

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890137

研究課題名（和文）歯根膜組織特異的ペリオスチンアイソフォームの機能解析

研究課題名（英文）Analysis of periostin isoform expressed uniquely in periodontal ligament tissue

研究代表者

前田 憲一郎 (Maeda Kenichiro)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90552068

研究成果の概要（和文）：我々が歯根膜組織から同定した歯根膜特異的 periostin isoform (PDL-POSTIN)と full length の periostin (FULL-POSTIN)タンパク精製をアデノウイルスを用いて行い、非常に純度の高い periostin タンパクが回収できた。精製したこの二つのタンパクを解析した結果、PDL-POSTIN は FULL-POSTIN よりも Integrin  $\alpha\beta3$  に対して強い結合能を持つことが示された。これらのことより、PDL-POSTIN が歯根膜組織の恒常性維持や組織再生において重要な役割を果すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We were able to collect very high purity both periostin isoform uniquely expressed in periodontal ligament (PDL-POSTIN) and full length periostin proteins (FULL-POSTIN) with adenovirus infection. Using these both purified proteins, we have found that affinity to Integrin  $\alpha\beta3$  of PDL-POSTIN is higher than that of FULL-POSTIN. These results suggest that PDL-POSTIN may have an important role in homeostatic mechanism and regeneration of periodontal tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,020,000	306,000	1,326,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,970,000	591,000	2,561,000

研究分野：歯周治療学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系学

キーワード：歯根膜組織 ペリオスチン

## 1. 研究開始当初の背景

歯根膜組織はセメント質と歯槽骨の二つの硬組織の間に存在するコラーゲンに富む非石灰化の線維性結合組織で、歯を歯槽窩に保持し、咬合時の感覚受容器としても機能している。さらに歯根膜組織は咬合力や矯正力というメカニカルストレスに反応し歯槽骨とセメント質、または周囲の結合組織のリモデリングを100~250  $\mu\text{m}$  の幅を保ちながら行い、歯周組

織の恒常性維持の重要な役割を担っている。また歯周組織の再生過程においては、組織幹細胞の供給源としてその存在は欠かせないものと認識されている。

これまでに申請者の所属する研究室では、歯根膜組織で発現している遺伝子の発現プロファイルを解析し、歯根膜組織中に特異的に発現している新規細胞外基質 periodontal ligament associate protein-1 (PLAP-1) を

新規に同定すると同時に、高頻度にかつ特異的に Periostin 遺伝子が発現していることを見出している (Yamada 2001 Gene.)。Periostin は約 90kd の分泌タンパクで、接着に関係する昆虫由来のタンパク Fasciclin 1 と相同性が高く、哺乳類では骨膜と歯根膜で発現が高く、TGF- $\beta$  により発現が上昇することが報告されている (Horiuchi 1999 J Bone Miner Res.)。さらに Periostin ノックアウトマウスの解析により、このマウスが歯根膜組織において歯周病様病態を示すとともに切歯のエナメル質形成不全を示す一方、この表現系がメカニカルストレスを軽減する事により減少する事から、Periostin が歯周組織におけるメカニカルストレスのコントロールに重要な役割がある事が示唆されている (Rios 1999 J. Mol Cell Biol.)。またマウスにおいて Periostin の c' 末端部における isoform, PLF が同定され、PLF が骨芽細胞の分化と増殖を促すことにより骨形成を促進する事が報告されている (Zhu 2009 J Cell Physiol.) さらに卵巣上皮がん細胞を用いた研究から、Periostin は卵巣上皮がん細胞より分泌され、Integrin  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$  依存的に同がん細胞の付着を支持し、また fibronectin よりも細胞の遊走を促進する事が示されている (Gillan 2002 Cancer Res.)。興味深い事に申請者は歯根膜組織特異的カスタマイズド DNA マイクロアレイ (PerioGenChip) を用いた解析により、歯根膜細胞の硬組織形成誘導時に Periostin 遺伝子の発現の上昇が認められる事を同定し、さらに c' 末端部位の isoform の解析によりヒト歯根膜細胞特異的 isoform, PDL-POSTN を同定した。既に報告されている PLF は c' 末端部のスプライシング領域 (a-b-c-c' -d-e-f) でのスプライシングが a-b-c-d-f であることが同定されているが、我々が同定した PDL-POSTN は同部位が a-c' -d-f であった。そしてこの PDL-POSTN の発現頻度がヒト歯根膜細胞では高い事が認められ、一方で PLF と同じパターンの isoform は認められなかった。現在では、細胞外基質が単なる組織の足場であるだけでなく、サイトカインを結合することによりその効力の維持・増強に務めたり、細胞外基質自体がリガンドとして様々な細胞の増殖、分化を制御することにより、炎症や組織再生時に多様な生物活性を発現する事が示唆されている。

そこで我々は歯根膜組織において特異的に高発現している Periostin に注目し、とりわけヒト歯根膜細胞特異的な PDL-POSTN に焦点を当て、同タンパクが歯根膜組織の炎症や再生時にいかなる機能を担うのかについて検討する事を着想した。歯周組織の恒常性維持、また歯周病によって失われた歯周組織の修復、再生の過程において、歯根膜細胞が産生する細胞外基質は、極めて重要な役割を果たす事が

知られている。これら細胞外基質の中にはコラーゲンのように ubiquitous に発現するものもあれば、歯根膜組織において preferential に発現される物も含まれる。Periostin は歯根膜組織において特徴的に発現する細胞外基質の一つで、歯周組織の恒常性の維持において重要な役割を示す事が示唆されているが、そのメカニズムについては未だ十分に解明されていない。

Periostin には c' 末端部における複数の isoform が存在する事が報告され、骨組織においては Periostin-Like-Factor (PLF) という特定の Periostin isoform が骨代謝に関与している可能性が示唆されている。興味深い事に申請者が所属する研究室においては、歯根膜組織特異的 isoform (PDL-POSTN) の同定に成功している。そこで本研究では PDL-POSTN の機能とその歯周組織における役割を解明する事を目的にしている。

## 2. 研究の目的

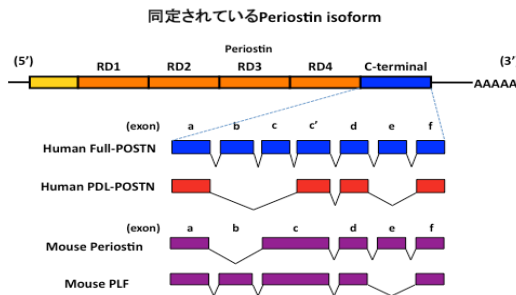
PDL-POSTN はヒト歯根膜細胞において発現が高い Periostin の中でも発現の高い isoform であることから、歯根膜組織において特徴的な役割を果たしていると考えられる。そこで PDL-POSTN の歯根膜細胞の増殖、硬組織形成細胞への分化の過程においていかなる細胞機能を制御しているのか、さらに歯根膜組織リモデリングあるいは再生時に細胞の誘導、接着などいかなる役割を担うのかについて検討する。さらに細胞内シグナル伝達の観点からも解析を行う。

歯周組織における Periostin に関する研究は、欠失により歯根膜組織の恒常性が失われる事が報告されているが、歯根膜組織特異的 PDL-POSTN についての報告は皆無である。マウスにおいて Periostin の isoform である PLF が骨芽細胞の増殖と分化を促進することは知られているが、同じスプライシングパターンの Periostin はヒト歯根膜細胞からは検出されなかった事からも、この PDL-POSTN が歯根膜組織において重要な役割を担っている事が示唆され、その役割の解明は歯周組織の恒常性の維持、歯周病を含む歯周組織の疾患の病態解明や、歯槽骨、セメント質、歯根膜組織の揃った完全なる新規歯周組織再生療法の確立につながる情報が得られると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 各 Periostin isoform タンパクの精製  
申請者が作製したスプライシングによる欠損を持たない Periostin, FULL-POSTN と歯根膜特異的 Periostin, PDL-POSTN 発現ベクターを 293 細胞にトランスフェクションを行い、培養後、培養上清を回収する。また

は申請者らが作製したFULL-POSTN、PDL-POSTN発現アデノウイルスをNIH-3T3細胞にインフェクションを行い、培養後、培養上清を回収する。これらの細胞の培養には現有のクリーンベンチ、CO2インキュベーター、遠心機などを用いる。また申請者らはアデノウイルスを扱う事が可能なP2領域を保有している。申請者らが保有するPeriostin発現ベクターおよびアデノウイルスが作成するタンパクはFLAGが付与されているため、回収した培養上清はFLAGゲルを詰めたカラムを利用し、タンパクの精製を行う。



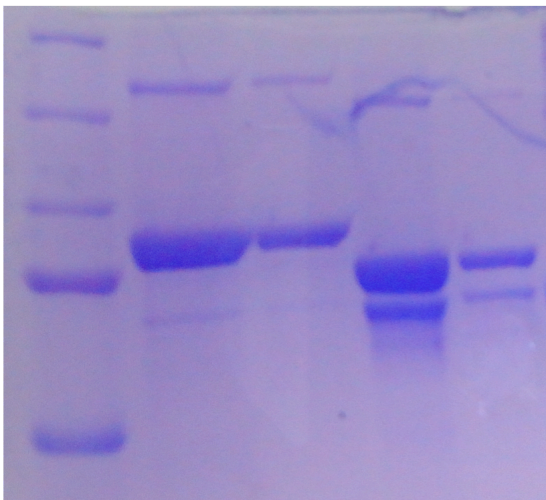
## (2) 歯根膜特異的

Periostin isoform (PDL-POSTN)の機能解析

Integrin avb3 に対して FULL-POSTN と PDL-POSTN の間で結合能力に違いがあると仮定して実験を行った。FULL-POSTN および PDL-POSTN を発現するアデノウイルスをインフェクションした細胞の上清に Integrin avb3 を加え混合しインキュベートした後回収し、抗 FLAG ビーズにて IP を行い、抗 Integrin avb3 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 各Periostin isoformタンパクの精製



FULL-POSTN、PDL-POSTN 共に非常に純度の高い十分量の精製タンパクが回収された。上写

真に示す (左から Molecular weight marker, FULL-POSTN, FULL-POSTN, PDL-POSTN, PDL-POSTN)。

## (2) 歯根膜特異的 periostin isoform (PDL-POSTN)の機能解析

PDL-POSTN は FULL-POSTN よりも Integrin avb3 に対して強い結合能を持つことが示された。

これらの成果ははじめて歯根膜組織特異的 Periostin isoform (PDL-POSTN)を高純度で精製を行い、機能解析を行ったものである。Periostin isoform はその c' 末端のスプライシングにより機能が異なることが報告されている。しかし内在性に存在する異なる isoform があるため、in vivo や培養細胞を用いる個々の isoform の機能解析はその評価が非常に難しいと考えられる。しかし我々が行っている方法は純粋な一種類の Periostin isoform タンパクの機能を評価できるので非常に有用な方法であると考えられる。

今後我々は精製したタンパクを用い細胞接着アッセイ、細胞増殖アッセイ、Wound healing assayを行いPDL-POSTIN のさらなる機能解析を行う。そして細胞接着に関するシグナル分子に関してウエスタンブロット法を用いて解析を進めていく予定である。

さらにマウス頭骸骨に規定の骨欠損を作成し、その欠損部の治癒状態を観察する事で骨形成能の解析 を行える事が知られている。この方法を用いて、wild-type マウスの頭骸骨に骨欠損を作成し、骨欠損部に上記にて作成した各精製 Periostin isoform の塗布を行い、それぞれの骨欠損の治癒の様式、速度について比較、解析を行う。また我々は PDL-POSTN トランスジェニックマウスを保有しており同様の手技にてコントロールマウスでの治癒様式、速度について比較、解析を行う。

ついでPDL-POSTNトランジェニックマウスを用い、そこから歯根膜細胞の単離を行う。単離された歯根膜細胞を用い、細胞の形態学的、および接着、増殖、分化および移動などの機能的 解析を行う。またシグナルカスケードの活性化状態についてウエスタンブロット法を用いて解析を行う。

## 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 1 件)

田内 拓史、前田 憲一郎

新規歯根膜特異的 Periostin アイソフォーム Type II の機能解析

日本歯周病学会平成 22 年度第 53 回春季学術大会、平成 22 年 5 月 14 日、盛岡市民

文化ホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 憲一郎 (MAEDA KENICHIRO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90552068