかになっている (Kazantseva *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2011)。しかしながら、これらの報告では、発生で毛と類似している歯に明確な変異や欠失などがあることを示しておらず、PLA₆ (P2Y 5) やLPA合成の変異による口腔組織への影響は不明なままである。

口腔領域においても、これまでLPAシグナルに関する研究がいくつか報告されている。Georgeらは、LPAがヒト歯根膜線維芽細胞でLPA₁₋₃を介してERK 1/2のリン酸化を誘導し、同様にヒト歯肉線維芽細胞でLPA₁を介することを報告している (George *et al.*, 2009)。ERK 1/2はMAPキナーゼファミリーの一つで、p38 MAPK、c-Jun N-terminal kinaseと並び、細胞増殖を始め、多くの細胞で様々な機能を制御している細胞内シグナル分子であり、LPAシグナルにおける中心的な役割を担っていると思われる。またCerutisらは、ヒト歯根膜線維芽細胞の損傷治癒実験においてLPAがplatelet derived growth factorの作用を増強させること (Cerutis *et al.*, 2004, 2007)、LPA18:1がヒト歯肉線維芽細胞において炎症に関与する多くの新しい遺伝子や既知の遺伝子を制御していること (Cerutis *et al.*, 2015) を報告している。口腔上皮細胞においては、Thorlaksonらが細胞遊走を促進することを報告している (Thorlakson *et al.*, 2016)。さらに我々は、ヒト歯根膜線維芽細胞に重力によりメカニカルストレスを負荷し、ATPがメカニカルストレスのメディエーターとして誘導され、P2Y受容体を介してERK 1/2のリン酸化を惹起していることを報告した (Ito *et al.*, 2014)。これは、LPAの受容体としても同定されている、LPA₄ (P2Y 9) およびLPA₆ (P2Y 5) の関与を示唆するものである。

しかしながら、このようにいくつかの報告があるものの、口腔組織でのシグナル伝達に関するLPAの役割については依然十分明らかになっていない。特に、歯牙の発生過程では、その可能性の報告すら見られない。そこで本研究では、口腔でのLPAの役割を明らかにするために、ヒト歯根膜線維芽細胞での細胞情報伝達とマウスの歯牙発生でのLPA受容体を中心としたLPAシグナルの関与について検討したので報告する。

材料および方法

1) 材料

ヒト歯根膜線維芽細胞は、矯正治療のための抜歯より初代培養細胞 (primary cultured cells) として採取した (北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会内規第8条に基づき, 「ヒト歯根膜細胞を用いた歯根吸収関連遺伝子の研究」として申請・承認され (承認番号13), 歯根膜の使用はインフォームドコンセントを元に本人から承諾済み). ウシ血清 (CS) はギブコ社より購入した. Alpha modification of Eagle's medium (α -MEM), suramin, ATP, ペニシリンG, ストレプトマイシンはシグマ社 (St Louis, MO, USA) より購入した. 1-oleoyl-リゾホスファチジン酸 (LPA) はケイマン・ケミカル社 (Ann Arbor, MI, USA) より購入した. Immobilon-P転写膜 (PVDF膜) およびImmobilon-HRPウエスタン化学発光試薬はミリポア社 (Bedford, MA, USA) から購入した. DIG Labelling mix (NO 11277073910) はロッシュ・ダイアグノスティックス社 (Basel, Switzerland) より, ブロックエースは雪印乳業 (東京, 日本) より, タンパク質定量試薬XL-Bradford [SDS-PAGE適応] はアプロサイエンス社 (徳島, 日本) より, 10%ポリアクリドアミドゲル (PAGE) はATTO社 (東京, 日本) より購入した. 抗p-ERK抗体 (E-4, マウスモノクローナル抗体) および抗ERK抗体 (K-23, ラビットポリクローナル抗体) はサンタクルズ社 (Santa Cruz, CA, USA) より購入した. HRP-2次抗体 (抗マウスまたは抗ラビットIgG), ProbeQuant G50 Micro ColumnsはGEヘルスケア社 (Hemel Hemstead, England) より購入した. その他の試薬は一般試薬を使用した.

2) 細胞培養, 細胞への薬剤刺激および重力負荷

歯根膜線維芽細胞の培養は, α -MEM (10% CS, ペニシリン (1 mg/mL), ストレプトマイシン (1 mg/mL), グルタミン (200 mM) 含有) を用いて, 5% CO₂ 存在下, 37°CでHERACELL CO₂細胞培養装置 (サーモ・サイエンティフィク社) にて行った. ERKのリン酸化実験における細胞への薬剤刺激は, ATP (10 μ M) で5分間およびLPA (10 ng/mL, 22.9 nM) で5分間行った. 細胞への重力負荷は, 以前の報告 (Ito *et al.*, 2014) に従って行った. Suramin添加は100 μ Mで刺激時の15分前に加えた.

3) RNA抽出, ゲノムDNAの抽出, 逆転写反応, Po-

lymerase chain reaction (PCR)

ヒト歯根膜線維芽細胞およびマウス歯胚からのtotal RNAの抽出は, Tryzol試薬を用いて, メーカー指定のプロトコールに従って抽出した. ゲノムDNAの抽出はキアゲン社のGenomic DNA purification kitを用いて, メーカー指定のプロトコールに従って抽出した. 逆転写反応はギブコ社のSuperscript IIを用いて, 1 μ gのtotal RNAからメーカー指定のプロトコールに従って合成した. PCR反応は, それぞれの特異的プライマーとタカラバイオ社のExTaq polymeraseを用いて, 94°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 30秒の熱サイクルを35サイクル (ただし, GAPDHの場合は25サイクル) で, メーカー指定のプロトコールに従って行った. 使用した特異的プライマーは以下の表1から3に示す (hはヒト, mはマウス, Fはforward primer, Rはreverse primerを表す). PCR法にて

表1: ヒトLPA受容体検出用PCRプライマーデザイン

遺伝子名/番号	プライマー配列	位置
hLPA ₁	F: 5'-ctgaagactgtggtcattgtgc-3'	1117-1138
[NM_001401.3]	R: 5'-aaccacagagtgtggtcattgtgc-3'	1440-1419
hLPA ₂	F: 5'-gtcaagactgtgtgtcatcctcct-3'	857-879
[NM_004720.5]	R: 5'-ggaagcatgatgcgagtgcg-3'	1158-1140
hLPA ₃	F: 5'-gattgtttttgtgtgtggac-3'	309-329
[NM_012152.2]	R: 5'-tggtcaggtgtgtgtgac-3'	640-621
hLPA ₄	F: 5'-caccatctagctgtctctgatt-3'	854-876
[NM_001278000.1]	R: 5'-gcattgtgtacattagtgtgga-3'	1171-1148
hLPA ₅	F: 5'-ctctctacgcactgcaccact-3'	684-700
[NM_020400.5]	R: 5'-gaagctctcgaagcatagggcgca-3'	978-956
hLPA ₆	F: 5'-agaattgtgagaagcgacctc-3'	929-950
[NM_005767.5]	R: 5'-tctgtgaccagaatgaaccac-3'	1286-1265

表2: ヒトLPA合成酵素検出用PCRプライマーデザイン

遺伝子名/番号	プライマー配列	位置
hPLA ₁	F: 5'-ccatgtcttgaaggaattt-3'	493-512
[NM_139248.2]	R: 5'-acagacctgtgtgtgcaca-3'	866-846
hLyso-PLD(ENPP2)	F: 5'-ggacccatggaagttgaaat-3'	1819-1838
[NM_006209.4]	R: 5'-ggaatccgtagacactctgc-3'	2283-2264
hPS-PLA ₁	F: 5'-gacgtctgtggtgattgctt-3'	938-957
[NM_015900.3]	R: 5'-tggtttatctgcatgtgtg-3'	1253-1234

表3: マウスLPA受容体検出用PCRプライマーデザイン

遺伝子名/番号	プライマー配列	位置
mLPA ₁	F: 5'-ctgaagactgtggtcattgtgc-3'	955-976
[NM_010336.2]	R: 5'-aaccacagagtgtggtcattgtgc-3'	1278-1257
mLPA ₂	F: 5'-gtgaagacgtgtgtcatcattct-3'	868-887
[NM_020028.3]	R: 5'-gaagctgtatccgcgtgct-3'	1165-1147
mLPA ₃	F: 5'-acaaagctgtgtatctctgt-3'	290-311
[NM_022983.4]	R: 5'-tcattgtgacattagtgtgga-3'	605-583
mLPA ₄	F: 5'-aacctggccctctctgattt-3'	787-806
[NM_175271.4]	R: 5'-gcattgtgtgacattagtgtgga-3'	1100-1078
mLPA ₅	F: 5'-cagactaattctcttccacct-3'	310-332
[NM_001163268.1]	R: 5'-ccgtacatgttcatctggaagt-3'	671-649
mLPA ₆	F: 5'-gtcatcttctgtttgtgtgccc-3'	1416-1441
[NM_175116.4]	R: 5'-tcattcttcttaaccgaccattttt-3'	1648-1622
mGAPDH	F: 5'-ctacccccatgtgtccgtctgt-3'	793-815
[NM_001289726.1]	R: 5'-gatggaaattgtgaggagatgc-3'	1192-1170

DNAを増幅後、1.5%のアガロースゲルにて電気泳動後、ATTO社ライトキャプチャーIIにより、ゲルの泳動を撮影した。

4) p-ERKとERKのウエスタン解析

細胞のタンパク質は2xサンプルバッファー (2% SDS, 100 mM Tris-HCl, 20% Glycerol, 1.7Mβ-mercaptoethanol, BPB) にて抽出し、沸騰水にて熱変性後 (5分), XL-Bradfordタンパク質定量試薬を用いてタンパク質を定量した。10 μgのタンパク質を10% SDS-PAGEにて電気泳動後、ブロッティング装置Trans-Blot Turbo (BIO-RAD) にてPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜をブロックエースでブロッキング後、1次抗体 (抗p-ERK抗体または、抗ERK抗体)、2次抗体および化学発光検出試薬を用いて、定法に従ってウエスタン解析を行った。化学発光検出試薬により同定されたバンドは、ATTO社ライトキャプチャーIIにより検出した。

5) *in situ* hybridization法

マウス歯胚を含む組織を4%パラフォルムアルデヒドで4℃で一晩固定後、20%スクロースを含むPBSに6時間浸漬し、Tissue-Tek O.C.T. Compound (サクラフインテック, Tokyo, Japan) に包埋し、Cryon Spray Freezer (応研商事, Tokyo) を用いて凍結した。クリオスタットを用いて作成した厚さ10ミクロンの凍結切片をシランコートしたスライドガラスに貼り付け *in situ* hybridizationに用いた。切片は無水エタノールと0.2N塩酸による前処理後、プロテインースK処理と4%パラフォルムアルデヒドによる再固定を行い、洗浄、風乾して、ジゴキシゲニン (DIG) でラベルしたRNAプローブ (500 ng/ml) を含むハイブダイゼーションバッファー (50% formamide, 5 × SSC, 10 mM EDTA, 5% dextran sulphate, 1 × Denhardt's solution, 250 μg/ml yeast tRNA, 500 μg/ml fish sperm DNA (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and 0.02% SDS) を用いて65℃で14時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、0.2 × SSCによる洗浄 (65℃ 30分) を3回行い、室温にてPBSによる洗浄、20%Block Aceを含むPBSによるブロッキングを行った後、1:500で希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗DIG抗体と4℃で一晩反応させ、NBT/BCIPによる発色を行った。LPA₁のcDNAはpT7/T3α-18プラスミドに繋ぎこみ、リニアライズしたプラスミドを鋳型として、ロッシュ社DIG Labelling mix (NO 11277073910) 存在下でT7 RNA polymeraseまたはT3 RNA polymeraseを用いてセンスおよびアンチセンスプ

ローブの合成を行った。

結 果

歯根膜線維芽細胞におけるLPA受容体とLPA合成酵素のmRNA発現の検討

LPAの受容体のmRNA発現を検討するために、LPA₁₋₆のそれぞれに特異的なプライマーを用いて、RT-PCR法によりmRNAでの発現を検討した。その結果図1Aに示すように、LPA₁とLPA₆の強い発現が認められ、LPA₃とLPA₄に僅かな発現が認められた。LPA₂とLPA₅の発現は認められなかった。またゲノムDNAを鋳型にしたPCRで特異的発現が確認され (図1C), RT (-) ではバンドが認められなかった (図1B) ことから、これらの増幅された発現は特異的であることが確認された。次に、LPA合成に関しての検討を行った。LPAの合成経路にはlyso-PLDの他、ホスファチジン酸 (PA) からPA-PLA₁αによって合成される経路もあるため、2つの合成酵素、lyso-PLDとPA-PLA₁αの発現検討をRT-PCR法にて行った。その結果、図2に示すように、lyso-PLDの強い発現が認められたが、PA-PLA₁αは認められなかった。

ヒト歯根膜線維芽細胞における細胞内シグナルの検討

緒論に記載したように、歯根膜線維芽細胞への重力負荷ではATPの誘導によって、ERK 1/2がリン酸化される (Ito *et al.*, 2014)。その結果をコントロールとして、ATP添加と重力負荷を検討した結果、図3に示すように以前と同様にERK 1/2のリン酸化が確認された。これらと同じタイムコースでLPAの添加によりERK 1/2のリン酸化を検討した結果、ATP添加と重力負荷とほぼ同様なリン酸化結果が得られた。さらにGタンパク質共役型受容体の阻害剤であるSuraminを添加し、ATP添加、重力負荷、LPA添加を行った結果、いずれの場合も同様にリン酸化は消失したことから、これらのリン酸化反応は全てGタンパク質共役型受容体を介したもので、ATPとLPAは共にシグナル分子 (アゴニスト) として歯根膜線維芽細胞で機能していることが明らかになった。

マウス胎児歯牙におけるLPA受容体の発現検討

マウスの胎生14.5日齢と胎生18日齢の歯胚からRNAを抽出し、RT-PCRによりLPA受容体の発現の検討を行った。その結果図4Aに示すように、胎生14.5日齢では、LPA₅を除く全ての受容体の発現が認められ、特にLPA₄の発現が強く認められた。次に図4Bに示すように、胎生18日齢では全ての受容体の発現が認められた。胎生14.5日齢と胎生18日齢での発現を比較すると、胎生

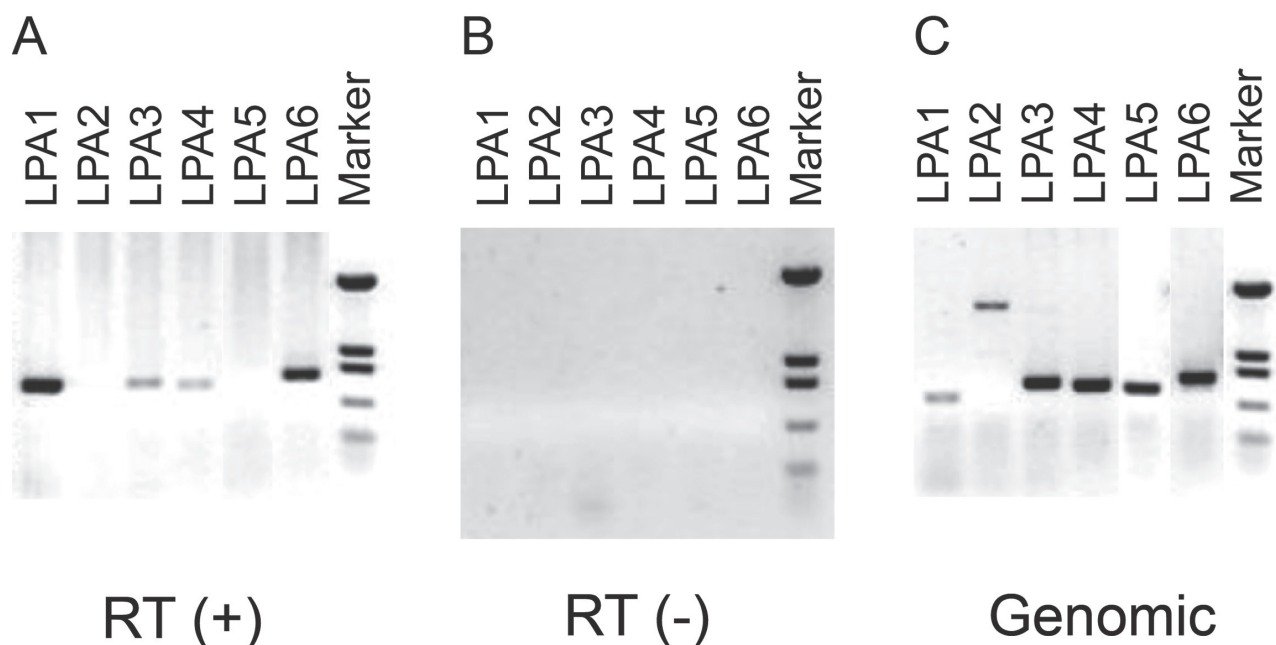
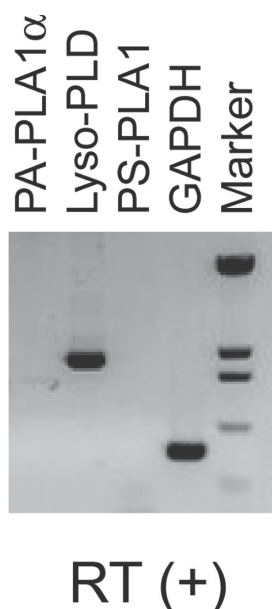


図1 ヒト歯根膜線維芽細胞におけるLPA受容体発現検討

LPA受容体の6つのサブタイプ, LPA₁~LPA₆のPCRによる解析を行った。(A) ヒト歯根膜線維芽細胞から抽出した1 µgのtotal RNAを使用したRT (RT (+))をPCRの鋳型とした。(B) ネガティブコントロールとして, 1 µgのtotal RNAをのみを使用し, RT酵素無しでRT反応を行い (RT (-)), PCRの鋳型とした。(C) ポジティブコントロールとして, ヒト歯根膜線維芽細胞から抽出したゲノムDNA (Genomic)を鋳型とした。ただし, LPA₁とLPA₂は, プライマー間にイントロンを挟むためgenomicでコントロールバンドを示すことができなかった (イントロンは, LPA₁のexon 4 と5の間で656,700 bp, LPA₂のexon 2 と3の間で1,973 bp)。(A) のLPA₁の特異性は制限酵素により確認済み (データ示さず)。Marker: サイズマーカーは上から順に, 1419 bp, 517 bp, 396 bp, 214 bp, 75 bp。



RT (+)

図2 ヒト歯根膜線維芽細胞におけるLPA合成酵素の発現検討

LPA合成酵素のRT-PCRによる解析を行った。鋳型にはヒト歯根膜線維芽細胞から抽出した1 µgのtotal RNAを使用したRT (RT (+))を用いた。PA-PLA1α: ホスファチジン酸特異的ホルホリパーゼA1α, Lyso-PLD: リゾホスホリパーゼD, PS-PLA1: ホスファチジルセリン特異的ホルホリパーゼA1, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Marker: サイズマーカーは図1と同様。

18日齢でLPA₁, LPA₂, LPA₆の発現が増加し, LPA₃の発現が減少し, 日齢の経過で受容体のサブタイプの発現に変化が生じることが認められた。

マウス胎児歯牙におけるLPA₁の発現部位の検討

in situ hybridization法によるLPA₁の歯胚における発現分布の検討を行った。図5Aに示すように, 胎生12日齢において, LPA₁は歯蕾を形成しつつある上皮と接する間葉に強い発現が認められた (図5A)。蕾状期以降は歯小囊とエナメル器に発現がみられ (図5B, C, E, F), 胎生18日の鐘状期歯胚では内エナメル上皮とエナメル芽細胞および象牙芽細胞にのみ発現が見られるようになった (図5H)。

考 察

LPAはリゾPCから合成されるケミカルメディエーターで, リゾPCと共に血清に存在するが, 他の体液と同様に唾液にも存在することが示されている (Bathena *et al.*, 2011)。にもかかわらず, 口腔組織でのLPAの働きについての知見は僅かで, 未だ不明な点が多い。歯根膜は歯槽骨と歯根の間にあって, クッションとしての役割を担っていると同時に, 歯槽骨と歯根のメンテナンスの役割を果たしていると考えられている。我々はこれま

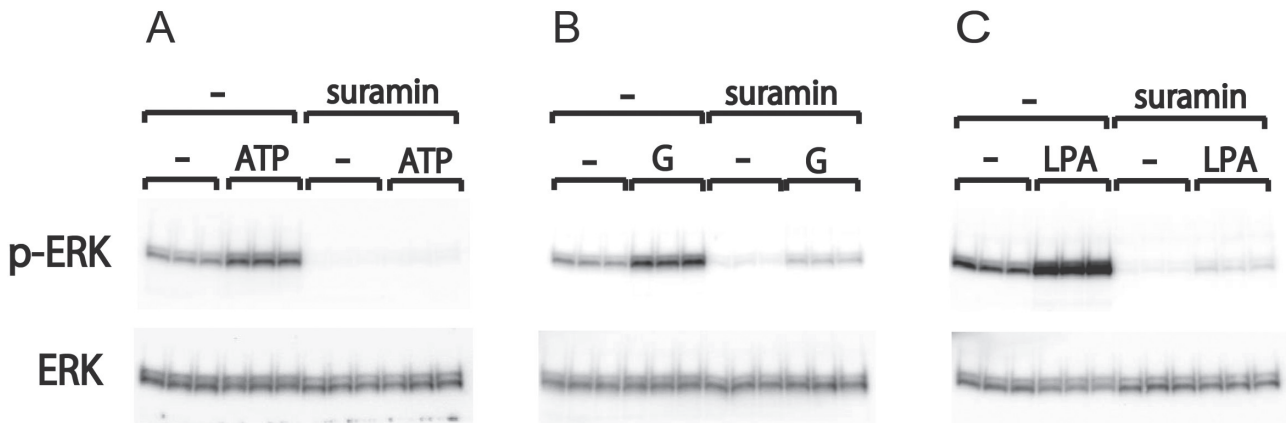


図3 ATP添加, 重力負荷, LPS添加によるERK 1/2のリン酸化解析

ウエスタン解析によりERK 1/2のリン酸化を解析した. p-ERK: リン酸化されたERK, ERK: リン酸化されていないERK. SuraminはGタンパク質共役型受容体の阻害剤をそれぞれ表す. (A) ATPの添加 (10 μ M) によるERK 1/2のリン酸化を解析. (B) 重力負荷 (25 G) によるERK 1/2のリン酸化を解析. (C) LPA添加 (10 ng/ml) によるERK 1/2のリン酸化を解析.

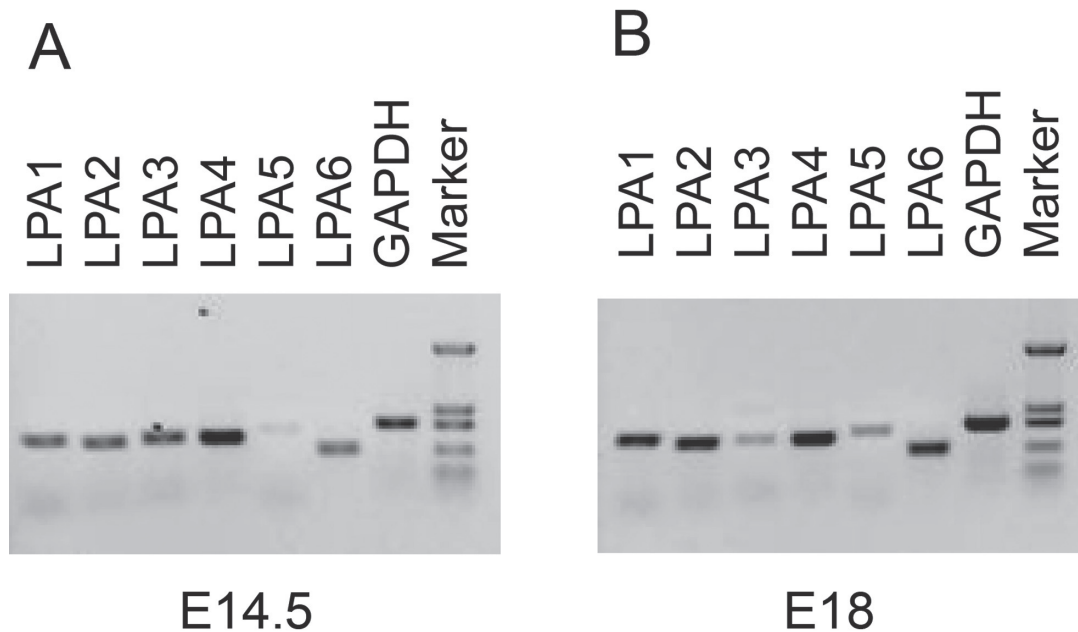


図4 マウス歯胚における, LPA受容体のRT-PCRによる解析

(A) マウス胎生14.5日齢の歯胚組織からtotal RNAを抽出し, 1 μ gのtotal RNAをRTに使用しPCR解析を行った. (B) マウス胎生18日齢の歯胚組織からtotal RNAを抽出し, 1 μ gのtotal RNAをRTに使用しPCR解析を行った. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Marker: サイズマーカーは図1と同様.

で, 歯根膜線維芽細胞にメカニカルストレスを負荷し, 細胞内シグナルの解析を行ってきた (Ito *et al.*, 2014). その結果, P2Yプリン受容体を介したATPがメカニカルストレス・シグナルとして重要な働きをしていることを示した. LPAの受容体はP2Yプリン受容体としてもLPA₄ (P2Y₉) およびLPA₆ (P2Y₅) が同定されており, ATPとLPAが同じ受容体を共有して機能していると考えられる. 実際Georgeらは, ヒト歯根膜線維芽細胞において, LPAがLPA₁₋₃を介してERK 1/2のリン酸化を誘導することを報告している. しかしLPA₁₋₃はP2Yプリン受容体としては同定されていないことから, 我々はヒ

ト歯根膜線維芽細胞において, LPA₄₋₆を含めたLPA受容体mRNA発現の検討を行った. その結果, 図1Aに示すように, LPA₁とLPA₆の強い発現が認められた. この結果は以前報告のあったLPA₁に加えて, LPA₆が歯根膜線維芽細胞で強く発現していることを示した初めての報告である. LPA₆はもともとP2Y₅プリン受容体としても同定されており, ATPとLPAの2つのリガンドによって同じシグナル経路を支配している (Yanagida *et al.*, 2009). LPA₆ (P2Y₅) は体毛の形成に重要な働きをすることが示されており (Pasternack *et al.*, 2008; Shimomura *et al.*, 2008), また体毛形成は間葉と上皮の接触

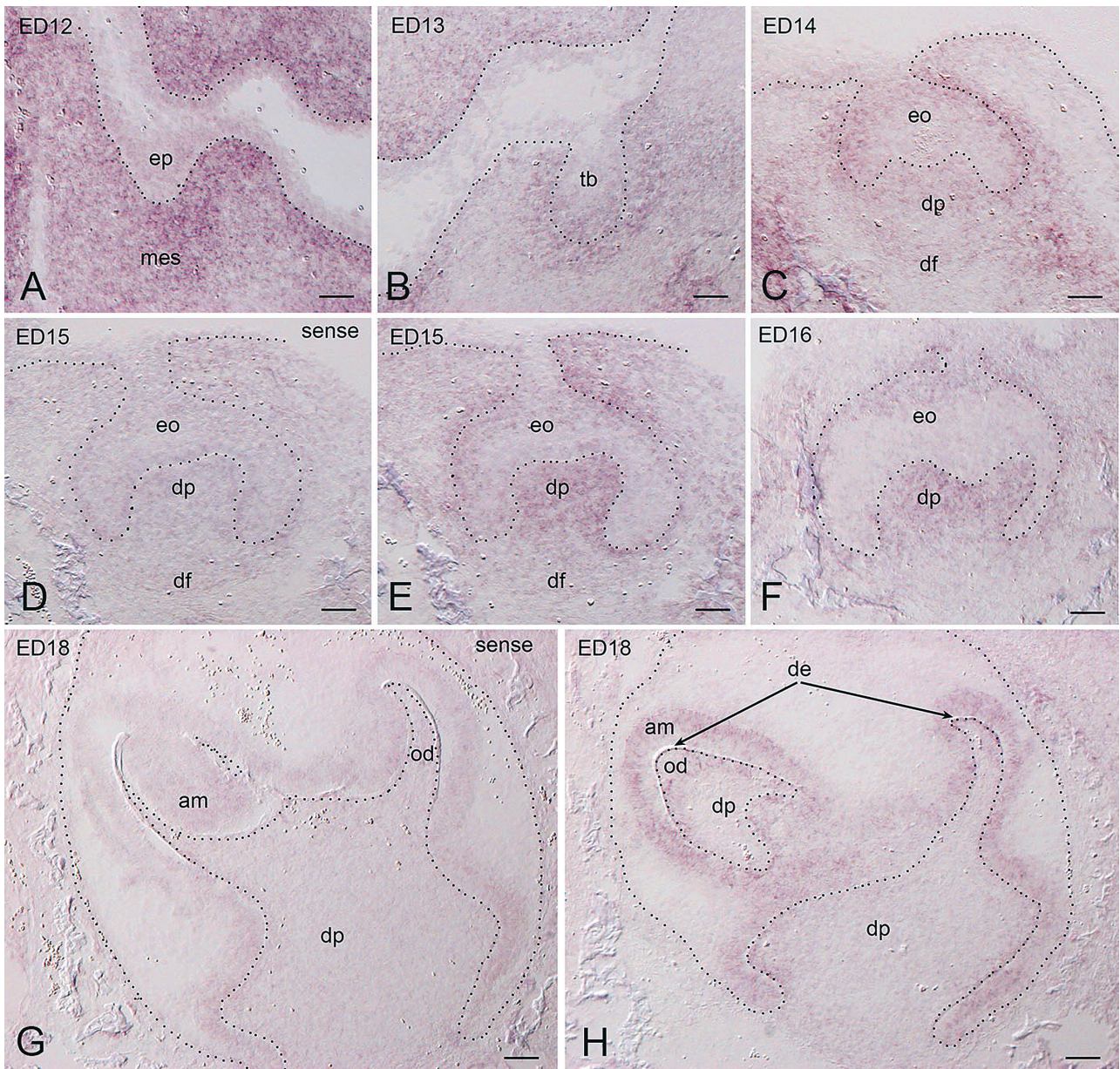


図5 マウス歯胚組織でのLPA₁の*in situ* hybridization解析

胎生12 (A), 13 (B), 14 (C), 15 (D, F), 16 (F), 18 (G, H) 日の下顎歯胚。センス (D, G) およびアンチセンスプローブ (A, B, C, E, F, H) を用いたハイブリダイゼーション。(A) 肥厚した上皮 (ep) が歯堤を形成している。LPA₁は間葉 (mes) で強く発現している。(B) 蕾状期。LPA₁の発現は上皮性の歯蕾 (tb) の先端付近と周囲の間葉にみられる。(C) 帽状期。LPA₁の発現はエナメル結節および内エナメル上皮を除くエナメル器 (eo), 歯乳頭 (dp), 歯小嚢 (df) にみられる。(E) 後期帽状期。LPA₁は歯乳頭で比較的強く発現し、エナメル器全般と歯小嚢にも発現している。(F) 初期鐘状期。エナメル器内のLPA₁の発現は歯堤側の領域以外は弱い。歯乳頭では比較的強い発現がみられ、歯小嚢でも発現している。(H) 鐘状期歯胚。咬頭頂付近では象牙質 (de) の薄層が形成され、エナメル芽細胞 (am) も分化している。LPA₁はエナメル芽細胞を含む内エナメル上皮全般と象牙芽細胞 (od) で発現している。(D, G) のセンスプローブを用いたハイブリダイゼーションではシグナルはみられない。scale bar, 100 μ m.

とシグナル交換という点で歯牙の形成と同じシステムを持っている。このような視点から、LPA₆が歯根膜線維芽細胞で発現していることは、歯根膜が歯牙・歯根の再生能力を残しているのかもしれない。また図3Cに示すように、歯根膜線維芽細胞でLPA刺激するとERK 1/2がリン酸化され、suraminの添加で、そのリン酸はほぼ消失した。SuraminはGタンパク質共役受容体の阻害剤

で (Beindl *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2005), P2受容体やドーパミンD2受容体など、多くの受容体シグナルを阻害し、またLPA受容体もGタンパク質共役型受容体である。この結果はATP刺激や重力負荷の場合と全く同じであった。図1Aに示すように歯根膜線維芽細胞では、主にLPA₁とLPA₆の2つの受容体が発現していることから、LPAの刺激はこの2つの受容体を介してERK 1/2

のリン酸化を伝達することが示された。しかし、このどちらの受容体が優位に作用するか、またどのような機能と結びついているのかなど不明な点も多く、さらなる研究が必要である。

次に我々は、LPAの合成系の検討を行った。図2に示すように、RT-PCRによって歯根膜線維芽細胞ではlyso-PLDが検出されたがPA-PLA α は検出されなかった。したがって歯根膜線維芽細胞はLPAの合成系 (lyso-PLD) と受容体系 (LPA $_1$ 及びLPA $_6$) の両方持つことが明らかになり、LPAシグナル系が歯根膜線維芽細胞内でも機能している可能性があることが示唆された。血清中には大量に基質となるリゾPCが存在する。歯根膜線維芽細胞はこれを利用してLPAを合成し、オートクライン及びパラクラインによってLPAを作用させる要素を備えていることになる。

更に我々は、歯胚でのLPAシグナルの発現について検討した。LPA合成のKey酵素である lyso-PLD (auto-taxin) の欠損マウスは、胎生8.5日~10.5日で死亡すると報告されている (van Meeteren *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006)。従ってLPAシグナルのマウス初期胚発生での必須性は明らかであり、胎生死の原因は、主に重篤な血管形成不全に起因していることが示されている (van Meeteren *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006)。また同様に神経管閉鎖不全が認められる (Tanaka *et al.*, 2006; Fotopoulou *et al.*, 2010)。それに対して、LPA受容体のそれぞれのノックアウトマウスの実験では、胎生致死はほぼ見られないことから、LPAシグナルが複数のLPA受容体で機能分担していると推定されている (青木ら, 2015)。ただし、LPA $_1$ は血管形成に関与し、そのノックアウトマウスでは、その半数が新生仔期に死亡することから (Teo *et al.*, 2009)、発生・成長期ではLPA $_1$ が最も重要な役割を担っているのかもしれない。このようにLPAシグナルがマウス胎生期において、重要な役割を果たしていることが明らかである。そこで我々は歯牙の発生におけるLPAシグナルの役割を検討するために、マウス歯胚でのLPAシグナルの可能性の検討を行った。LPA $_{1-6}$ のマウス歯胚での発現をそれぞれの特異的プライマーを用いてRT-PCRにて検討した結果、図4Aに示すように、胎生14.5日齢の帽状期ではLPA $_5$ の発現のみが見られなかったが、図4Bに示すように、胎生18日齢の鐘状期では全ての受容体の発現が確認された。このことは歯胚発生において、LPAシグナルが重要な働きをしていることを示しており、6つの受容体がそれぞれに機能分担しながら複雑な歯牙の発生を制御していることを強く示唆するものである。また、それぞれのサブタイプの

受容体が時間経過と共に発現が変化することは、歯牙形成における機能的な機能分担を示唆するもので非常に興味深い。次に我々はマウス歯胚組織を用いて、*in situ* hybridization法によりLPA $_1$ の歯胚での発現分布を検討した。図4のRT-PCRの結果では、全ての受容体に強い発現が認められ、特にLPA $_6$ は体毛と歯牙の発生の類似点から興味あるところではあるが、致死性がより重要と考え、本研究ではLPA $_1$ に焦点を絞った。その結果、図5Aに示すように、強いシグナルが胎生12日齢の歯堤形成の上皮と接する間葉 (mes) に見られた。このことはLPA $_1$ からのシグナルが、歯牙の発生の中心を担っている間葉において重要な制御シグナルとして働いていることを示唆するものである。また図5B-図5Eに示すように、LPA $_1$ の発現は次第に減弱した後、図5Hに示すように、胎生18日齢の鐘状期歯胚では内エナメル上皮とエナメル芽細胞にも発現が見られるようになった。このようなLPA $_1$ の発現部位の変化は、歯牙発生における間葉と上皮のシグナル交換の一部を担っているように見える。以上のように、歯牙の発生期におけるLPA受容体の発現と変化が明らかとなり、歯牙形成でのLPAシグナルの重要性が明らかとなった。歯牙の発生におけるLPAシグナルの関与の可能性を示した報告は本研究が初めてである。しかしながら、歯牙の発生におけるLPAシグナルの役割の解明には未だ多くの不明な点も多く、LPA $_1$ 以外の受容体の発現分布や発現時期の変化、ノックアウトマウスでの歯胚発生の検討など、更なる研究が必要である。

結 論

本研究において、ヒト歯根膜線維芽細胞で、LPAシグナルに関与するLPA合成酵素のlyso-PLDと受容体のLPA $_1$ とLPA $_6$ の遺伝子が強く発現していることが明らかになった。またマウス歯胚において、全てのサブタイプのLPA受容体遺伝子が発現していること、また*in situ* hybridization法により、LPA $_1$ が胎生12日齢において間葉 (mes) で強く発現し、その発現が次第に減弱した後、胎生18日齢では上皮 (ep) の部分 (特にエナメル芽細胞 (am) の分布部位) にも発現が見られるようになった。これらの結果から、LPAシグナルの口腔領域での重要性が明らかになった。

謝 辞

本研究は、平成22年度から平成24年度科学研究費補助金基盤研究C (課題番号22592074; 荒川俊哉) から助成を受けて行われた。

参考文献

- Aikawa S, Hashimoto T, Kano K, Aoki J. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *J Biochem* 157 : 81–89, 2015.
- 青木淳賢, 川名裕己, 木瀬亮次. 第2世代脂質メディエーター: リゾリン脂質. *実験医学* 33 : 2349–2360, 2015.
- Bathena SP, Huang J, Nunn ME, Miyamoto T, Parrish LC, Lang MS, McVane TP, Toews ML, Cerutis DR, Alnouti Y. Quantitative determination of lysophosphatidic acids (LPAs) in human saliva and gingival crevicular fluid (GCF) by LC–MS/MS. *J Pharm Biomed Ana* 110 : 402–407, 2011.
- Beindl W, Mitterauer T, Hohenegger M, Ijzerman AP, Nanoff C, Freissmuth M. Inhibition of receptor/G protein coupling by suramin analogues. *Mol Pharmacol* 50 : 415–423, 1996.
- Callaerts–Vegh Z, Leo S, Vermaercke B, Meert T, D’Hooge R. LPA5 receptor plays a role in pain sensitivity, emotional exploration and reversal learning. *Genes Brain Behav* 11 : 1009–1019, 2012.
- Cerutis DR, Dreyer A, Cordini F, McVane TP, Mattson JS, Parrish LC, Romito L, Huebner GR, Jabro M. Lysophosphatidic acid modulates the regenerative responses of human gingival fibroblasts and enhances the actions of platelet–derived growth factor. *J Periodontol* 75 : 297–305, 2004.
- Cerutis DR, Dreyer AC, Vierra MJ, King JP, Wagner DJ, Fimple JL, Cordini F, McVane TP, Parrish LC, Wilwerding TM, Mattson JS. Lysophosphatidic acid modulates the healing responses of human periodontal ligament fibroblasts and enhances the actions of platelet–derived growth factor. *J Periodontol* 78 : 1136–1145, 2007.
- Cerutis DR, Weston MD, Alnouti Y, Bathena SP, Nunn ME, Ogunleye AO, McVane TP, Headen KV, Miyamoto T. A Major Human Oral Lysophosphatidic Acid Species, LPA18 : 1, Regulates Novel Genes in Human Gingival Fibroblasts. *J Periodontol* 86 : 713–725, 2015.
- Chung WC, Kermode JC. Suramin disrupts receptor–G protein coupling by blocking association of G protein alpha and betagamma subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 313 : 191–198, 2005.
- Contos JJA, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH, Chun J. Characterization of lpa2 (Edg4) and lpa1/lpa2 (Edg2/Edg4) Lysophosphatidic Acid Receptor Knockout Mice : Signaling Deficits without Obvious Phenotypic Abnormality Attributable to lpa2. *Mol Cell Biol* 22 : 6921–6929, 2002.
- Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Paparountas T, Thanassopoulou A, Zhao Z, Xu Y, Kontoyiannis DL, Remboutsika E, Aidinis V. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol* 339 : 451–464, 2010.
- George J, Headen KV, Ogunleye AO, Perry GA, Wilwerding TM, Parrish LC, McVane TP, Mattson JS, Cerutis DR. Lysophosphatidic Acid signals through specific lysophosphatidic Acid receptor subtypes to control key regenerative responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 80 : 1338–1347, 2009.
- Harrison SM, Reavill C, Brown G, Brown JT, Cluderay JE, Crook B, Davies CH, Dawson LA, Grau E, Heidbreder C, Hemmati P, Hervieu G, Howarth A, Hughes ZA, Hunter AJ, Latcham J, Pickering S, Pugh P, Rogers DC, Shilliam CS, Maycox PR. LPA1 receptor–deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Mol Cell Neurosci* 24 : 1170–1179, 2003.
- Huang LS, Fu P, Patel P, Harijith A, Sun T, Zhao Y, Garcia JG, Chun J, Natarajan V. Lysophosphatidic acid receptor–2 deficiency confers protection against bleomycin–induced lung injury and fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Bio* 149 : 912–922, 2013.
- Inoue A, Arima N, Ishiguro J, Prestwich GD, Arai H, Aoki J. LPA–producing enzyme PA–PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *EMBO J* 30 : 4248–4260, 2011.
- Ito M, Arakawa T, Okayama M, Shitara A, Mizoguchi I, Takuma T. Gravity loading induces adenosine triphosphate release and phosphorylation of extracellular signal–regulated kinases in human periodontal ligament cells. *J Invest Clin Dent* 5 : 266–274, 2014.
- Kazantseva A, Goltsov A, Zinchenko R, Grigorenko AP, Abrukova AV, Moliaka YK, Kirillov AG, Guo Z, Lyle S, Ginter EK, Rogaev EI. Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene LIPH. *Science* 314 : 982–985, 2006.
- Kihara Y, Mizuno H, Chun J. Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Exp Cell Res* 333 : 171–177, 2014.
- Lee Z, Cheng CT, Zhang H, Subler MA, Wu J, Mukherjee

- A, Windle JJ, Chen CK, Fang X. Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell* 19 : 5435–5445, 2008.
- Pasternack SM, von Kugelgen I, Al Aboud K, Lee YA, Ruschendorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nurnberg P, Nothen MM, Betz RC. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature genetics* 40 : 329–334, 2008.
- Roberts C, Winter P, Shilliam CS, Hughes ZA, Langmead C, Maycox PR, Dawson LA. Neurochemical Changes in LPA1 Receptor Deficient Mice – A Putative Model of Schizophrenia. *Neurochem Res* 30 : 371–377, 2005.
- Shimomura Y, Wajid M, Ishii Y, Shapiro L, Petukhova L, Gordon D, Christiano AM. Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair. *Nature genetics* 40 : 335–339, 2008.
- Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano MR, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* 116 : 5060–5070, 2010.
- Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, Noji S, Yatomi Y, Aoki J, Arai H. Autotaxin Stabilizes Blood Vessels and Is Required for Embryonic Vasculature by Producing Lysophosphatidic Acid. *J Biol Chem* 281 : 25822–25830, 2006.
- Teo ST, Yung YC, Herr DR, Chun J. Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB Life* 61 : 791–799, 2009.
- Thorlakson HH, Schreurs O, Schenck K, Blix II. Lysophosphatidic acid regulates adhesion molecules and enhances migration of human oral keratinocytes. *Eur J Oral Sci* 124 : 164–171, 2016.
- van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 26 : 5015–5022, 2006.
- Xu Y, Xiao YJ, Baudhuin LM, Schwartz BM. The role and clinical applications of bioactive lysolipids in ovarian cancer. *J Soc Gynecol Investig* 8 : 1–13, 2001.
- Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem* 284 : 17731–17741, 2009.
- Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 435 : 104–108, 2005.



荒川 俊哉

北海道医療大学歯学部生化学分野 准教授
 平成2年3月 琉球大学医学部保健学科 卒業
 平成4年3月 徳島大学大学院栄養学研究科博士前期課程 修了
 平成7年3月 徳島大学大学院栄養学研究科博士後期課程 修了
 平成7年4月 米国ミシガン州立大学 (Dr. William L. Smith) 博士研究員 (平成10年5月まで)
 平成10年6月 明海大学歯学部解剖学第二講座 助手
 平成11年4月 北海道医療大学歯学部口腔生化学講座 (現口腔生物学系生化学分野) 助手
 平成12年7月 北海道医療大学歯学部口腔生化学講座 (現口腔生物学系生化学分野) 講師
 平成20年3月 小樽商科大学大学院アントレプレナーシップ専攻修了
 平成26年7月 北海道医療大学歯学部口腔生物学系生化学分野 准教授