

平成 22年 5月 17日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791339

研究課題名（和文）スポンディンによる歯周組織再生応用への検討

研究課題名（英文）

Study on the regeneration of periodontal tissue by F-spondin

研究代表者

北川 雅恵 (KITAGAWA MASAE)

広島大学・病院・助教

研究者番号：10403627

研究成果の概要（和文）：

本研究では、F-spondin によるセメント芽細胞の石灰化のメカニズムを明らかにし、F-spondin をターゲットとした歯周組織再生の可能性を検討するために、合成ペプチドおよび F-spondin siRNA、F-spondin 強発現株を用いて実験を行なった。合成ペプチドは、ヒト歯周靭帯線維芽細胞のタイプ I コラーゲンおよび ALP の mRNA 発現を軽度増加させるものの、Runx2 や OCN の発現には変化を与えなかった。F-spondin siRNA を用いるとヒトセメント芽細胞の ALP、BSP mRNA の発現は減少し、石灰化物形成能も低下した。また、F-spondin 強発現株では BMP-7 の発現が高く、Smad1/5/8 のリン酸化が認められた。以上より、セメント芽細胞の石灰化において F-spondin は BMP-7 の活性化を介して石灰化遺伝子の発現を促進し、セメント芽細胞の石灰化に重要な役割を果たすことが明らかとなり、歯周組織再生に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we used with recombinant F-spondin, F-spondin siRNA and F-spondin overexpressed cells to clarify the mechanism and examine the possibility of a novel therapy for periodontal tissue regeneration targeting F-spondin. Recombinant F-spondin increased mRNA expression of type I collagen and ALP of human periodontal ligament cells, but Runx2 and OCN were unchanged. We found that knock-down of F-spondin mRNA led to decreased mRNA expression of ALP and BSP and mineralized nodule formation. Overexpression of F-spondin increased BMP-7 mRNA and protein and induced to phosphorylation of Smad1/5/8. Taken together, these results suggest that F-spondin may play a critical role in human cementoblast mineralization via BMP-7 activation and lead to regeneration of periodontal tissue by promoting of the cementoblast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：スポンディン、セメント芽細胞、歯周組織、再生

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、歯周組織構成細胞で、結合組織性新付着の形成に重要な役割を果たしているセメント質に注目し、セメント質の表層細胞からセメント質形成能の高いヒトセメント芽細胞様細胞株(HCEM)を樹立し (Bone, 2006)、セメント芽細胞に特異的な遺伝子 F-spondin を HCEM と歯周靭帯線維芽細胞 (HPL) に発現する遺伝子のプロファイリングにより明らかにした (BBRC, 2006)。F-spondin は floor plate に高発現し、神経細胞の接着や伸長を促進する遺伝子であることが既に報告されている (Klar et al., Cell, 1992) が、それまでに F-spondin が歯周組織で発現するという報告はなかった。よって、F-spondin の歯周組織における局在や役割を検討したところ、F-spondin が免疫組織学的にセメント芽細胞に特異的に発現し、セメント芽細胞の機能や制御に重要な役割を果たす可能性が示された。さらに、セメント芽細胞の progenitor cell であると考えられる HPL に F-spondin を遺伝子導入したところ、歯周靭帯細胞の石灰化関連遺伝子であるアルカリフォスファターゼ(ALP)やオステオカルシン(OCN)、骨シアロプロテイン(BSP)の発現が増強し、F-spondin がセメント芽細胞石灰化に影響を及ぼすことが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、F-spondin のセメント芽細胞の石灰化を促進に関わる詳細なメカニズムを明らかにし、F-spondin をターゲットとした歯周組織再生の可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) F-spondin合成ペプチドを用いた細胞分化に対する検討

F-spondin合成ペプチド(全長、市販)を用いてHPLの石灰化能をアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、アリザリンレッド-S染色、石灰化関連マーカー遺伝子の発現をRT-PCRにより検討した。

(2) F-spondin siRNA (siSPON1)によるHCEMの細胞分化に対する影響の検討

siSPON1を用いてHCEMのSPON1mRNA発現を抑制し、1と同様の方法で石灰化能に対する影響を検討した。

(3) Genetip解析によるF-spondin過剰発現HPL株(HPL-spondin)とHPLの遺伝子発現比較

HPL-spondinとHPLからRNAを抽出し、genetipにより遺伝子プロファイリングを行った。

(4) F-spondin過剰発現によるシグナル伝達機構の解明

3の結果より、HPL-spondin にのみ強く発現する遺伝子BMP-7が明らかとなったことから、F-spondin発現が関与するシグナル伝達機構をRT-PCRおよびwestern blotにより明らかにした。

4. 研究成果

(1) F-spondin合成ペプチドを用いた細胞分化に対する検討

F-spondinペプチドを用いてin vitroにおいてHPLの石灰化能への影響を検討したところ、F-spondin合成ペプチド添加によりRT-PCRで早期石灰化関連マーカーであるタイプIコラーゲン(COLI)やALPのmRNAの増加がみられたが、Runx2, オステオカルシン(OCN)といった石灰化の後期マーカーの発現増加は認められなかった。なお、ボーンシアロプロテイン(BSP)の発現は認められなかった。また、ALP活性や石灰化物形成もペプチド添加により変化はみられなかった(図1)。

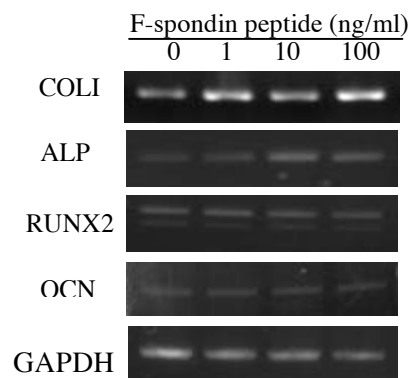


図1 F-spondin合成ペプチドによる石灰化関連マーカー遺伝子発現に対する影響

(2) siSPON1によるHCEMの細胞分化に対する影響の検討

F-spondinを発現するHCEMは石灰化関連マーカー遺伝子ALP, OCN, BSPを強く発現している。siRNAによりHCEMのF-spondinの発現をノックダウンすることにより、ALP、RUNX2およびBSPのmRNA発現を優位に抑制した。さらに、

石灰化物形成能も低下した (図2)。

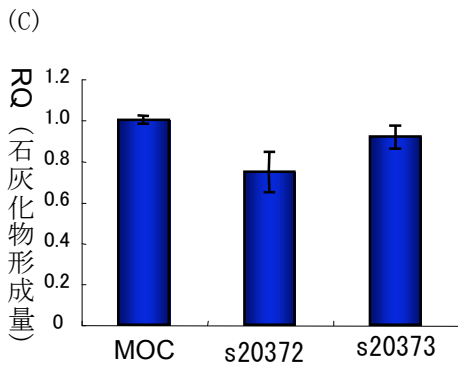
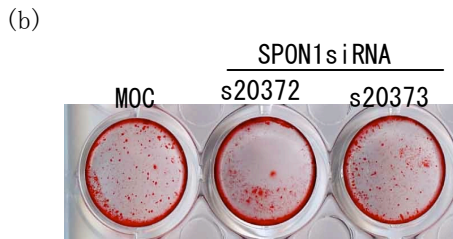
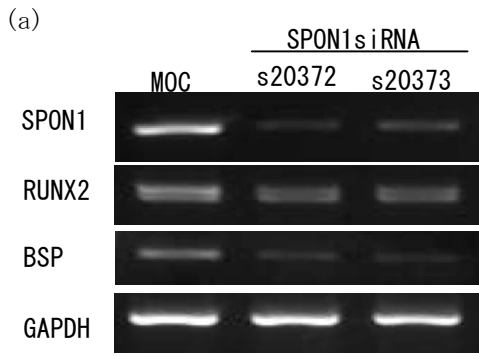


図2 SPON1siRNAによる石灰化関連遺伝子および石灰化物形成能に対する影響 s20372, s20373:siSPON1 (a)RT-PCR (b)アリザリンレッドS染色 (c)石灰化物形成量の相対定量

(3) Genetip解析によるHPL-spondinとHPLの遺伝子発現比較

Genetip 解析により HPL に比較して HPL-spondin ではBMP-7のmRNA 発現が有意に高いことが明らかとなった。そこで、BMP-7の発現をreal-time PCR およびwestern blot で比較したところ、いずれにおいてもHPL-spondinにおいてBMP-7の高い発現が認められた。また、HPL ではBMP-7の発現は認められなかった(図3)。

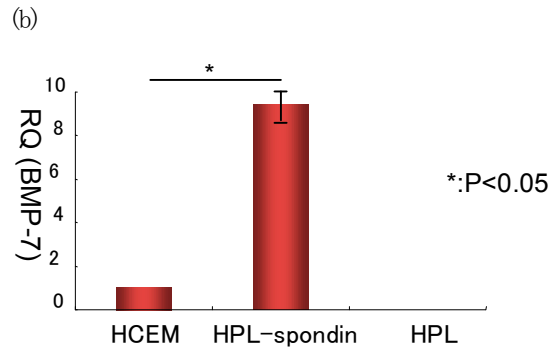
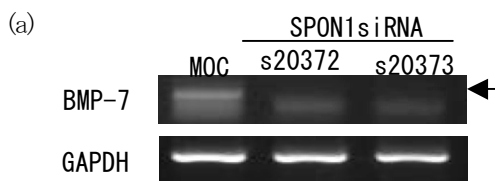


図3 F-spondin過剰発現によるBMP-7 mRNA発現に対する影響 (a)RT-PCR (b) real-time PCR

(4) F-spondin 過剰発現によるシグナル伝達機構の解明

BMP-7のシグナル伝達経路であるSmad1/5/8のリン酸化をHPLとHPL-spondinで比較したところ、HPL-spondinにおいてSmad1/5/8のリン酸化が認められた(図4)。

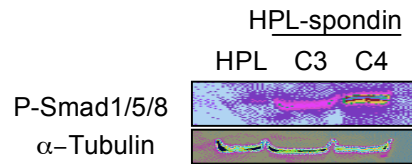


図4 F-spondin過剰発現によるSmad1/5/8のリン酸化

以上の結果より、セメント芽細胞の石灰化においてF-spondinはBMP-7の活性化を介して石灰化遺伝子の発現を促進し、セメント芽細胞の石灰化促進に重要な役割を果たすことが明らかとなった。よって、細胞内でF-spondin発現を誘導し、セメント芽細胞の分化を促進することによって、歯周組織再生に応用できる可能性が示された。

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1件)

①北川雅恵、SPON1によるヒトセメント芽細胞の細胞分化誘導メカニズムについての検討、日本歯周病学会雑誌、査読無、51巻秋季特別号、2009、98-98

〔学会発表〕(計1件)

① SPON1によるヒトセメント芽細胞の細胞分化誘導メカニズムについての検討 第52回日本歯周病学会秋季学術大会、北川雅恵、平成21年10月11日、宮崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 雅恵 (KITAGAWA MASAE)

広島大学・病院・助教

研究者番号：10403627

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：