

平成 21年 5月14日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791611

研究課題名 (和文) ヒト歯根膜組織特異的分子PLAP-1の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of human periodontal ligament specific molecule PLAP-1

研究代表者

小澤 康宏 (OZAWA YASUHIRO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：30448146

研究成果の概要：

ヒトの歯根膜組織は線維性の結合組織でありながら、高い石灰化能を有する生体内でも非常にユニークな組織の一つであるが、その組織を分子生物学的な側面からの解析は十分に行われていたとは言い難い。今研究では、ヒトの歯根膜組織の遺伝子解析の結果発見された、新規の分子である periodontal ligament associated protein-1 (PLAP-1) の機能解析を行ったもので、その結果、PLAP-1 が歯根膜組織に恒常的に発現し、その恒常性の維持に重要な役割を担っていること、歯根膜細胞の硬組織形成分化を抑制的に制御していること、また、その機能は硬組織形成誘導能を持つサイトカインである BMP-2 との分子間相互作用が関係していることが強く示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯根膜組織・特異的発現分子・PLAP-1

1. 研究開始当初の背景

ヒトの歯根膜組織は、歯と歯槽骨という2つの硬組織の間に存在する、コラーゲン線維に富む非石灰化された結合組織であり、線維性付着により歯を歯槽骨に保持するという役目を担いながら、咬合時の感覚受容器としても機能している。また、ヒト歯根膜組織は生理的条件下において100～250 μ mの幅を保ちながら、咬合力、矯正力といったメカニカルスト

レスに反応して歯槽骨、セメント質及び結合組織のリモデリングを行い、歯周組織の動的平衡を保つ上で、重要な役割を担っている。さらに、近年の研究により歯根膜組織は歯周組織の再生を可能ならしめる未分化間葉系細胞群のリザーバーとなっている重要な組織であることも明らかにされている。また、歯根膜組織由来の培養細胞を用いた数々の研究により、歯根膜由来の線維芽細胞は歯肉

由来の線維芽細胞と比較して高い石灰化能を有し、硬組織形成に関与する分子の発現が高いことも明らかにされている。しかしながら生体内において重要かつユニークな組織である歯根膜組織についての研究は、形態的、機能的な解析に焦点があてられ、同組織の遺伝子レベルでの特徴についてはいまだ十分に解明されているとはいいがたい。

一方、ヒトゲノム計画の進展の結果、ヒトの全ゲノム配列が解読され、ヒトの遺伝子総数は約3万個であることが明らかとなった。そしてヒトの身体は約60兆個の様々な形態や機能を有する細胞が相互に協調しながら形作られていると考えられている。しかし、身体各組織の細胞においてすべての遺伝子が発現しているわけではなく、総数約3万個の遺伝子のうち必要とされる遺伝子が選択的に発現し、相互に影響しあうことにより、各々の組織、細胞の特異性を創出していると考えられている。すなわち、身体を構成する異なる種類の組織、細胞すべてに異なった遺伝子の発現の組み合わせが存在し、その組み合わせのパターンこそが組織、細胞の多岐にわたる形態や機能といった特異性を導き、身体を形作っているといえる。そのため、身体各組織、細胞における遺伝子発現の組み合わせを解明し、分子生物学的な側面からその組織、細胞の特異性を解明しようとする試みがなされるようになってきている。

遺伝子発現状況の網羅的な解析法には数々の方法が存在するが、国立遺伝学研究所の大久保らは3'末端 cDNA ライブラリを用いた方法を確立した。この3'末端 cDNA ライブラリは、逆転写酵素の効率やクローニング効率といった二次的な影響を受けにくいことが特徴となっており、このライブラリ中から無作為にクローンを抜き取り解析することにより、実際の組織、細胞における構成遺伝子の割合を性格に再現した「絶対的な」遺伝子発現量を示すプロファイリングが可能となり、同様の手法を用いて作成された身体各組織、細胞の遺伝子発現プロファイルデータを集積しデータベース化することにより (Body Map プロジェクト)、各組織、細胞間の遺伝子発現プロファイルを比較検討し、組織、細胞特異的な遺伝子発現パターンを捉え、さらには特異的に発現する遺伝子を単離、同定することが可能となっている。

このような学術的な背景のもと、生体内において非常にユニークな特徴を有する歯根膜組織についても、その特徴を遺伝子発現状況の側面から捉えようとすることは非常に有意義であると考えられる。

2. 研究の目的

我々の所属する研究室においてはこれまでに、*in vivo* におけるヒト歯根膜組織の特徴を遺伝子発現状況の側面から網羅的に解析

することを目的として、矯正治療のため便宜抜歯した歯の歯根膜組織より抽出した mRNA をもとに、ヒト歯根膜組織 3'末端 cDNA ライブラリを構築し、無作為に抽出した cDNA クローンの塩基配列を解読することにより、ヒト歯根膜組織において、いかなる遺伝子がいかなる頻度で発現しているかを示す、ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイルを作成し、その解析を行った。その解析過程において歯根膜組織に特異的な発現を示す新規遺伝子が見出されたため、

periodontal ligament associated protein-1 (PLAP-1) と命名した。PLAP-1 は全長 2.4Kb の遺伝子で、382 個のアミノ酸をコードしていた。アミノ酸シーケンスの解析から PLAP-1 分子は small leucine-rich repeat proteoglycan family に属する新規のタンパク質であり、Decorin、Byglycan と高い相同性を示すことが明らかとなった。これまでに、PLAP-1 の特徴について解析を行い、その機能が歯根膜組織の恒常性維持に関与している可能性について明らかにしてきた。しかしながら、その具体的なメカニズムについては未だに不明のままである。そこで本研究では、PLAP-1 の発現調節機構、*in vivo* における発現局在の検討及びその機能解析を行うことにより、歯根膜組織を特徴づける分子基盤を理解する一助となる情報を得ることを目的とする

3. 研究の方法

(1) 培養歯根膜細胞を用いた PLAP-1 発現調節機構の解析

ヒト歯根膜細胞 (HPDL) を石灰化誘導培地中に長期培養することにより、同細胞を硬組織形成細胞へと分化誘導した際の PLAP-1 遺伝子発現変化を RT-PCR 法により解析する

(2) 各種サイトカイン刺激による PLAP-1 発現調節機構の解析

HPDL に様々なサイトカインを作用させ、その条件下における PLAP-1 遺伝子発現変化を RT-PCR 法により解析する

(3) *in vivo* における PLAP-1 遺伝子発現の局在解析

4 週齢マウスの上顎臼歯の組織切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにより、PLAP-1 遺伝子発現の局在解析を行う

(4) リコンビナント PLAP-1 タンパク質を用いた PLAP-1 機能解析

大腸菌由来リコンビナント PLAP-1 タンパク質を歯根膜細胞培養系に添加しその影響を解析する

(5) 歯根膜特異的分子 PLAP-1 の Gain of Function

及び Loss of Function による機能解析

PLAP-1 遺伝子をマウス歯根膜細胞 (MPDL22) に強制的に発現させ、その分化過程に及ぼす影響についてアルカリフォスファターゼ活

性及びアリザリン染色法により硬組織形成能に対する評価を行う

(6) リコンビナントPLAP-1タンパク質とBMP-2との分子間相互作用の解析

リコンビナント PLAP-1 タンパク質と BMP-2 との結合を共沈させ、免疫科学的手法を用いて分子レベルでの結合について検討を行う

4. 研究成果

(1) 培養歯根膜細胞を用いた PLAP-1 発現調節機構の解析

石灰化誘導培地にて長期培養したHPDLの石灰化度の上昇に伴ってPLAP-1遺伝子発現の上昇が認められた

(2) 各種サイトカイン刺激によるPLAP-1発現調節機構の解析

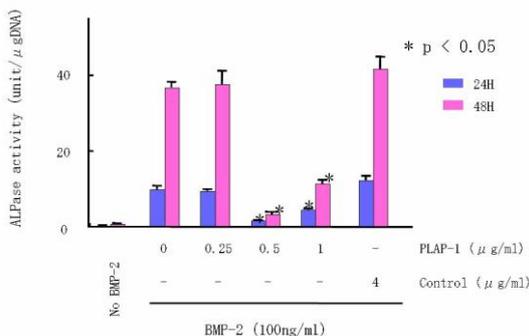
硬組織形成細胞への分化誘導能を持つサイトカインであるBMP-2刺激によりPLAP-1遺伝子発現の上昇が認められた。また、BMP-2刺激によりPLAP-1タンパク質の発現についても上昇が認められた

(3) *in vivo*におけるPLAP-1遺伝子発現の局在解析

4週齢マウスの上顎臼歯の組織切片を用いた *in situ*ハイブリダイゼーションにより、PLAP-1遺伝子は歯根膜組織に選択的に発現していることが示された

(4) リコンビナントPLAP-1タンパク質を用いたPLAP-1機能解析

大腸菌由来リコンビナントPLAP-1タンパク質を歯根膜細胞培養系に添加するとBMP-2誘導性の細胞分化を抑制することが明らかとなった。(図1)



(図1) リコンビナントPLAP-1添加による細胞分化抑制

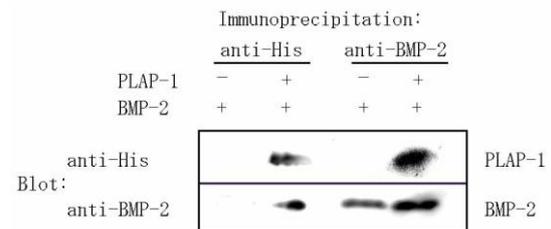
(5) 歯根膜特異的分子PLAP-1のGain of Function及びLoss of Functionによる機能解析

PLAP-1遺伝子をマウス歯根膜細胞(MPDL22)に強制的に発現させ、その分化過程に及ぼす影響についてアルカリフォスファターゼ活性及びアリザリン染色法により硬組織形成能に対する評価を行ったところ、MPDL22の硬組織

形成を抑制した。一方で、RNAiを用いてPLAP-1遺伝子発現を抑制し同様にその分化過程に及ぼす影響についてアルカリフォスファターゼ活性及びアリザリン染色法により硬組織形成能に対する評価を行ったところ、MPDL22の硬組織形成を促進した

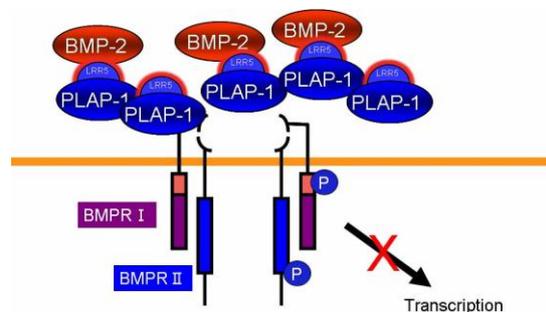
(6) リコンビナントPLAP-1タンパク質とBMP-2との分子間相互作用の解析

リコンビナント PLAP-1 タンパク質と BMP-2 との結合を共沈させ、免疫科学的手法を用いて分子レベルでの結合について検討を行ったところ、リコンビナント PLAP-1 タンパク質と BMP-2 との結合が認められた。(図2)



(図2) リコンビナント PLAP-1 タンパク質と BMP-2 との結合

今回の結果から PLAP-1 は、歯根膜細胞の硬組織形成分化を抑制的に制御していること、また、その機能は硬組織形成誘導能を持つサイトカインである BMP-2 との分子間相互作用が関係していることが強く示唆された。すなわち、PLAP-1 は生体内において重要かつユニークな組織である歯根膜組織を特徴付ける高い石灰化能を有しながらも、線維性の結合組織として存在するための恒常性の維持に非常に重要な役割を担っているといえる。さらに、PLAP-1 が BMP-2 との結合を介した歯周組織の硬組織形成能に関わる働きにも関与していることの詳細を今後検討していくことにより、同分子を歯周組織の再生療法に応用した、新規の歯周病治療法の開発に有用な知見を提供できると考えられる。



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1件)

(1) Tomoeda M, Yamada S, Shirai S, Ozawa Y, Yanagita M, Murakami S. PLAP-1/asperin inhibits activation of BMP receptor via its leucine rich repeat motif. Biochem. Biophys. Res. Commun. 371(2), 191-6, 2008. 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

(1)友枝美樹、山田聡、小澤康宏、米田晋也、藤原千春、田内拓史、村上伸也・歯根膜特異的分子PLAP-1におけるBMP-2との結合部位の探索・日本歯周病学会・2007年5月19日・横須賀

(2)Satoru Yamada, Miki Tomoeda, Yasuhiro Ozawa, Tetsuhiro Kajikawa and Shinya Murakami ・ PLAP-1/Asporin Antagonizes BMP-2 function through LRR-5 ・ International Association of Dental Research (IADR) 86th general session ・ 2008年7月3日・Toronto, Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 康宏 (OZAWA YASUHIRO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：30448146

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：