

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04417

研究課題名(和文) 歯周組織恒常性維持の統合的理解とホメオダイナミクス - 歯周治療・診断への新戦略 -

研究課題名(英文) Homeodynamics analysis of periodontal ligament tissue

研究代表者

山田 聡 (Yamada, Satoru)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40359849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：多臓器円環(ホメオダイナミクス)とは、各臓器・組織が、免疫・代謝・自律神経系など高次ネットワークを介して、時間的・空間的に変動連携することで生命体を維持する恒常性維持機構である。本研究では、申請者のこれまでの歯周組織トランスクリプトーム解析をさらに発展させ、歯周組織の恒常性維持機構に関わる新たな分子・遺伝子群を統合的に解明し、疾患モデルマウスを用いて、歯周病と全身疾患との関連性について解析することで、全身疾患と歯周病に共通して関与する遺伝子群(歯周病-多臓器円環遺伝子)の同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、20K Human Periodontal Ligament Expression Databaseをもとに歯周組織恒常性維持に関わる分子機構を網羅的かつ統合的に解明すること、さらに、遺伝子改変マウスを用いた疾患モデルマウスを糸口にホメオダイナミクスの観点から歯周医学(ペリオドンタルメディスン)の分子病因を解明すること、これらにより歯周組織の恒常性の破綻の結果、発症・進行する歯周病の分子病態を理解するという学術的意義がある。本研究のアプローチにより、新たな歯周病治療・組織再生の分子標的薬や歯周病発症前遺伝子診断法の開発に繋がる可能性が期待出来る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed comprehensive transcriptome analyses to identify novel genes and molecules which are involved in periodontal tissue homeostasis. We analyzed periodontal disease animal models using a gene modified mouse to investigate more details of molecular mechanisms of periodontal medicine in terms of homeodynamics.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜 遺伝子改変マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、大規模トランスクリプトーム解析として、20K Human Periodontal Ligament Expression Database を構築し、ヒト歯根膜の組織恒常性維持に関わる 15,000 以上の遺伝子発現を網羅的に解析してきた (Yamada et al. J. Dent. Res. 2016)。ヒト歯根膜においては、様々な細胞外基質分子 (ECM) が発現・機能しており、その中でも、歯根膜組織に高発現している Glutamate 関連分子 (Fujihara, Yamada et al. J. Biol. Chem. 2010)、Ferritin (Hou, Yamada et al. Biochem. Biophys. Res. Commun, 2014)、歯根膜特異的 Periostin (Yamada et al. J. Dent. Res. 2015) は、歯根膜細胞の分化を促進・活性化する因子群であること、一方、PLAP-1/asporin (Yamada et al. J. Biol. Chem. 2007)、Cathepsin K (Yamada et al. J. Dent. Res. 2016) は、硬組織形成能 (石灰化能) を抑制する因子群であることを明らかとしてきた。この様に細胞分化の促進因子と抑制因子が共に発現・機能することで、歯根膜組織は軟組織として形態を維持しつつも、組織の修復や再生が必要な時には、硬組織形成細胞 (骨芽細胞・セメント芽細胞) へと分化することが出来るというユニークな恒常性維持機構の分子メカニズムを有することを明らかとしてきた。さらに、申請者が樹立した PLAP-1 遺伝子改変 (PLAP-1KO) マウス (Awata, Yamada et al. J. Dent. Res. 2015) の解析から、PLAP-1 は、歯周組織の恒常性維持だけではなく脂肪組織の恒常性維持にも重要な役割を担っていることを明らかとしてきた。加えて、重篤な循環器疾患を発症する Loey's-Dietz 症候群において侵襲性歯周炎様病態を併発する患者を見出し、同患者の TGF- β 受容体遺伝子変異を再現した TGF- β 受容体遺伝子改変 (TGFBR1KI) マウスを樹立した (平成 24-25 年度挑戦的萌芽研究 No. 24659923)。同上遺伝子変異マウス群の解析から、歯根膜および全身疾患標的臓器の結合組織における ECM の構成異常、免疫・炎症系細胞の機能異常等により、全身疾患と関連する歯周病 (PLAP-1KO マウスでは高脂肪食誘導性肥満・糖尿病と歯周病、TGFBR1KI マウスでは、大動脈疾患と歯周病) の疾患感受性や発症・進行のリスクが変化していることを見出している (平成 26-28 年度基盤研究 (B) No. 26293437)。これらの結果から、PLAP-1 および TGF- β を介した ECM シグナルが、歯周病と全身疾患とを結びつける共通のキー分子 (歯周病 - 多臓器円環因子) の一つである可能性が示唆される。しかしながら、歯周病は様々な因子が関与する多因子性疾患であり、その全容を解明するためには、さらなる分子メカニズムの統合的な理解が必須である。

2. 研究の目的

全身の臓器・組織は、免疫・代謝・自律神経系など高次ネットワークを介して、時間的・空間的に変動連携することで生命体を維持している。この多臓器を統合した恒常性維持機構を明らかとしていくという多臓器円環 (ホメオダイナミクス) という考え方が提唱され、国家的重要研究プロジェクトの一つとして研究推進されてきた (科学技術機構戦略イニシアティブ 2010)。そこで、本研究では、上記の 20K Human Periodontal Ligament Expression Database を活用することにより、歯周組織の恒常性維持機構に関わる新たな分子・遺伝子群を統合的に解明し、さらに、疾患モデルマウスにおける歯周病と全身疾患との関連性を解析することを目的とした。疾患モデルマウスを用いた全身疾患と歯周病における多臓器円環解析として、これまでの先行実験から、PLAP-1KO マウスは、高脂肪食誘導性の肥満・糖尿病と歯周病のリスクが変化していることを見出しており、PLAP-1 シグナルが、歯周病 - 多臓器円環関連因子の一つである可能性が考えられたことから、PLAP-1KO マウスを用いて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 新規歯周組織恒常性維持機構関連遺伝子・分子の同定とその機能解析

ヒトの正常歯根膜組織から構築した 20K Human Periodontal Ligament Expression Database (Yamada et al. J. Dent. Res. 2016) において、歯根膜組織に高発現しているながら、歯根膜組織における機能は未だ不明である遺伝子群を選択した。同遺伝子群の発現について、ヒト培養歯根膜細胞を石灰化誘導培地 (10%FCS、10mM β -glycerophosphate、50ug/ml ascorbic acid 含有 α -MEM 培地) にて長期培養することにより、硬組織形成細胞への分化過程における遺伝子群発現動態を Real-time PCR 法にて解析した。さらに、各遺伝子群特異的 RNAi による発現抑制 (Loss of function) 実験、また、各遺伝子群強発現プラスミドの導入による高発現 (Gain of function) 実験を行うことで、in vitro における機能解析を行った。

(2) 歯槽骨吸収量の定量解析

10-12 週齢の C57BL/6J マウス (以下 WT マウスと略す) および PLAP-1 KO マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔下にて 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (以下 4%PFA と略す) を用いて還流固定後、上顎を採取し、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2 により断層撮影を行い、得られた 3 次元画像を 3 次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON により 2 次元化した。画像解析ソフトウェア WinROOF を用いて、2 次元化した画像におけるセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの根尖方向の距離を測定し、第一臼歯遠心根、第二臼歯近心および遠心根、第三臼歯の歯根における測定値の合計を同上マウスの歯槽骨吸収量とした。

(3) マウス歯根膜における透過型電子顕微鏡解析

2%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (2%PFA と略す) を用いて還流固定後、上顎歯周組

織を摘出し、2%PFA に一晚浸漬した。次に上顎歯周組織を 0.1M リン酸緩衝液含有 2%グルタラルアルデヒドリン酸緩衝液に浸漬後、4 の 0.1M リン酸緩衝液含有 2%オスミウム水溶液にて 3 時間浸漬した。脱水後、上顎歯周組織にプロピレンオキサイドを 30 分間 2 回浸透させ、レジンとプロピレンオキサイドの混合液に 6 時間浸漬、さらにレジンの一晚浸漬した。60 にて 48 時間重合させ、ウルトラミクロトームを用いて厚さ 70nm の極薄切片を作製した。極薄切片を透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus にて観察および写真撮影を行った。画像解析ソフトウェア WinROOF を用いて、ランダムに選択した部位 8 カ所のコラーゲン原線維直径を合計 800 個計測し、定量化を行った。

(4) 抜歯による歯根膜牽引試験

マウスの歯根膜牽引試験は Trombetta-e Silva らの方法に準じて行った。すなわち、12 週齢の WT および PLAP-1 KO マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔後、下顎骨を摘出し、PBS に浸漬した。直ちに下顎骨周囲を歯科充填用コンポジットレジン クリアフィルマジエスティ ES フローにて補強を行い、第一臼歯根分岐部に直径 0.2mm のタングステンワイヤーを通した。小型卓上試験機 SHIMADZU EZ-S 500N を用いて下顎骨周囲の CR を固定し、タングステンワイヤーをクロスヘッドスピード毎分 1mm にて牽引した。第一臼歯が抜歯されるまでに必要な最大応力を計測し比較した。

(5) 絹糸結紮によるマウス実験的歯周炎モデル

絹糸結紮によるマウス実験的歯周炎モデルは Abe らの方法に準じて行った。すなわち、ペントバルビタールナトリウム麻酔下の 8 週齢 WT および PLAP-1 KO マウスの上顎第二臼歯に 8-0 絹糸を結紮した。絹糸結紮後 14 日後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で、PFA を用いて還流固定したマウスより上顎第二臼歯を含む上顎を摘出した。同組織を、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2 を用いて断層撮影を行い、得られた 3 次元画像を 3 次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON により 2 次元化した。画像解析ソフトウェア WinROOF を用いて、2 次元化した画像におけるセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの根尖方法の距離を測定し、第一臼歯遠心根、第二臼歯近心および遠心根、第三臼歯の歯根における測定値の合計を同マウスの歯槽骨吸収量とした。

(6) 歯根膜組織における網羅的遺伝子発現解析

WT マウスおよび PLAP-1KO マウスの上顎大臼歯歯根膜組織から、RNA を抽出・精製し、同 RAN を用いて、KURABO GneChip Gene ST Array にて網羅的な遺伝子発現解析を行った。WT マウスおよび PLAP-1KO マウスにおいて発現が異なる遺伝子群を同定し、各遺伝子特異的な RT-PCR 解析、歯根膜細胞を用いた RNAi による発現抑制解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規歯周組織恒常性維持機構関連遺伝子の同定と機能解析

20K Human Periodontal Ligament Expression Database の解析から、未だ歯根膜における発現や機能について詳細が不明な遺伝子 RMND5A が見出された。そこで、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程における同遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析したところ、歯根膜細胞の硬組織形成細胞分化に伴ってその発現が誘導されることが明らかとなった。文献検索の結果、RMND5A は、CTLH 複合体を構成する分子の一つであり、ユビキチン化されたタンパク質の分解に関わっている可能性が示唆された。そこで、RMND5A 特異的 RNAi を歯根膜細胞へ遺伝子導入し、同細胞を硬組織形成誘導培地にて分化誘導したところ、分化マーカーである ALP 活性およびアリザリンレッド陽性の石灰化ノジュール形成細胞の数が、対照群と比較して、増加することが明らかとなり、RMND5A が、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化メカニズムに関与している可能性が示された。

(2) PLAP-1KO マウスにおける歯根膜組織の構造変化

6 週齢、12 週齢、48 週齢雄の WT および PLAP-1 KO マウスから採取した歯周組織を用いて透過型電子顕微鏡にて観察を行った。歯根膜を構成するコラーゲン原線維の直径を計測し、定量化解析を行ったところ、6 週齢、12 週齢において WT マウスと比較して PLAP-1 KO マウスのコラーゲン原線維の直径が有意に増加している事が示された。また、48 週齢では WT マウスと比較して PLAP-1 KO マウスのコラーゲン原線維の直径が有意に減少している事が示された。

(3) PLAP-1KO マウスにおける歯根膜の機能的変化

歯根膜の強度を評価するために、歯根膜を物理的に牽引し抜歯を行うモデルを作製した。12 週齢の WT および PLAP-1 KO マウスから採取した下顎骨を固定し、第 1 臼歯根分岐部に通したワイヤーを牽引し、抜歯までの最大応力を計測した。その結果、WT マウスと比較して PLAP-1 KO マウスにて歯根膜牽引による抜歯時の最大応力の有意な減少が示され、PLAP1KO マウスの歯根膜においては、線維性付着が低下している可能性が示唆された。

(4) PLAP-1KO マウスを用いた絹糸結紮歯周病モデルの解析

PLAP-1 KO マウスの歯周病に対する歯周組織の変化を観察するために、絹糸結紮による実験的歯周炎モデルを作製した。絹糸結紮 14 日後に上顎骨を回収し、 μ CT 撮影、切片の作製を行った。WT および PLAP-1 KO マウスそれぞれにおいて、絹糸結紮により骨吸収が誘導された像が認められた。さらに、絹糸結紮群において、WT マウスと比較して PLAP-1 KO マウスにて重篤な歯槽骨吸収が認められた。歯槽骨吸収はセメント-エナメル境から歯槽骨頂の距離、の合計を計測した。測定の結果、WT および PLAP-1 KO マウスにおいて、絹糸結紮により有意に骨吸収が起こっている事が認められた。コントロール側では歯槽骨吸収に差が認められない一方で、絹糸結紮側にて WT マウスと比較して、PLAP-1 KO マウスにて有意に骨吸収が起こっている事が明らかとなった。

(5) PLAP-1 遺伝子座における ECM 遺伝子の発現調整

WT マウスおよび PLAP-1KO マウスの歯根膜組織におけるマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、PLAP-1KO マウスにおいて有意にその発現が増加している遺伝子群および低下している遺伝子群を見出した。各遺伝子に対する特異的な RT-PCR 解析を行った結果、マイクロアレイによる結果の再現性が認められ、実験の妥当性が示された。PLAP-1KO マウスにおいて有意に低下を示した遺伝子群の中で、特にマウスゲノム(第 13 染色体)の PLAP-1 遺伝子座に近接する OGN および OMD 遺伝子に注目した。OGN、OMD は、これまでの研究報告から硬組織形成に関わる ECM をコードする遺伝子であることが示されているが、歯根膜組織における発現や機能については、不明な点が多い。さらに、PLAP-1 遺伝子が、直接、遺伝子座近傍の OGN、OMD の遺伝子発現を調節している可能性についても示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木下昌毅、山田 聡、藤原千春、川村聡子、栗田敏仁、津島賢一郎、竹立匡秀、村上伸也
2. 発表標題 ノックアウトマウスを用いたPLAP-1の歯周組織における機能解析
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王 祝愉、根本 英二、丸山 顕太郎、鈴木 茂樹、多田 浩之、向阪 幸彦、須藤 瑞樹、山田 聡
2. 発表標題 ヒト歯根膜細胞は周期的伸展刺激により抗炎症性エクソソームを分泌する
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 聡
2. 発表標題 Loeys-Dietz症候群モデルマウスを用いた侵襲性歯周炎の分子病態解析
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王 祝愉、根本英二、丸山顕太郎、須藤瑞樹、山田 聡
2. 発表標題 周期的進展刺激を受容した歯根膜細胞はNLRP3インフラマソーム抑制因子を産生する
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 聡
2. 発表標題 細胞外マトリックスによる歯周組織の恒常性維持と破綻の分子メカニズム
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 聡
2. 発表標題 細胞外基質分子PLAP-1による歯根膜の組織恒常性維持機構の解明
3. 学会等名 東北大学歯学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoru Yamada
2. 発表標題 Molecular basis of maintaining periodontal tissue homeostasis
3. 学会等名 China-Japan Dental Science Symposium 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山田 聡	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 321
3. 書名 歯科再生医学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤原 千春 (Fujihara Chiharu) (00755358)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	森崎 隆幸 (Morisaki Takayuki) (30174410)	東京大学・医科学研究所・特任教授 (12601)	
研究分担者	鈴木 茂樹 (Suzuki Shigeki) (30549762)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	村上 伸也 (Murakami Shinya) (70239490)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	北垣 次郎太 (Kitagaki Jirouta) (90570292)	大阪大学・歯学研究科・招へい教員 (14401)	