

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21792119
 研究課題名（和文）ヒト歯根膜組織完全長 cDNA データベース解析による新規歯根膜特異的分子の探索
 研究課題名（英文）Analysis of novel periodontal ligament-specific molecules identified in human periodontal ligament full-length cDNA database.
 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（和文）：ヒト歯根膜組織完全長 cDNA データベース（Full-PerioGen）解析の結果、FLJ25143 および Cathepsin K は、歯根膜組織に高発現していることが明らかとなった。発現および機能解析の結果、FLJ25143 は、歯根膜細胞の増殖および硬組織形成分化を制御していることが示された。一方、Cathepsin K は、種々のサイトカインによりその発現が制御されていることが示された。同分子は、歯周組織の恒常性維持や歯周病によって破壊された歯周組織の再生や修復過程に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, I analyzed human periodontal ligament full-length cDNA library (Full-PerioGen database) and found several genes which were highly expressed in human periodontal ligament tissues. Among of these genes, I focused on FLJ25143 and Cathepsin K of which functions in periodontal ligament were not known. I found that FLJ25143 and Cathepsin K regulated periodontal ligament cell functions, suggesting involvement of these molecules in homeostasis, repair and regeneration of periodontium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・歯周外科学

キーワード：歯根膜組織完全長 cDNA ライブラリ

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、歯周組織の恒常性維持および歯周病によって破壊された歯周組織の修復・再生に中心的な役割を果たす最も重要な組織の一つであり、高い細胞分化能・硬組織形成能を有しながら生体内では石灰化することなく、軟組織として機能することにより歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担っている。

この歯根膜の組織特異性や特徴を分子・遺伝子レベルで解明することは、歯周病の病理・病態やその治療法を考える上で非常に重要な知見を与えるものと考えられる。これまでに我々の研究室では、ヒト歯根膜組織における網羅的遺伝子発現トランスクリプトーム研究を展開することにより、世界で初めて *in vivo* ヒト歯根膜組織の網羅的遺伝子発現プロファイル解析に成功し（Gene 275:279,

2001)、世界で唯一のヒト歯根膜解析用カスタマイズド DNA マイクロアレイの開発、さらには歯根膜恒常性維持に重要な新規遺伝子 PLAP-1 の発見 (J Dent Res. 85:447, 2006, J Biol Chem. 282:23070, 2007) など、世界に先駆けた研究成果を挙げ、歯根膜の組織特異性・機能性の分子基盤を解明してきた。一方、FGF-2 を用いた新規歯周組織再生療法の確立に向けた基礎的研究の結果、FGF-2 による歯周組織再生の分子メカニズムの詳細が明らかとなり、歯周組織再生には歯根膜細胞から産生される様々な細胞外基質タンパクによる微小環境構築が重要な役割を担っていることを明らかにしている (J Cell Physiol, 216:640-50, 2008)。さらに、歯根膜組織の完全長 cDNA プロジェクトを我国で初めて立ち上げ、ランダムに選ばれた約 20,000 個の完全長 cDNA の塩基配列を決定することによるヒト歯根膜組織完全長 cDNA データベース (Full-PerioGen) を構築している (平成 17 年度基盤研究 (B) 代表: 村上伸也「歯根膜トランスクリプトーム解析によるオーダーメイド歯周組織再生療法の新展開」課題番号 17390560)。加えて、申請者は、PLAP-1 が歯根膜特異的細胞外基質タンパク質として BMP-2 作用を抑制することにより、歯根膜組織恒常性を維持していることを明らかとしてきた (Biochem. Biophys. Res. Commun, 371:191-6, 2008、平成 19 年度若手研究 (B) 代表: 小澤康宏「ヒト歯根膜特異的分子 PLAP-1 の機能解析」課題番号 19791611)。そこで、本研究課題においては、上記 Full-PerioGen データベースを活用することにより、歯根膜組織において特異的に発現し、かつ、これまでに歯根膜における発現や機能についての報告が全くない遺伝子・分子群を単離するとともに、それらの機能を詳細に解析し、歯根膜の発生や恒常性維持および歯周組織再生に重要な役割を担う新規の歯根膜特異的分子群を解明することを着想した。

2. 研究の目的

我々が確立した 10,000 種以上の完全長遺伝子情報から成るヒト歯根膜組織完全長 cDNA データベース (Full-PerioGen) を活用し、「歯根膜の発生」、「恒常性維持」および「歯周組織再生」に重要な役割を担う歯根膜特異的分子を単離・同定および機能解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Full-PerioGen データベース解析による候補遺伝子・分子の選定

我々が確立した 10,000 種以上の完全長遺

伝子情報から成るヒト歯根膜組織完全長 cDNA データベース (Full-PerioGen) から発現頻度順に遺伝子を抽出し、さらに Gene Ontology 機能別分類フィルターをかけることにより、歯根膜で発現が高く、かつ歯根膜における発現や機能についての文献報告が全く無い遺伝子群を選び出した。

(2) 海外遺伝子発現データベースでのバイオインフォマティクス解析

(1) にて抽出した遺伝子群の他組織・細胞における発現を検討するため、海外の遺伝子発現データベース (NCBI, EMBL 等) へアクセスした。相同性解析・発現解析などバイオインフォマティクス手法によってデータベース上での歯根膜特異的発現・機能を検索することにより、実際の実験的解析対象とする新規の歯根膜特異的遺伝子・分子群の候補を選定した。

(3) 実際の組織・細胞における発現特異性解析

候補遺伝子発現検出用の特異的 RT-PCR プライマーを DNA 解析ソフトを利用して設計し、オリゴ合成により作製した。次に、ヒトの各組織から精製した全身組織 RNA アレイをテンプレートとして、候補遺伝子特異的 RT-PCR 法、Real-time RT-PCR 法により、候補遺伝子群の組織間での発現パターンを検討した。さらに、ヒトの各組織由来培養細胞 (歯根膜細胞、歯肉線維芽細胞、歯肉上皮細胞、歯髄細胞、骨芽細胞、皮膚線維芽細胞など) における遺伝子発現状況を解析した。

(4) 候補遺伝子の機能解析

歯根膜特異的遺伝子をタンパク発現ベクターに組み込み、強発現用ベクターを作製した。同ベクターをマウス歯根膜細胞株 (MPDL22) に遺伝子導入することでトランスフェクタントを樹立した。同トランスフェクタントを石灰化誘導培地にて培養することで、硬組織形成細胞への分化を誘導し、その際のアルカリフォスファターゼ活性を測定・解析した。

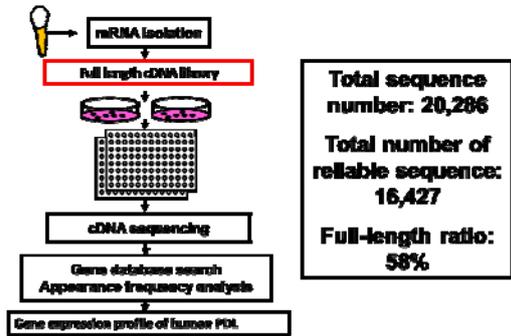
4. 研究成果

(1) Full-PerioGen データベース解析による候補遺伝子・分子の選定

我々が確立した 10,000 種以上の完全長遺伝子情報から成る Full-PerioGen データベース (図 1) から発現頻度順に遺伝子を抽出し、さらに Gene Ontology 機能別分類フィルターをかけることにより、発現頻度 30 以上の高発現遺伝子を 26 種見出した。その中から、歯根膜で発現が高く、かつ歯根膜における発現や機能についての文献報告が全く無い遺

伝子を 8 種類選定した。

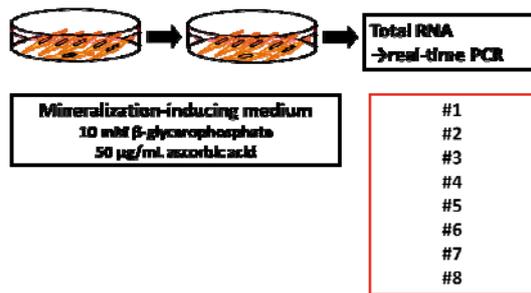
図1 Full-PerioGenデータベースの概要



(2) 実際の組織・細胞における発現特異性解析

上記にて選定した 8 種類の遺伝子について、培養ヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程における各遺伝子の発現解析を RT-PCR 法および Real-time PCR 法により行ったところ (図 2)、システインプロテアーゼの Cathepsin K (#4)、および機能未知の FLJ25143 (#8) が、ヒト歯根膜細胞の分化誘導時において発現が上昇する遺伝子であることが明らかとなった。さらに、ヒトの各組織から精製した全身組織 RNA アレイをテンプレートとして RT-PCR 法、Real-time RT-PCR 法により、組織間での発現パターンを検討したところ、FLJ25143 は、歯根膜、肺、脾臓、脳、胸腺での発現が認められた。さらに、培養歯根膜細胞において、その発現が認められた。一方、Cathepsin K の発現解析を行ったところ、歯根膜組織において非常に高い発現を示すことが明らかとなった。

図2 培養歯根膜細胞の分化誘導実験

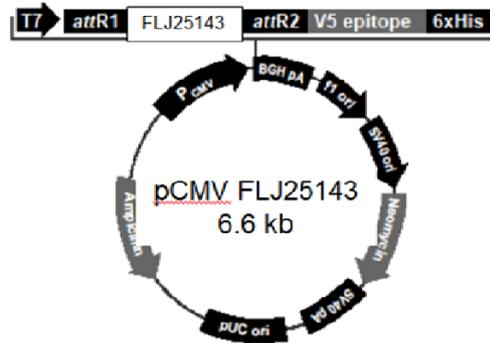


(3) FLJ25143 遺伝子のマウス歯根膜細胞における機能解析

FLJ25143 遺伝子発現ベクターを作製し、マウス歯根膜細胞に遺伝子導入し強発現させた (図 3)。同細胞株における細胞機能について解析したところ、強発現株においては細

胞の増殖を抑制し、また、石灰化誘導時においてアルカリフォスファターゼ活性を上昇させる一方、石灰化物形成は抑制した。

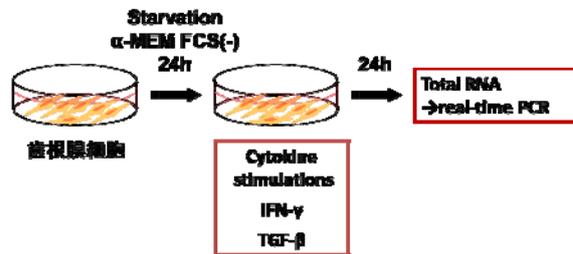
図3 FLJ25143発現ベクター構造



(4) サイトカイン刺激による Cathepsin K の発現誘導解析

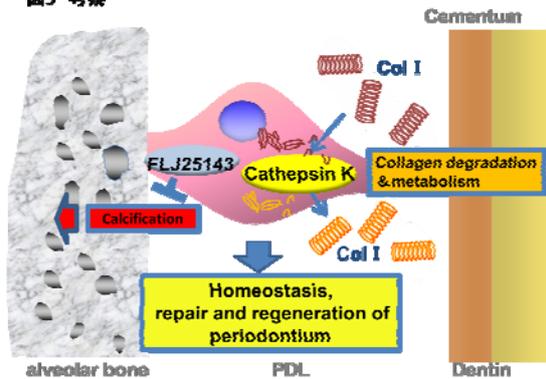
培養ヒト歯根膜細胞を各種サイトカインにて 48 時間刺激し、Real-time PCR 法にて Cathepsin K の発現解析を行ったところ (図 4)、IL-1 α 、IFN- γ 刺激にて発現上昇が誘導され、FGF-2、BMP-2、IGF-1 刺激にて発現の抑制が認められた。

図4 培養歯根膜細胞のサイトカイン刺激実験



Full-PerioGen データベース解析の結果、ヒト歯根膜組織において FLJ25143 および Cathepsin K の高発現が見出された。FLJ25143 は、歯根膜細胞の増殖および硬組織形成細胞分化過程を抑制すること、一方、Cathepsin K は、炎症性サイトカインによりその発現が誘導されることが明らかとなった。以上の結果から、生体内での機能を考察すると、FLJ25143 および Cathepsin K は、歯根膜細胞機能を制御することで、歯周組織の恒常性の維持、修復・再生に関与している可能性が示唆された (図 5)。

図5 考察



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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①尾崎亘弘、山田 聡、藤原千春、田内拓史、梶川哲宏、栗田敏仁、小澤康宏、村上伸也、ヒト歯根膜組織完全長 cDNA ライブラリーを用いた Cathepsin K の同定および機能解析、第 133 回日本歯科保存学会秋季大会、2010. 10. 28. 岐阜市

②N. OZAKI, S. YAMADA, C. FUJIHARA, T. TAUCHI, T. KAJIKAWA, T. AWATA, Y. OZAWA, S. MURAKAMI, Analysis of Cathepsin K in human periodontal ligament cells. 第 58 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR)、2010. 10. 19. 小倉市

③N. OZAKI, S. YAMADA, C. FUJIHARA, T. TAUCHI, T. KAJIKAWA, T. AWATA, Y. OZAWA, S. MURAKAMI, Cathepsin K expression in human periodontal ligament cells. 89th IADR, 2010. 3. 18. San Diego, USA.

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)研究協力者

藤原 千春 (FUJIHARA CHIHARU)

大阪大学・歯学部附属病院・専修歯科医

梶川 哲宏 (KAJIKAWA TETUHIRO)

大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生

尾崎 亘弘 (OZAKI NOBUHIRO)

大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生

栗田 敏仁 (AWATA TOSHIHITO)

大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生