

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11385

研究課題名(和文)マトリックス分解酵素カテプシンAが歯周組織再生に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of cathepsin A on the regeneration of periodontal ligament tissue

研究代表者

北垣 次郎太 (Kitagaki, Jirouta)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90570292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、マトリックス分解酵素カテプシンAの硬組織代謝への関わりを解明することを目的として行われた。

カテプシンA阻害剤Ebelactone Bをマウス歯根膜細胞株(MPDL22)に添加し、Ebelactone BがMPDL22の骨芽細胞への分化に及ぼす影響を検討したところ、Ebelactone Bは石灰化関連因子I型コラーゲンの発現を減少させた。次に日本人侵襲性歯周炎患者におけるカテプシンAの遺伝子多型解析を行ったところ、疾患群においてカテプシンAの一塩基多型rs181943893が多くみられることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand the effects of cathepsin A on the cytodifferentiation of periodontal ligament cells.

Mouse periodontal ligament cells (MPDL22) were incubated with cathepsin A inhibitor Ebelactone B and calcification-related gene expression was assessed by real-time PCR. As a result, Ebelactone B clearly inhibited the expression of calcification-related genes such as osteopontin and type I collagen. We next evaluated genetic risk factors of cathepsin A for aggressive periodontitis in a Japanese population through exome sequencing. One of a single nucleotide polymorphism (SNP) in cathepsin A, rs181943893, showed significant different minor allele frequency (MAF) through a case-control exome sequencing.

研究分野：歯周病学

キーワード：カテプシンA Ebelactone B 歯根膜細胞 歯周組織再生 ゲノムワイドアプローチ

1. 研究開始当初の背景

歯周病の進行により喪失された歯周組織を元の形態に回復させることは、歯周治療学における最終目標の一つであり、これまでに数多くの歯周組織再生療法が提案されている。しかしながら、骨・セメント質等の硬組織形成を制御する分子機構は未だ十分に解明されているとは言えず、その詳細な分子機構を人為的に制御することにより、歯周組織の再生効率を高めようとする試みは、有効かつ安全な歯周組織再生医療を開発するための極めて重要な研究課題として残されている。

歯周組織を構成する骨・セメント質といった硬組織の主成分の一つに細胞外マトリックスがある。コラーゲンやプロテオグリカンに代表される細胞外マトリックスは骨・軟骨の主成分であることから、その発現制御に関わるマトリックス分解酵素は骨・軟骨の恒常性維持に非常に重要な役割を演じていることが既に報告されている (Paiva KB et al., *Arch Biochem Biophys*, 2014)。近年になり、骨・軟骨のみならず歯周組織の恒常性維持に対してもマトリックス分解酵素が関与していることが明らかになりつつある。マトリックス分解酵素はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) やカテプシンなどに分類され、歯周病疾患関連遺伝子の探索を目的とした SNP 解析により、MMP-1/3 が歯周病疾患関連遺伝子の一つである可能性があること (Kobayashi T et al., *J Dent Res*, 2009)、永久歯の歯周組織や歯槽骨が高度に破壊されるパピヨルフェーブル症候群では、カテプシン C が原因遺伝子であることが報告されている (Toomes C et al., *Nat Genet* 1999)。そして興味深いことに、カテプシン K と歯周組織の破壊の関連性を示唆する報告も近年なされている (Beklen A et al., *Oral Dis* 2014)。カテプシン A はリソソーム病ガラクトシアリドーシスの原因遺伝子で、カテプシン A の異常により粗な顔貌・骨の変形等の症状が生じることが報告されている。*in vitro* の実験からも、カテプシン A が破骨細胞の形成・分化に関与していることが報告されていることから、カテプシン A も硬組織の恒常性維持に重要な役割を担っているものと考えられる。このことから、カテプシン A が歯周組織の恒常性維持に関与している可能性が強く示唆されるが、その可能性の検証、詳細なメカニズムについては、未だかつて検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまで明らかとされていなかったカテプシン A の歯周組織の恒常性の維持ならびに歯周組織再生への役割を、*in vitro* ならびに *in vivo* の解析を通じて解明し、得られた知見を新規歯周組織再生療法開発へとフィードバックすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜細胞におけるカテプシン A の発現の検討

歯根膜細胞におけるカテプシン A の発現を検討することを目的として、マウス歯根膜細胞株 (MPDL22) ならびにポジティブコントロールとしてマウス筋芽細胞株 (C2C12) より cell lysate ならびに mRNA を抽出し、それぞれ抗カテプシン A 抗体を用いたウエスタンブロット法ならびにカテプシン A 特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法を行った。

(2) カテプシン A 阻害剤 Ebelactone B のカテプシン A 抑制効果の検討

選択的カテプシン A 活性制御化合物 Ebelactone B のカテプシン A 抑制効果を検討することを目的として、MPDL22 を精製水にて懸濁後、Ebelactone B を添加し、Cathepsin A enzyme assay を行った。

(3) MPDL22 における Ebelactone B の歯根膜細胞の骨芽細胞への分化に対する効果の検討

Ebelactone B の歯根膜細胞の骨芽細胞への分化に対する効果の検討することを目的として、MPDL22 に Ebelactone B を添加し、石灰化誘導培地 (α MEM 培地に、 β グリセロリン酸 5 mM とアスコルビン酸 50 ug/ml を添加) で 6 日間培養後に回収し、Cathepsin A enzyme assay ならびにリアルタイム PCR 法を行った。リアルタイム PCR 法では、石灰化関連因子であるオステオポンチン、I 型コラーゲン、オステオネクチンのプライマーを用いた。

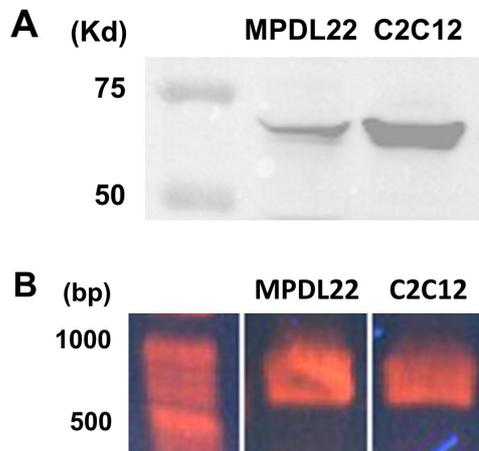
(4) 日本人侵襲性歯周炎患者におけるカテプシン A の遺伝子多型解析

大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科を受診し、日本歯周病学会の診断基準に基づいて侵襲性歯周炎と診断された患者 (40 名) ならびに健康人 (30 名) について、事前に十分な説明を行いインフォームドコンセントが得られた被験者から血液を採取しゲノム DNA を抽出した (大阪大学ヒトゲノム研究承認番号 629-3)。得られたゲノム DNA を用いたエクソームシーケンシングを行い、カテプシン A の遺伝子多型解析を実施し、侵襲性歯周炎患者と健康人におけるカテプシン A の SNP のマイナーアレル発現頻度 (MAF) を、カイ二乗検定を用いた統計学的手法により比較検討し、p 値、オッズ比、95%信頼区間を算出した。

4. 研究成果

(1) 歯根膜細胞におけるカテプシン A の発現の検討

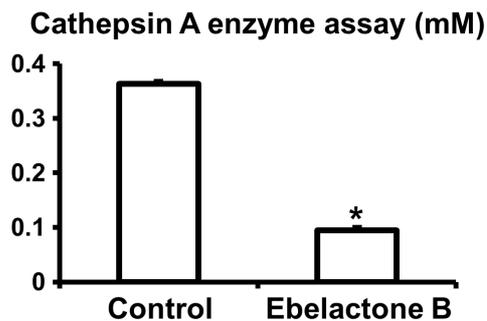
ウエスタンブロット法ならびに RT-PCR 法の結果、MPDL22 および C2C12 においてカテプシン A が発現していることが確認できた (図 -1A、B)。



(図1)
 (A)MPDL22ならびにC2C12より cell lysate を回収し、抗カテプシン A 抗体を用いたウエスタンブロット法を行った。
 (B)MPDL22ならびにC2C12より mRNA を回収し、RT-PCR 法を行った。

(2) カテプシン A 阻害剤 Ebelactone B のカテプシン A 抑制効果の検討

MPDL22 を精製水にて懸濁後、Ebelactone B を添加し、Cathepsin A enzyme assay を行ったところ、30 μ M の Ebelactone B を添加することにより、MPDL22 においてカテプシン A の酵素活性が減弱していることが明らかとなった。



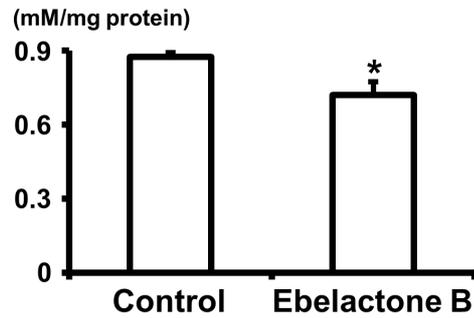
(図2)
 MPDL22 を精製水にて懸濁後、30 μ M の Ebelactone B を添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。反応終了後、355/460nm 波長で分光吸光度計を用いて Cathepsin A enzyme activity を計測した。

(3) MPDL22 における Ebelactone B の歯根膜細胞の骨芽細胞への分化に対する効果の検討

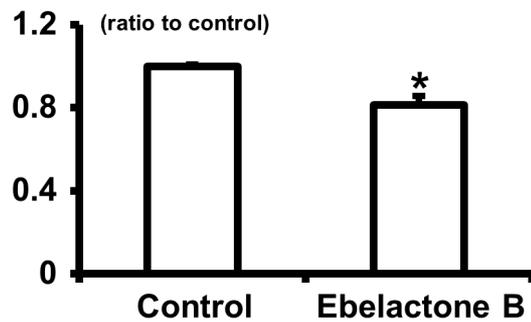
MPDL22 に Ebelactone B を添加し、6 日後に回収し Cathepsin A enzyme assay を行ったところ、Ebelactone B 30 μ M 添加により、カテプシン A の酵素活性が減弱していることを見出した(図3-A)。次に、同様の培養条件下において、石灰化関連因子の発現をリアルタイム PCR 法にて検討したところ、Ebelactone B 添加により、オステオポンチン、I 型コラーゲン、オステオネクチンの発現が

有意に減少していることが明らかとなった。

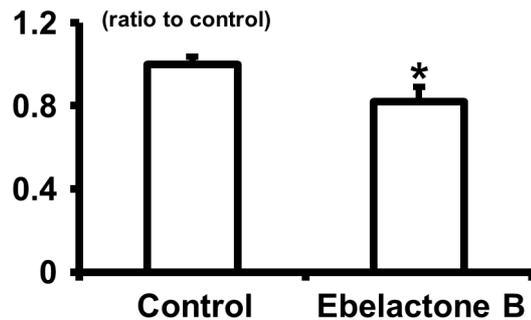
A Cathepsin A enzyme assay



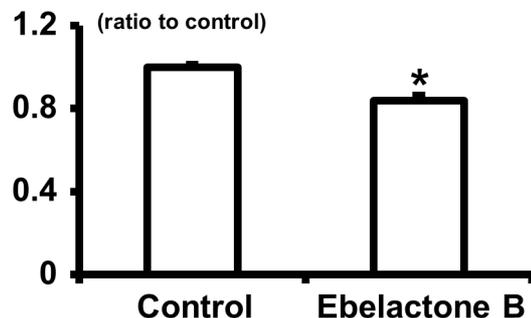
B オステオポンチン



Type I collagen



オステオネクチン



(図3)
 MPDL22 に 30 μ M の Ebelactone B を添加し、石灰化誘導培地で 6 日間培養後に回収した。
 (A) Cathepsin A enzyme assay を行った。

(B) オステオポンチン、I型コラーゲン、オステオネクチンの mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。

(4) 日本人侵襲性歯周炎患者におけるカテプシン A の遺伝子多型解析

研究開始当初に同意が得られた 13 名の侵襲性歯周炎患者を対象としたエクソームシーケンスを実施したところ、平均深度(解析時に配列を読まれた回数)は 131.5 であった。平均深度が 100 以上であればエクソームシーケンスの精度は十分と判断されることから、本研究でのエクソームシーケンスの精度を適切であると判断した。深度 10 以上のカバー率は 98.6% であった。エクソームシーケンスの結果より構築されたデータベースを用いて遺伝子多型解析を行ったところ、1 名につき平均 77,802 個の SNP を有する新たなデータベースが得られた。得られたデータベースを用いて、1000 genome データベースにおいて MAF が 1% 以下で、13 検体中 5 検体以上にみられる SNP を抽出したところ、約 400 遺伝子が同定された。その中で、カテプシン A の SNP rs181943893 【(NM_000308.3:c.108G>C)、108 番目の塩基が G から C 置換される SNP】に注目した。侵襲性歯周炎患者 40 検体および健康人 30 検体についてサンガー法による遺伝子多型解析およびカイ二乗検定を用いた統計学的解析を実施したところ、rs181943893 の MAF は侵襲性歯周炎患者群 27.5% であったのに対し、対照群では 10% であったことから、侵襲性歯周炎患者において rs181943893 のマイナーアレル発現頻度が有意に高いことが明らかとなった (p 値: 0.010、オッズ比: 3.414、95% 信頼区間: 1.287-9.058)。

以上の結果より、カテプシン A が歯根膜細胞の骨芽細胞への分化を促進していることが明らかとなった。また、侵襲性歯周炎疾患群と対照群において、カテプシン A の SNP rs181943893 の MAF に統計学的有意差を認めことから、カテプシン A が日本人における侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子であることが示唆された。すなわち、rs181943893 によりカテプシン A の活性が低下することで、歯根膜組織の恒常性維持が破綻することにより、侵襲性歯周炎の発症・進行が惹起されると考えられた。

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 6 件)

Kitagaki J, Miyuchi S, Asano Y, Imai A, Kawai S, Michikami I, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S
A Putative Association of a Single Nucleotide Polymorphism in GPR126 with Aggressive Periodontitis in a Japanese

Population.

PLoS One., 2016 Aug 10;11(8):e0160765. doi: 10.1371/journal.pone.0160765. 査読有

Yamada S, Ozaki N, Tsushima K, Yamaba S, Fujihara C, Awata T, Sakashita H, Kajikawa T, Kitagaki J, Yamashita M, Yanagita M, Murakami S

Transcriptome Reveals Cathepsin K in Periodontal Ligament Differentiation. J Dent Res. 2016 Aug;95(9):1026-33. 査読有

Miyauchi S, Kitagaki J, Masumoto R, Imai A, Kobayashi K, Nakaya A, Kawai S, Fujihara C, Asano Y, Yamashita M, Yanagita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S.

Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 Enhances Cytodifferentiation of Periodontal Ligament Cells J Dent Res., 2017, Mar, 96(3):339-346. 査読有

Kawai S, Michikami I, Kitagaki J, Hata K, Kiyonari H, Abe T, Amano A, Wakisaka S. Syntaxin 4a regulates matrix vesicle-mediated bone matrix production by osteoblasts.

J Bone Miner Res., 2017, Mar, 32(3):440-448. 査読有

Masumoto R, Kitagaki J, Matsumoto M, Miyuchi S, Fujihara C, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S.

Effects of paraoxonase 1 on the cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells. J Periodont Res., 2018, Apr, 53(2):200-209. DOI: 10.1111/jre.12507、査読有

北垣次郎太、柘本梨沙、宮内静香、藤原千春、村上伸也

エクソームシーケンスによる日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索

日本歯周病学会雑誌 Vol. 59 (2017) No.1, P1-9

DOI: <https://doi.org/10.2329/perio.59.1>、査読有

[学会発表](計 8 件)

NGS 現場の会 第 4 回研究会

日本人侵襲性歯周炎患者のヒトエクソーム解読と遺伝子多型解析

北垣次郎太、宮内静香、村上伸也

平成 27 年 7 月 2 日

つくば国際会議場(茨城)

第 143 回秋季保存学術大会

日本人侵襲性歯周炎患者のヒトエクソーム

解読と遺伝子多型解析
北垣次郎太、宮内静香、山下元三、山田聡、
北村正博、村上伸也
平成 27 年 11 月 13 日
文京シビックホール(東京)

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本
生化学会大会合同大会
ゲノムワイドアプローチによる日本人侵襲
性歯周炎の疾患関連遺伝子探索
北垣次郎太、宮内静香、今井敦子、朝野仁裕、
河合伸治、道上郁美、山下元三、山田聡、北
村正博、村上伸也
平成 27 年 12 月 1 日
神戸ポートアイランド(兵庫)

International Symposium 2015, Oral and
Craniofacial Development and Diseases
Identification of genetic risk factor for
Japanese aggressive periodontitis by
genome-wide association study
Jirouta KITAGAKI, Shizuka MIYAUCHI, Motozo
YAMASHIYA, Satoru YAMADA, Masahiro
KITAMURA, Shinya MURAKAMI
平成27年12月10-11日
大阪大学・弓倉記念ホール(大阪)

第 145 回日本歯科保存学会 2016 年度秋季学
術大会
歯根膜細胞の骨芽細胞分化に対する SMPD3 の
効果
北垣次郎太、宮内静香、榎本梨沙、藤原千春、
山下元三、柳田学、山田聡、北村正博、村上
伸也
平成 28 年 10 月 28 日
キッセイ文化ホール(長野)

第 39 回日本分子生物学会年会
歯根膜細胞の骨芽細胞分化における SMPD3 の
影響
北垣次郎太、宮内静香、榎本梨沙、今井敦子、
小林香織、中谷明弘、河合伸治、藤原千春、
山下元三、柳田学、山田聡、北村正博、村上
伸也
平成 28 年 11 月 30 日
パシフィコ横浜(神奈川)

第 5 回 NGS 現場の会
エクソーム解析を用いた日本人侵襲性歯周
炎の疾患関連遺伝子探索
北垣次郎太、榎本梨沙、宮内静香、藤原千春、
山田聡、村上伸也
平成 29 年 5 月 22-24 日
仙台国際センター(宮城)

第40回日本分子生物学会年会
歯根膜細胞の骨芽細胞への分化における
paraoxonase 1の役割
北垣次郎太、榎本梨沙、松本昌大、宮内静
香、藤原千春、山下元三、山田聡、北村正

博、村上伸也
平成29年12月8日
神戸ポートアイランド(兵庫)

6. 研究組織
(1)研究代表者
北垣次郎太(Jirouta Kitagaki)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 90570292

(2)研究分担者
山田聡(Satoru Yamada)
東北大学・歯学研究科・教授
研究者番号: 40359849

山下元三(Motozo Yamashita)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 90524984