

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17073

研究課題名(和文) 歯周組織における仮足形成関連因子の発現・機能解析と制御機構の解明

研究課題名(英文) Exploring the regulatory mechanism of cell extension formation protein in periodontal tissue

研究代表者

祐田 明香 (Yuda, Asuka)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20814081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト歯根膜および歯肉上皮細胞において、PDLIM5が仮足形成、細胞走化性に及ぼす影響について検討を行うこととした。siRNAにてPDLIM5をノックダウンさせた1-11およびOBA9を使用し、細胞の仮足形成、また、細胞走化性を評価した。siRNAにてPDLIM5がノックダウンされた1-11においては、仮足形成、細胞走化性が、コントロールと比較し、有意に減少し、OBA9においては、1-11と逆の結果を示した。以上より、本研究からPDLIM5は、歯根膜および歯肉上皮細胞において、相反的な働きをすることが推察された。PDLIM5は歯周組織再生を誘導する可能性のひとつとして示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、PDLIM5はヒト歯根膜細胞の仮足形成、細胞遊走において促進に働くことに対し、ヒト歯肉上皮細胞においては抑制に働く可能性が推察された。PDLIM5がヒト歯根膜細胞およびヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響が検証されれば、歯周組織再生治療の際起こりうる、歯肉のダウングロース防止に応用できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of PDLIM5 on association with cell extensions formation and migration activity of human periodontal ligament and gingival epithelial cells. To examine the roles of PDLIM5 in 1-11 and OBA9 cells, PDLIM5 was knocked down by siRNA. We examined formation of cell extensions and migration activities. PDLIM5-knockdown 1-11 cells reduced cell extensions formation and migration activities, compared with control cells. PDLIM5-knockdown OBA9 cells promoted cell extensions formation and migration activities, compared with control cells. These results suggested that PDLIM5 may regulate of cell extensions formation and migration activity on periodontal ligament and gingival epithelial cells during wound hearing. PDLIM5 would be used as a therapeutic agent for periodontal regeneration.

研究分野：歯科保存学

キーワード：PDLIM5 仮足形成 歯周組織再生 歯肉のダウングロース

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、嫌気性細菌を主とする歯周病原菌が感染し、生体側の宿主反応の結果生じる炎症に起因しており、主に歯と歯肉の付着の喪失、歯槽骨の吸収などの症状が現れる。近年、歯周組織の欠損部歯根面に骨芽細胞、セメント芽細胞ならびに歯根膜線維芽細胞が生成され、歯と歯槽骨の間に線維性結合(新付着)が得られる歯周組織再生治療に注目が集まっている。以前、ビーグル犬の歯を抜歯し、歯肉結合組織に接するように移植し、歯根膜の有無による新付着形成を評価した結果、歯肉結合組織には新付着を獲得する能力がなく、歯根膜が新付着形成に必要であることが報告された(Nyman et al., Journal of Clinical Periodontology, 1980)。しかしながら、歯周組織再生の際、歯根膜および歯槽骨より歯肉上皮および歯肉結合組織の増殖速度が速いため、歯肉のダウングロースが起こり、歯根膜の再生が困難になる。歯肉のダウングロースを防止するため、歯根膜由来の細胞が歯根面に誘導されるように物理的な遮断膜を設置する GTR 法が開発された。しかし、技術依存度が高く日常の歯科診療で応用するには煩雑であることから、今後は、より簡便に歯肉上皮および歯肉結合組織の増殖を抑制し、さらに歯根膜に対し再生を促す方法の確立が待望されている。

細胞はラメリポディア(葉状仮足)およびフィロポディア(糸状仮足)と呼ばれる仮足を伸ばす(Clainche et al., Physiological Reviews, 2008)。細胞遊走、創傷治癒ならびに組織の形態形成の際、細胞が仮足形成することが重要な役割を担っている(Clainche et al., Physiological Reviews, 2008)。申請者は以前、細胞の仮足側で特異的な因子を探索するため、細胞体側と仮足側のタンパク質量の解析を行った(Wang et al., Science Signaling, 2007)。マウス線維芽細胞株(NIH3T3 細胞)において、コラーゲンコーティングを行ったメンブレンの上部(細胞体)および下部(仮足)で、細胞体と仮足に分離し、プロテオミクス(Mass spectrometry)解析にて細胞体側と仮足側のタンパク発現の比較を行った結果、細胞体側より仮足側で PDLIM5 が多く見い出された。PDLIM5 は、細胞骨格、細胞の分化に関わる(Kadmas et al., Molecular Cell Biology, 2004)PDZ-LIM ファミリーに属している。PDLIM5 は、心筋細胞(Maturana et al., Cardiovascular Research, 2008)および腎細胞(Kuroda et al., Journal of Biological Chemistry, 1996)でその発現が認められている。近年、ヒト平滑筋細胞において、PDLIM5 は AMP キナーゼ(AMPK)の新規の基質として発見され、さらに PDLIM5 の活性化はラメリポディアのアクチン重合を阻害し、細胞遊走を抑制することが報告されている(Yan et al., Nature Communications, 2015)。しかしながら、歯根膜細胞および歯肉上皮細胞における PDLIM5 の発現、機能に関しては知られていない。

以上のことから、PDLIM5 の機能は細胞の種類により違いがあるのではないかと考え、申請者は、PDLIM5 はヒト歯根膜細胞の仮足形成、コラーゲンリモデリング、細胞遊走ならびに線維形成において促進に働くことに対し、ヒト歯肉上皮細胞においては抑制に働く可能性があるのではないかと仮説を立て検討を行うこととした。また、PDLIM5 がヒト歯根膜細胞およびヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響が証明されれば、歯周組織再生治療の際起こりうる、歯肉のダウングロース防止に応用できる可能性があると考えられ解析を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、仮足形成関連タンパクである PDLIM5 に注目し、siRNA により PDLIM5 をノックダウンさせたヒト歯根膜細胞およびヒト歯肉上皮細胞を作製し、仮足形成、細胞遊走能の解析を行い、PDLIM5 がヒト歯根膜細胞およびヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響を検討することとした。

## 3. 研究の方法

実験には、SV40T-Ag および HTERT にて不死化されたヒト歯根膜細胞株(1-11)、SV40T-Ag にて不死化されたヒト歯肉上皮細胞株(OBA-9)を使用した。

1) ヒト歯根膜細胞およびヒト歯肉上皮細胞における PDLIM5 の発現解析: 1-11 および OBA-9 における PDLIM5 の発現を、ウエスタンブロット法を行い評価した。

2) ヒト歯根膜細胞およびヒト歯肉上皮細胞における PDLIM5 の機能解析: 2 種類の siRNA にて PDLIM5 をノックダウンさせた 1-11 および OBA-9 を使用し、以下の実験を行った。

細胞をフローティングコラーゲンゲル(Mohammadi et al., Biomaterials, 2014)上で培養後、F-actin にて免疫染色を行い、仮足形成数および長さの測定し評価した。

細胞をセルカルチャーインサートに播種後、インサート下面の細胞数を計測し、細胞走化性を評価した。

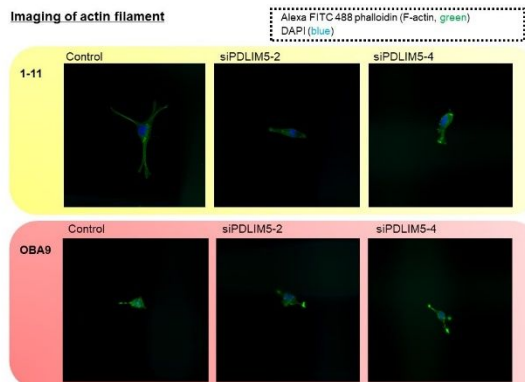
## 4. 研究成果

1) で申請者は、まず使用する予定である、1-11 および OBA-9 における PDLIM5 の発現について検討した。その結果、1-11、OBA-9 の両方の細胞にて PDLIM5 のタンパク質の発現を認めた。

2) では、1) で PDLIM5 の発現が認められたことから、2 種類の siRNA にて PDLIM5 をノックダウンさせた 1-11 および OBA-9 の作製を行い、機能解析を行った。2 種類の siRNA にて PDLIM5 が

ノックダウンされた 1-11 および OBA-9、コントロール細胞をフローティングコラーゲン上に播種し、3 時間後の仮足形成の数、長さの測定を行った。1-11 においては、コントロールと比較し、siPDLIM5 にて仮足形成数および長さが有意に減少した。一方、OBA-9 では、コントロールと比較し、siPDLIM5 にて仮足形成数および長さが有意に増加した。次に 2 種類の siRNA にて PDLIM5 がノックダウンされた 1-11 および OBA-9、コントロール細胞をセルカルチャーインサートに播種し、24 時間後、インサート下面の細胞数を計測した。その結果、1-11 においては、コントロールと比較し、siPDLIM5 にて細胞遊走能が有意に減少した。OBA-9 においては、コントロールと比較し、siPDLIM5 にて細胞走化性が有意に促進された。また、PDLIM5 を CRISPR-cas9 にてノックダウンさせた細胞の作製も行い、並行して解析を行っている。さらに、2) の現象のメカニズムをより詳細に評価するため、ヒト歯根膜細胞およびヒト歯肉上皮細胞における PDLIM5 が関わるシグナリング経路の解析を進めていく必要がある。

本研究で得られた結果より、PDLIM5 は、ヒト歯根膜細胞において、細胞の仮足形成、細胞走化性に対し促進に働き、ヒト歯肉上皮細胞においては、細胞の仮足形成、細胞走化性に対し抑制に働くことが推察された。PDLIM5 は歯周組織再生を誘導する可能性のひとつとして示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>S Hamano, A Tomokiyo, D Hasegawa, A Yuda, H Sugii, S Yoshida, H Mitarai, N Wada, H Maeda | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Functions of beta2-adrenergic Receptor in Human Periodontal Ligament Cells              | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>J Cell Biochem.  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/jcb.29706   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-       |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>A Yuda, W S Lee, P Petrovic, C A McCulloch                            | 4. 巻<br>365(1)      |
| 2. 論文標題<br>Novel Proteins That Regulate Cell Extension Formation in Fibroblasts | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>Exp Cell Res .  | 6. 最初と最後の頁<br>85-96 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.yexcr.2018.02.024                          | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Asuka Yuda, Shinsuke Fujii, C.A.McCulloch, Michihiko Usui, Shinya Murakami, Hidefumi Maeda, Naohisa Wada |
| 2. 発表標題<br>Roles of PDLIM5 in periodontal ligament and gingival epithelial cells                                    |
| 3. 学会等名<br>The 106th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology（国際学会）                                 |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>祐田明香, 和田尚久           |
| 2. 発表標題<br>線維芽細胞における仮足形成因子の探索   |
| 3. 学会等名<br>日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会 |
| 4. 発表年<br>2018年                 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|