

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890047

研究課題名（和文）

歯周靭帯リモデリング機構における Tenomodulin の役割の解明

研究課題名（英文）

Tenomodulin expresses during development of periodontal ligament and enhance cellular adhesion.

研究代表者

小宮山 雄介 (KOMIYAMA YUSUKE)

(東京大学医学部附属病院・特認臨床医)

研究者番号：90586471

研究成果の概要（和文）：

Tenomodulin の発現および機能を解析するために Tnmd 特異抗体を作製した。この抗体を用いて、マウス臼歯の歯周靭帯での発現を解析したところ、歯周靭帯の形成開始時期移行に発現が起こることがわかった。Tnmd の発現は同時期にすでに萌出しており、歯周靭帯が形成されている切歯においても確認された。また、Tnmd の機能として細胞接着を増強する効果があることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Objectives: This study aimed to investigate the expression of tenomodulin (Tnmd) during murine tooth eruption and explore its biological function in vitro.

Methods: Specific antibodies against murine Tnmd were established. Expression of Tnmd during the three eruption phases (pre-eruptive, eruptive or post-eruptive phase) of murine molars was determined by immunohistochemistry in wild type (WT) or Tnmd knockout (KO) mice specimens. To determine roles of Tnmd in cell adhesion, cell adhesion assay was performed in NIH3T3 cells transfected with Tnmd or its extracellular domain deletion mutants.

Results: The specificity of the Tnmd-antibody was confirmed by immunohistochemistry of WT or Tnmd KO mice tail tendons. This antibody revealed the expression of Tnmd in periodontal ligament; the Tnmd expression was increased at eruptive phase and sustained after eruption. Given that dental attrition was observed in eruptive and post-eruptive phases, teeth were likely exposed to occlusal forces at these time points. Functional analyses in vitro revealed that Tnmd overexpression resulted in enhancement of cell adhesion in NIH3T3 cells. The enhancement was confirmed in fibroblasts derived from WT or Tnmd KO mice. Deletion of cleavage site or BRICHOS domain diminished cell adhesion, whereas deletion of C-terminal domain (CTD) retained the positive effect on cell adhesion. The result suggests that BRICHOS domain, but not CTD, is responsible for the Tnmd-mediated enhancement of cell adhesion.

Conclusion: Expression of Tnmd was correlated with the time of eruption when occlusal force was transferred to teeth and surrounding tissues. This observation suggests that the regulation of Tnmd expression may be controlled partially by mechanical forces in dense connective tissues. In addition, Tnmd is likely to have positive effects on cell adhesion. Further analyses will reveal the regulation of Tnmd expression and its function in more detail.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010	1,200,000	360,000	1,560,000
2011	1,090,000	327,000	1,417,000
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：(1) 歯周靭帯 (2) Tenomodulin (3) リモデリング (4) 細胞高次機能 (5) 再生医学 (6) 歯科矯正学 (7) 細胞接着 (8) 細胞形態

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療において重要な問題のひとつである「矯正治療後の後戻り」を解決するために、歯の生理的・人為的移動に伴って起こる歯周組織リモデリング時に活性化している可能性のある Tenomodulin の機能解析を行うことを目的とした。

歯科矯正学は歯科の歴史の中でも比較的新しい分野であるが、先人の多大なる努力により飛躍的な進歩を遂げ、歯科医学には欠かせない分野として発展し現在に至っている。この発展は不正咬合、顎変形症、口唇口蓋裂などを抱えた多くの患者にとって福音となり、歯科矯正学の果たす役割・社会への貢献度は日々拡大している。しかしながら、現在でも未解決の課題が残っており、特にわれわれが解決すべき重要な課題のひとつとして矯正治療後の後戻りが挙げられる。

矯正力と歯周組織リモデリングの概念

歯の移動時には矯正力というメカニカルストレスにตอบสนองし、歯槽内においては圧迫側と牽引側が生じてそれぞれ異なる制御によりリモデリングがなされる。また歯肉、歯槽骨、セメント質とそれらを連結する歯周靭帯の4つの歯周組織のリモデリングが連動し行われると考えられる。

歯周組織リモデリングのメカニズムは複雑な構造のために解析は容易ではなく、組織リモデリグマーカー分子の発現の違いがいくつか観察されるに留まる。また、後戻りは歯周靭帯の歯間繊維群のリモデリングが十分に行われない結果、歯の移動により生じた応力を解消できないことに原因があると予想される。このように矯正力による歯周組織リモデリングは矯正治療の根幹をなす生命現象であるものの、その分子メカニズムはまだ十分に解明されていない。特に、歯周靭帯は個々の歯周組織を連結し、矯正力を伝達する組織であることから、そのリモデリング制御機構を解明すべく組織特異的マーカー分子が同定されているが、依然として決定的な成果は上がっていない。

Tenomodulin (Tnmd) の発現組織とリモデリングへの関与

近年同定された Tnmd は腱組織や靭帯、真皮

などの密な結合組織中にその発現が認められる I 型膜貫通タンパク質であり、体節の発生時に sclerotome 発生に必要な転写因子である Scleraxis (Scx) に続いて腱・靭帯発生の後期に発現するマーカー分子として認識されている (Dev. Biol 298(1):234-47, 2006)。その機能はノックアウトマウスを通して解析されつつあり、線維芽細胞の増殖、腱・靭帯等の強固な結合組織の形成に関係すると考えられる (Mol Cell Biol 25(2):699-705, 2005)。さらに、直接的ないし間接的にコラーゲン線維束形成に関わる可能性が示唆されている (Proc Natl Acad Sci U S A. 105(1):388-93, 2008)。一連の報告は Tnmd の存在が腱・靭帯をはじめとする密性線維性結合組織の形態を規定する役割を示唆している。

現在の研究状況と研究に至る経緯

歯周組織特異的マーカー探索の試みは歯科矯正学に限らず、歯周病学的にも着目され、Periostin をはじめいくつかの分子が歯周組織に特徴的に発現することが示されてきた。しかし、Tnmd に関しては、現在までにその歯周組織での発現は報告されていなかった。こうした状況下でわれわれは歯周靭帯の特殊性と他の腱・靭帯組織との類似性に着目し発現解析を行い、歯周靭帯においても Tnmd が発現している事を初めて組織学的に確認した (未発表データ)。現在までに報告されてきた機能とわれわれの研究成果を総合すると、Tnmd が歯周組織リモデリングの分子メカニズムにおいて主要な役割を果たしている可能性がある。すなわち、萌出あるいは人為的な歯の移動に伴い Tnmd が活性化し組織リモデリングに貢献しているのではないかと考え、本研究に至った。

2. 研究の目的

歯周靭帯での発現・機能解析を矯正学的モデルで行う。以下の3点を目標とする。

1) Tnmd の歯周靭帯における発現の確認及び機能評価

2) 歯の萌出・移動評価モデルを用いた歯周組織リモデリングのメカニズム解明

3) 歯の移動後の後戻りに対する

Tnmd の関与について 1)、2)にて歯周組織リモデリングの分子メカニズムに対する知見

を組織学的、分子生物学的解析より明らかにする。現在までに野生型マウスと Tnmd ノックアウトマウスを用いた解析により成体において、歯の萌出後、歯周靭帯が機能し始める頃に歯周靭帯中の線維芽細胞に Tnmd が発現することを mRNA、タンパク質両方のレベルで確認できた。

この結果を発展させるために免疫染色により詳細な発現状況を検索し、分子生物学的な解析とともに機能に対する仮説を構築する。次に野生型マウス、ノックアウトマウスにて歯の萌出評価モデル、移動評価モデル等の矯正学的なモデルを作製し仮説の検証を行う。3) にて後戻りのモデル化を行い、組織学的観察と分子生物学的な制御の観察から歯の移動・後戻りのメカニズムを解明する。さらに、Tnmd が歯周組織リモデリングに貢献する場合には、ノックアウトマウスによる後戻りモデルへの遺伝子導入を行い後戻り防止効果を評価し、遺伝学的に機能を立証する事を目指す。

3. 研究の方法

1) Tenomodulin (Tnmd)の歯周靭帯における発現の確認及び機能評価

①□ Tnmd 発現解析

発現解析のために Tnmd 特異抗体の作製を試みる。Tnmd は C 末端ドメインが切断分泌される可能性があるため、機能的解析への発展性を含ませるために、その認識部位を潜在的な切断配列位置の前後に置いた設計でペプチド抗体を作製する。この抗体を用いて免疫染色を行い、Tenomodulin ノックアウト (Tnmd-/-) マウスをネガティブコントロールとして全身主要組織標本を作製し網羅的な発現解析を行なう。特に頭頸部における発現を重点的に行う。組織学的な発現解析に続き、細胞内での発現局在を解析するために蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行なう。免疫染色時に二つの異なる認識部位を持つ Tnmd 特異抗体を利用し、細胞内小器官のマーカー抗体と多重免疫染色することで Tnmd の局在を明らかにする。

② Tnmd 機能解析

個々の細胞での Tnmd の役割を明らかにするために、Tnmd 遺伝子の強制発現系、Tnmd-/-マウス由来線維芽細胞、野生型線維芽細胞を用いて細胞機能を評価する。real time RT-PCR 法によって細胞外マトリクスのリモデリングに参与する分子の発現状況を観察する。さらに、MTT アッセイやボイデンチャンバーアッセイにより細胞の代謝状況、細胞遊走能を観察する。遺伝子欠失型細胞と野生型細胞の

比較を行ったのち、Tnmd 遺伝子の強制発現系を利用して遺伝子欠失型細胞の機能を救出する。また、Tnmd との相互作用分子の存在を検討するために Blue Native PAGE 法を行なう。二次元電気泳動により相互作用分子の存在を確認できた場合には LC/MS を用いて相互作用分子の同定を試みる。同定された分子についてはタンパク質データベースによる機能検索を行い、機能に対する考察を行なう。

Tnmd-/-マウスからの歯周靭帯由来細胞株の単離により細胞における機能評価を行う。細胞株の単離が困難な場合には siRNA 等の遺伝子発現抑制法により knockdown 効果を判定する。

4. 研究成果

Tnmd 特異抗体の作製

潜在的な Tnmd 切断配列の前後のアミノ酸配列を抗原としたペプチド抗体 (Tnmd-BC 抗体および Tnmd-CTD 抗体) を作製した。Tnmd を NIH3T3 細胞に強制発現し、ウエスタンブロットにより Tnmd-BC 抗体の反応性を確認した。また、野生型 (WT) マウスおよび Tnmd ノックアウト (Tnmd-KO) マウスの尾腱組織を用いた免疫染色により抗体の特異性を確認した。先行研究で報告されている腱組織における発現に一致した免疫染色を WT マウス由来の尾腱組織で認め、ネガティブコントロールとして用いた Tnmd-KO マウス由来の尾腱組織では認めなかった。また、免疫染色のネガティブコントロールとして用いた正常ウサギ血清でも陽性反応は認められず、Tnmd-BC 抗体の反応性・特異性が確認された。

Tnmd 発現解析

歯周靭帯における発現は人の歯の萌出様式に近いマウスの臼歯を用いて検討した。歯周靭帯の形成は歯の放出する時期に歯根形成に続いて歯鞘嚢より発生することが知られている。マウスの臼歯は生後 2 週で萌出前期、3 週で萌出期、4 週では咬合期を迎える。マウスでは歯周靭帯の形成は 3 週前後で起こる。これらを踏まえ、歯周靭帯の形成が開始される生後 2、3、4 週の各時期における Tnmd の発現を Tnmd 特異抗体を作製して検討した。その結果、生後 2 週の時期では発現がほとんど見られないのに対し、生後 3 週、4 週のマウスでは、Tnmd の発現が見られた。Tnmd 発現のネガティブコントロールとして、Tnmd-KO マウスでの発現を比較したところ、2、3、4 週のいずれの時期においても発現は認められなかった。TnmdKO マウスの歯周靭帯形成は WT マウスと比較して組織学的な違

いは光学顕微鏡下では確認されず、また歯の萌出時期も大きな差はなかった。Tnmd 免疫染色のネガティブコントロールとして正常ウサギ血清を用いたが、マウス組織は染色されなかった。

このことにより、Tnmd が歯周靭帯に特徴的に発現することがわかり、さらに発現開始時期が歯周靭帯の形成開始以降に起こることがわかった。

Tnmd 機能解析

NIH3T3 細胞に対する Tnmd 強制発現により細胞の大きさが変化することが観察された。共焦点レーザー顕微鏡での細胞免疫染色結果および細胞分画法による解析より膜分画、細胞骨格分画にタンパクが認められることから細胞内での局在が、原形質膜上にあることが確認され、細胞骨格と関連する可能性も示唆された。観察された事象および細胞内の局在より Tnmd が細胞接着に影響を及ぼしている可能性を予想した。この可能性を検証するために、細胞接着試験を行ったところ、Tnmd 遺伝子導入量に依存して細胞接着率が増強されることがわかった。細胞接着に対する Tnmd の効果を検証するために、マウス胎児由来繊維芽細胞を調整し、検討したところ、Tnmd-KO 細胞の細胞接着率が WT 細胞と比較して減弱することがわかった。

Tnmd の細胞接着に及ぼす影響をさらに検討するために、分子内のドメイン欠損変異体を作製した。その結果、Tnmd の細胞接着増強効果には潜在的酵素切断配列を含む領域 (CS ドメイン) および BRICHOS ドメインが必要であることがわかった。

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)

該当ありません。

〔雑誌論文〕(計0件)

該当ありません。

〔学会発表〕(計0件)

該当ありません。

〔図書〕(計0件)

該当ありません。

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

該当ありません。

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

該当ありません。

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

該当ありません。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮山 雄介 (東京大学医学部附属病院・特認臨床医)

研究者番号 :

90586471

(2) 研究分担者

該当ありません。

研究者番号 :

(3) 連携研究者

該当ありません。

研究者番号 :