

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20390530

研究課題名 (和文) ポストゲノム科学に基づく予測歯周組織再生医学の基盤構築

研究課題名 (英文) Molecular basis of predictable periodontal regeneration

研究代表者

村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70239490

研究成果の概要 (和文) : ビーグル犬のモデルを用いた FGF-2 誘導性の歯周組織再生過程におけるトランスクリプトーム解析により *PLXNC1*, *SMOC1*, *SMOC2*, *TNS3*, *NPNT*, *SPON1*, *WDHD1* 等の遺伝子が未分化間葉系幹細胞の硬組織形成細胞への分化過程に関与している可能性が明らかとなった。さらに、歯根膜特異的遺伝子である *Periostin*, *PLAP-1* において、歯根膜特異的 isoform およびアスパラギン酸配列数多型の存在がそれぞれ明らかとなり、これらの isoform および各型間で、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御する能力において差異が存在することが明らかとなった。上記の遺伝子群は歯周組織再生の結果を予測する上で重要な役割を演じる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Transcriptome analysis of FGF-2-induced periodontal regeneration in beagle model revealed that several genes (*PLXNC1*, *SMOC1*, *SMOC2*, *TNS3*, *NPNT*, *SPON1*, *WDHD1*, etc.) can play important roles in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. In addition, periodontal ligament specific splicing isoform of Periostin was found. On the other hand, PLAP-1, periodontal ligament specific molecule, has an asparagine acid repeat polymorphism. Importantly, these molecular differences affected their abilities to regulate differentiation of periodontal ligament cells. These results suggest that these genes may play important roles in predicting outcomes of regenerative therapy for periodontal tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：歯周病、歯周組織再生、ポストゲノム、トランスクリプトーム、FGF-2

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトに基づきヒト全ゲノム配列が完全解読され、時代はポストゲノム時代に突入した。そして今、歯周病学の分野においても、「歯周組織の恒常性維持の

機構」、「歯周病の発症・進行過程」、「歯周病に対する疾患感受性」に対する理解を高めるために、網羅的解析により得られた膨大な生命情報を活用することが強く求められている。この時代の要請に応えるため、我々の研

研究室では、1990年代後半より歯根膜組織の遺伝子発現プロファイル解析を開始し、新規歯根膜特異的遺伝子 PLAP-1 を発見することに成功した (Yamada *et al.* 2001, *Gene*, 275: 279)。そして今や、PLAP-1 は Periostin にならぶ歯根膜特異的マーカーの一つとして、国際的な認知を受けるに至っている。加えて、我々の研究室では歯学研究者にとって最も貴重なデータベースの一つとなり得る約 20,000 個の完全長 cDNA からなるヒト歯根膜組織完全長 cDNA データベース (Ful-PerioGen) を構築し、歯根膜組織に特異的に発現し、同組織由来細胞の硬組織形成細胞への分化過程に密接に関連する遺伝子の同定と機能解析に既に着手している。この Ful-PerioGen データベースは、歯周病および歯周組織再生分野におけるバイオインフォマティクス研究の基盤情報となり得るものである。

一方、新規歯周組織再生療法開発の現状に目を転じると、BMP-2、BMP-7、BDNF、TGF- β 等の各種ヒト型リコンビナントサイトカインを応用した新規歯周組織再生療法 (サイトカイン療法) の樹立に向けた研究が国内・外で推進されている。2007 年には米国において PDGF 製剤が製造承認を受け、日本国内においては、我々の研究室を中心に検討を進めている FGF-2 を用いた歯周組織再生試験が推進されている。このような背景から、近未来には生物製剤を用いた複数の新規歯周組織再生療法が誕生するものと期待が高まっている。そのような状況下で期待されるのは、如何なる再生療法をどのような遺伝的背景を有する歯周病患者に適応すべきかを“予測”出来ることである。そのためには、歯周組織再生過程のイベントを分子レベルで同定し、その情報を包括的に再構築するための基盤情報を整備しておくことが必須となる。

2. 研究の目的

本研究課題では、歯周組織再生過程で惹起されるイベントを、時系列的かつ網羅的に解析することにより、歯周組織再生に関連する局所生体情報を取得する。そしてその情報をもとに、歯周組織再生に密接関わりと考えられる歯周組織に特徴的な分子群を抽出する。さらにその中から、いくつかの分子に焦点を当て、同分子の発現調節機構、遺伝子多型等の有無、および機能解析等を行う。そして、このようにして得られる分子基盤情報を、歯周組織再生療法の予後の予測に活用できるよう整備することを目指す。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* 歯周組織再生過程におけるトランスクリプトーム解析

ビーグル犬 6 頭を用いて、ネンブータル全

身麻酔下にて下顎左右第 4 前臼歯を抜歯し、抜歯窩の治癒期間を経た後、第 1 後臼歯の近心に人工的 3 壁性歯周組織欠損を作製した。作製した左右の欠損のうち、一側に 3% ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を基剤とした FGF-2 含有歯周組織再生誘導薬を投与し実験側とする一方で、反対側には HPC のみを投与し対照側とした。FGF-2 の濃度は、これまでの前臨床研究およびヒト臨床試験において有意な歯周組織再生が誘導されることが確認されている 0.3% とした。投与 3、7、14 日後に、欠損作製部位から組織を採取、全 RNA を抽出した後、GeneChip® Canine Genome Array (Affymetrix 社) を用いて、歯周組織再生過程における遺伝子発現を網羅的に解析した。解析にはバイオインフォマティクス解析ソフトである GeneSpringGX® (Agilent Technologies 社) を用いた。

(2) 硬組織形成細胞への分化過程における遺伝子発現解析

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC)、ヒト (HPDL) あるいはマウス歯根膜組織由来細胞 (MPDL) を 10mM β -glycerophosphate、50 μ g/ml アスコルビン酸ならびに 10% FBS を含有した DMEM 培地あるいは α -MEM 培地 (石灰化誘導培地、以下 C-Med) にて培養し、経時的に RNA を採取、抽出した個々の遺伝子について特異的プライマーを設計し、real-time PCR 法にて解析した。

(3) 免疫染色による Periostin の局在解析

6 週齢 C57BL/6 マウスの上顎組織を固定後、凍結薄切片を作製し、抗 Periostin 抗体と ABC 法、DAB による発色により検討した。

(4) 遺伝子導入による機能解析

Periostin 遺伝子の異なる 2 か所の配列をターゲットとした siRNA、歯根膜特異的 splicing isoform である Periostin type II の遺伝子、あるいは D13 (N 末端にアスパラギン酸が 13 回連続) 型 PLAP-1、D14 型 (同上 14 回連続) PLAP-1 遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、マウス歯根膜細胞株 MPDL22 に遺伝子導入を行った。

4. 研究成果

(1) ビーグル犬の歯周組織再生過程におけるトランスクリプトーム解析の結果、FGF-2 投与側における遺伝子発現が 3、7、14 日後のいずれかにおいて、対照側比 2 倍以上であった遺伝子 1751 個を抽出した。これらの遺伝子を K-means 法によりクラスター解析したところ、発現パターンの異なる 4 つのクラスターに分類された (図 1)。クラスター 1 は 7 日目にかけて発現が上昇し、その後下降に転じるパターンを示し、IL-1、IL-6、IL-8 などの炎症に関わる遺伝子や上皮に関連する遺伝子等を含む 414 個の遺伝子群で構成されて

いた。クラスター2は実験期間中、概ね減少を続けるパターンを示し、615個の遺伝子群で構成されていた。クラスター3は実験期間中、概ね発現が上昇を続けるパターンを示し、Alkaline Phosphatase (ALP) や Matrix Gla Protein (MGP) などを含む408個の遺伝子群で構成されていた。クラスター4は7日目に発現が減少し、その後上昇に転じるパターンを示し、314個の遺伝子で構成されており、その中には代謝に関する遺伝子が多く含まれていた。さらにGO term解析を行ったところ、クラスター1には炎症性制御に関連するGO termが、クラスター4にはタンパク質翻訳に関連するGTP結合タンパク質や翻訳促進に関連するGO termが有意に多く含まれていた。

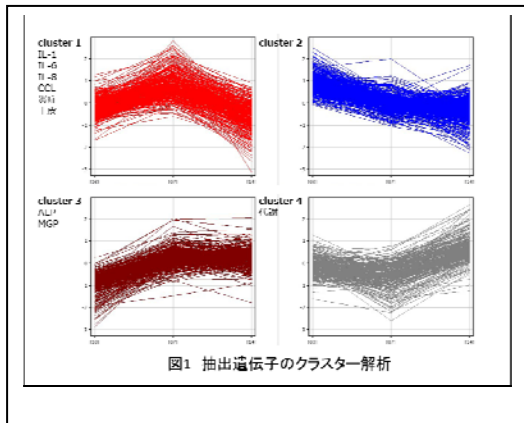


図1 抽出遺伝子のクラスター解析

(2) (1)にて抽出された遺伝子群1751個には、Uni Gene IDが付与されていない未知の遺伝子が265個含まれると共に、対照群と比較して高発現を示し、かつ歯根膜組織における機能が十分に検討されていない7個の遺伝子 (*PLXNC1*; plexin C1、*SMOC1*; SPARC related modular calcium binding 1、*SMOC2*; SPARC related modular calcium binding 2、*TNS3*; tensin 3、*NPNT*; nephronectin、*SPON1*; spondin 1、*WDHD1*; WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1)を見出した。次にこの7個の各遺伝子が、硬組織形成細胞への分化過程でどのような発現推移を示すのかについて、まずADSCを用いて解析した。その結果、図2に示すように7個全ての遺伝子がC-Medによる培養下でコントロールに比べ高い発現を示した。

またHPDLおよびMPDLをC-Medにて培養し、硬組織形成細胞への分化を誘導した際の、上記遺伝子群の発現について解析したところ、NPNT、PLXNC1の発現は、分化誘導初期に上昇し、その後減少に転じた。SPON1、TNS3はPLAP-1と同様のパターンで、発現が増加し続けた。

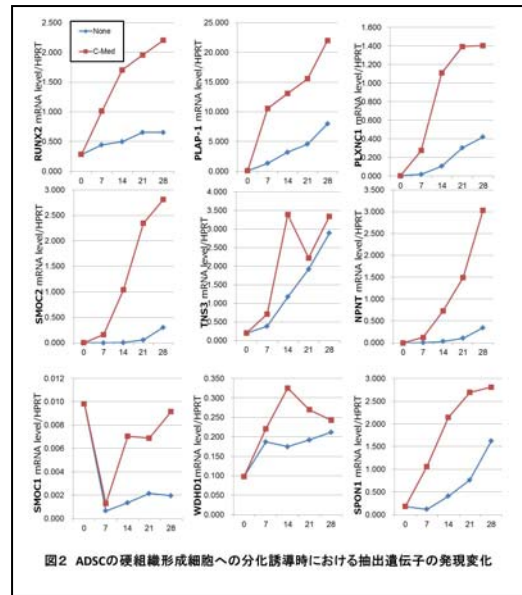


図2 ADSCの硬組織形成細胞への分化誘導時における抽出遺伝子の発現変化

(3) 我々の確立したヒト歯根膜組織の完全長cDNAライブラリー (Ful-PerioGen)において、恒常的に高発現(16427クローン中頻度208)を示す*Periostin*遺伝子に着目し、機能解析を行った。まず、*Periostin*タンパク質の発現が歯根膜組織特異的であることを、マウス顎骨の凍結薄切片を抗*Periostin*抗体を用いた免疫染色法にて確認した。次に、*in vitro*にてBMP-2、BMP-4、TGF- β 、IGF-1を用いてHPDLを刺激したところ、*Periostin*の発現上昇が認められた。

続いて*Periostin*が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化に与える影響を検討するために、siRNAによる*Periostin*発現抑制MPDLをC-Medにて培養し、ALPase活性を指標として解析した。その結果、*Periostin*の発現抑制株では、C-Med培養によるALPase活性の上昇が有意に抑制された。

一方で、我々は歯根膜特異的に発現するsplicing isoform (*Periostin Type II*)が存在することを見出した。同isoformを過剰発現したMPDLにおけるALPase活性はIntegrin $\alpha v \beta 3$ の中和抗体存在下で有意に抑制されたことから、*Periostin type II*はIntegrin $\alpha v \beta 3$ と結合することにより歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進することが明らかとなった。

(4) PLAP-1にはN末端のアスパラギン酸(D)の連続配列数が個人によって異なるという遺伝子多型が存在し、同遺伝子多型が変形性膝関節症の発症リスクに関係するという報告がなされている(Kizawa H et al. Nat Genet. 37:138, 2005)。そこで、MPDLへの遺伝子導入によりD13型、D14型PLAP-1の強発現株を作製したところ、D13型に比べてD14型PLAP-1のほうが、石灰化物形成やBMP-2誘導性ALP活性を有意に抑制することが明らかと

なった。

さらに、共免疫沈降解析により、D13 型に比べて D14 型 PLAP-1 はより強く BMP-2 と結合することが明らかとなった。

以上のことより、D14 型 PLAP-1 は BMP-2 と強く結合することで、BMP-2 誘導性の歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化をより強く抑制することが示された。

今回の研究により、歯周組織再生過程において *PLXNC1*、*SMOC1*、*SMOC2*、*TNS3*、*NPNT*、*SPOV1*、*WDHD1* 等の機能未知の遺伝子の発現が誘導され、これらの遺伝子が未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞・セメント芽細胞への分化過程に関連している可能性が示唆された。さらに、既に歯根膜特異的遺伝子としての解析が進められている *Periostin*、*PLAP-1* において、歯根膜特異的 isoform およびアスパラギン酸連続配列数多型の存在がそれぞれ明らかとなった。さらに、これらの分子間で、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御する能力において差異が存在することが明らかとなった。

今回明らかになった各種遺伝子の発現状況等の差異は、歯周組織再生療法の予後の差異として反映される可能性があり、今後の予測歯周組織再生医工学の確立に向けた分子基盤情報の一端が今回の研究成果として得られたものと考えられる。

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 11 件)

- ① S Murakami、Periodontal tissue regeneration by signalling molecule(s) - What role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy?、*Periodontology* 2000、査読有、56巻、2011、188-208
- ② J Zhao、Y Abiko、Transcriptome analysis of β -TCP implanted in dog mandible、*Bone*、査読有、48巻、2011、864-877
- ③ Y Shimabukuro、T Hashikawa、M Yanagita、S Yamada、S Murakami、Fibroblast growth factor-2 stimulates directed migration of periodontal ligament cells via PI3/Akt signaling and CD44/hyaluronan interaction、*Journal of Cellular Physiology*、査読有、226巻、2011、809-821
- ④ M Yanagita、S Yamada、S Murakami、Suppressive effects of nicotine on the cytodifferentiation of murine periodontal ligament cells、*Oral Diseases*、査読有、16巻、2010、812-817
- ⑤ J Anzai、S Murakami、Effects of concomitant use of fibroblast growth

factor (FGF)-2 with beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on the beagle dog 1-wall periodontal defect model、*Biochemical and Biophysical Research Communications*、査読有、403巻、2010、345-350

⑥ C Fujihara、S Yamada、S Murakami、Role of mechanical stress-induced glutamate signaling-associated molecules in cytodifferentiation of periodontal ligament cells、*The journal of biological chemistry*、査読有、285巻、2010、28286-28297

⑦ 村上伸也、細胞増殖因子 季刊・歯科医療、査読無、23巻、2009、24-28

⑧ 村上伸也、歯周組織再生療法の現状と将来展望、総合臨床、査読無、58巻、2009、130-135

⑨ RT. Kao、S. Murakami、The use of Biologic Mediators and Tissue Engineering in Dentistry、*Periodontology* 2000、査読有、50巻、2009、127-153

⑩ S Yamada、PLAP-1: periodontal ligament specific molecule、*J. Japanese Dental Science review*、査読有、44巻、2008、137-144

⑪ 村上伸也、歯周組織再生の現状と将来の展望 再生医学のいま -基礎研究から臨床への展開に向けて-、治療、査読無、90巻、2008、609-616

[学会発表] (計 21 件)

① 村上伸也、歯周治療の近未来 -その理論と臨床-、第 62 回近畿北陸地区歯科医学大会、平成 22 年 11 月 7 日、マイドームおおさか(大阪)

② Murakami S： Periodontal tissue regeneration by basic fibroblast growth factor (FGF-2)、第 12 回台湾歯周病学会、平成 22 年 10 月 16 日、高雄 (台湾)

③ Kajikawa T、Yamada S、Murakami S： Gene polymorphism in PLAP-1/asperin regulates mineralization of periodontal ligament cells. 88th International Association of Dental Research、July 16、2010、Barcelona (Spain)

④ Murakami S： Periodontal regeneration by FGF-2、Joint Symposium of University Leeds and Osaka University、July 5、2010、Leeds (UK)

⑤ 村上伸也、FGF-2 は歯周組織再生療法に变革をもたらすか 日本臨床歯周病学会第 28 回年次大会、平成 22 年 6 月 27 日、国立京都国際会館 (京都)

⑥ Murakami S： What role does FGF-2 have in periodontal regeneration? 2010 年韓国歯周病学会春季学術大会、平成 22 年 5 月 29 日、ソウル (韓国)

⑦田内拓史、山田 聡、村上伸也、新規歯根膜特異的 Periostin アイソフォーム Type II の機能解析、第 53 回日本歯周病学会春季学術大会、平成 22 年 5 月 14 日、盛岡市民文化ホール（盛岡）

⑧梶川哲宏、山田 聡、村上伸也、ヒト PLAP-1 アスパラギン酸連続配列が歯根膜細胞の石灰化に及ぼす影響について、第 53 回日本歯周病学会春季学術大会、平成 22 年 5 月 14 日、盛岡市民文化ホール（盛岡）

⑨村上伸也、FGF-2 による歯周組織再生 - 現状と将来展望 -、第 8 回歯科骨粗鬆症研究会、平成 22 年 4 月 4 日、東京医科歯科大学歯学部 4 階 特別講堂（東京）

⑩村上伸也、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を用いた新規歯周組織再生療法の確立、第 27 回日本ヒト細胞学会学術集会、平成 21 年 8 月 22 日、東京慈恵会医科大学 大学 1 館（東京）

⑪ Murakami S: Periodontal tissue regeneration using FGF-2、中国牙周学会：Chinese Society of Periodontology、平成 21 年 8 月 20 日、南寧（中国）

⑫村上伸也、歯周組織再生療法の現状と未来、第 27 回日本骨代謝学会学術集会、平成 21 年 7 月 23 日、大阪国際会議場（大阪）

⑬ Tauchi T、Yamada S、Murakami S: Characterization of a novel isoform of Periostin isolated from human periodontal ligament、第 9 回 国際炎症学会 (The 9th World Congress on Inflammation)、平成 21 年 7 月 8 日、京王プラザホテル（東京）

⑭村上伸也、歯周組織再生療法の近未来を展望する、第 47 回日本小児歯科学会大会、平成 21 年 5 月 15 日、大阪大学コンベンションセンター（大阪）

⑮村上伸也、歯周組織再生療法の未来予測、第 8 回日本再生医療学会総会、平成 21 年 3 月 5 日、東京国際フォーラム（東京）

⑯村上伸也、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を用いた新規歯周組織再生療法、第 28 回日本口腔インプラント学会近畿北陸支部学術大会、平成 21 年 1 月 25 日、千里ライフサイエンスセンター（大阪）

⑰ Murakami S: Periodontal tissue regeneration by basic fibroblast growth factor (FGF-2)、国際歯科研究学会 (IADR) 韓国部会 (KADR) 学術大会、平成 20 年 12 月 1 日、ソウル（韓国）

⑱田内拓司、山田 聡、柳田 学、橋川智子、村上伸也、歯根膜特異的 Periostin アイソフォームは歯根膜細胞の硬組織形成分化を促進する、日本歯科保存学会 2008 年度秋季学術大会 (第 129 回)、平成 20 年 11 月 6 日、富山国際会議場（富山）

⑲村上伸也、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を用いた新規歯周組織再生療法の確

立に向けて、第 6 回日本再生歯科医学会学術大会、平成 20 年 9 月 12 日、日本歯科大学生命歯学部 九段ホール（東京）

⑳村上伸也、歯周組織再生療法の近未来を探索、第 29 回日本炎症・再生医学会、平成 20 年 7 月 9 日、都市センターホテル 第 1 会場コスモスホール（東京）

㉑ Yamada S、Murakami S: PLAP-1/asporin Antagonizes BMP-2 Function Through LRR-5. 86th General Session of the IADR、July 3、2008、Toronto (Canada)

〔図書〕（計 1 件）

①村上伸也、先端歯科医学のカッティングエッジ、大阪大学出版会、2008、57-66

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70239490

(2) 研究分担者

山田 聡 (YAMADA SATORU)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：40359849

橋川 智子 (HASHIKAWA TOMOKO)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：00362682
(H20～H22.2 まで研究分担者として参画)

柳田 学 (YANAGITA MANABU)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80379081

安孫子 宣充 (ABIKO YOSHIMITSU)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：70050086