

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593018

研究課題名(和文)ペリオスチンに着目した歯根膜弾性線維の機能解析

研究課題名(英文) Investigation of the function of the elastic system fibers in periodontal ligaments.

研究代表者

志賀 百年 (Shiga, Momotoshi)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：20596134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯根膜細胞のFBN1の発現抑制を行うことによるペリオスチンの変化の解析を中心に研究を行ってきた。その結果、FBN1の発現低下している状態でフィブリンタンパク質がほとんど確認できない状態では、ペリオスチンタンパク質の増加が認められた。この結果からFBN1の発現低下とペリオスチンの発現に關与することがわかった。これによりこれ歯根膜弾性線維はペリオスチンの発現を調整することにより歯根膜の創傷治癒や再生及び恒常性の維持に關連することが予測された。今後、歯根膜細胞に負荷がかかった場合の変化を詳細に検討したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated it mainly on the analysis of the change of expression of FBN1 and periostin by restraining FBN1 of the human periodontal ligament cell. As a result, the increase in periostin protein was observed when the expression of FBN1 was decreased. Therefore, there were some relationship about expression of FBN1 and periostin. Hereby, the relation of the elastic fibers of the periodontal ligament in wound healing, regenerating and homeostasis of the periodontal ligament by adjusting the expression of periostin can be anticipated. In future, we want to examine the behavior of periodontal ligament when stimulation for periodontal ligament cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：弾性線維 歯根膜 ペリオスチン fibrillin

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯槽骨と歯根の間に存在する特殊な結合組織である。歯根膜は様々な種類の細胞と線維から成り立っており、線維成分では主要な構成要素はコラーゲン線維と弾性線維があることが知られている。コラーゲン線維は歯槽骨とセメント質を結合するように存在し、咬合力に耐えるように歯を支持する役割がある。弾性線維は肺、皮膚、眼、血管等、様々な組織に存在し、組織に弾力を与えていると言われている。歯根膜の弾性線維の主要な構成要素は fibrillin-1(FBN1)である。FBN1 異常が原因の結合組織疾患である I 型 Marfan 症候群(MFS1, MIM#154700) 患者より単離した歯根膜細胞は正常な歯根膜細胞と比較して移植組織内において不規則な細胞の配列や fibrillin のアセンブリの乱れを確認した。また、培養細胞においてはペリオスチン mRNA の発現の低下を確認した。FBN1 が低発現するマウスを使った歯根膜弾性線維では、不規則なコラーゲン線維の走行とペリオスチンの有意な減少を報告した。ペリオスチンは創傷の治癒や再生過程において機能していることが報告されている。さらにペリオスチンは細胞増殖・アポトーシスなど組織恒常性の維持に関与していると推測されている。fibrillin アセンブリの乱れや歯根膜細胞の配列の乱れ、また FBN1 低発現マウスでの歯根膜コラーゲン線維束の乱れは両者ともにペリオスチン遺伝子の発現低下を伴っていた。よって歯根膜弾性線維とペリオスチンに何らかの関連があり歯根膜の恒常性に関与していると予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は人の歯根膜細胞を用いて歯根膜弾性線維とペリオスチンの関連を分子生物的手法を用いて解析することで歯根膜の恒常性のメカニズムを解明することにある。

3. 研究の方法

ヒト歯根膜細胞に RNA 干渉法により弾性線

維の主要構成タンパクである FBN1 遺伝子を選択的に発現低下させ、歯根膜弾性線維の機能低下の細胞培養系を確立し検索する。歯根膜細胞の配列の状態、コラーゲン線維の走行状態を培養細胞の免疫染色や免疫蛍光染色した後に観察する。歯根膜に発現する遺伝子の発現は PCR 法、タンパクの発現はウェスタンブロット法にて解析する。

4. 研究成果

当初はヒト歯根膜細胞にプラスミドを用いた SiRNA 法により長期的な FBN1 抑制を試みた。しかしながら試薬や暴露条件等を変更したにもかかわらずプラスミドをヒト歯根膜細胞にトランスフェクション後に歯根膜細胞が死滅してしまい、プラスミドの導入を断念した。そこで、ヒト歯根膜細胞を培養し合成オリゴをトランスフェクションすることで FBN1 の SiRNA 法を行った。その結果、day7 までは効果的に FBN1 発現が抑制された。しかしながら、day14 以降ではおよそ 40%、day21 以降は 50%以上と抑制効果が明らかに減少した(図1)。細胞の状態を顕微鏡にて観察した結果はコントロール群と FBN1 抑制群では細胞の配列に違いが確認できなかった。

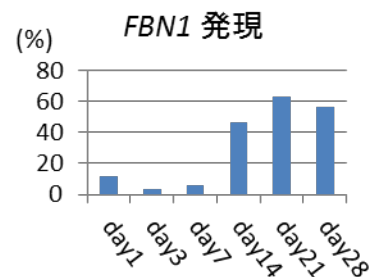


図1

ウェスタンブロット法により day7 の FBN1 とペリオスチンのタンパクを測定した。FBN1 は FBN1 抑制群ではほとんど発現していないことが確認された。一方ペリオスチンは FBN1 抑制群において発現の増加が認められた。(図2)



図2

以上の結果よりヒト歯根膜細胞において FBN1 を抑制した状態で7日間培養した状態においてはペリオスチンが増加することが確認できた。これにより歯根膜弾性線維の発現とペリオスチンの発現に何らかの関連性が確認できた。

今回の成果とペリオスチンが組織の再生や恒常性の維持に関連していることを考慮すると歯根膜弾性線維が歯根膜の再生や創傷治癒に重要な役割を演じている可能性が示唆され、これまで明らかにされていなかった歯根膜弾性線維の新たな機能の解明に寄与することができた。しかしながら、FBN1 が低発現するマウスの歯根膜や MFS1 患者より単離した歯根膜細胞とはペリオスチンの発現状況が異なったことから今後はより生体に近い状態、例えば細胞に断続的な負荷がかかった状態で同じような細胞の振る舞いとなるかを検討し、さらに歯根膜再生にどのようにかかわるかを検証したいと考えている。

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 9 件)

1. Aukkarasongsup P, Haruyama N, Matumoto T, Shiga M, Moriyama K. Periostin inhibits hypoxia-induced apoptosis in human periodontal ligament cells via TGF- β signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, 441:126-32, 2013. DOI:10.1016/j.bbrc
2. Okamura E, Suda N, Baba Y, Fukuoka H, Ogawa T, Ohkuma M, Ahiko N, Yasue A, Tengan T, Shiga M, Tsuji M, Moriyama K. Dental and maxillofacial characteristics of six Japanese individuals with ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome. *Cleft Palate Craniofac J.* 査読有, 50(2):192-200, 2013. DOI:10.1597/11-123
3. Suda N, Moriyama K, Ganburged G. Effect of angiotensin II receptor blocker on experimental periodontitis in a mouse model of Marfan syndrome. *Infect Immun.* 査読有, 81: 182-188, 2013. DOI: 10.1128/IAI.00886-12
4. Suzuk H, Suda N, Shiga M, Kobayashi Y, Nakamura M, Iseki S, Moriyama K. Apert syndrome mutant FGFR2 and its soluble form reciprocally alter osteogenesis of primary calvarial osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology.* 査読有, 2012 Sep;227(9):3267-77. DOI: 10.1002/jcp.24021.
5. Okayasu M, Nakayachi M, Hayashida C, Ito J, Kaneda T, Masuhara M, Suda N, Sato T, Hakeda Y. Low-density lipoprotein receptor deficiency causes impaired osteoclastogenesis and increased bone mass in mice because of defect in osteoclastic cell-cell fusion. *J Biol Chem.* 査読有, 287(23):19229-41, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M111.323600.
6. Tomomura M, Hasegawa H, Suda N, Sakagami H, Tomomura A. Serum calcium-decreasing factor, caldecrin, inhibits receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-mediated Ca^{2+} signaling and actin ring formation in mature osteoclasts via suppression of Src signaling pathway. *J Biol Chem.* 2012 May 25;287(22):17963-74. DOI: 10.1074/jbc.M112.358796.
7. Suda N. Tooth and bone research using genetically modified mice. *Clin Calcium.* 査読有, 2012 Jan;22(1):27-31. DOI: CliCa12012731
8. Suda N, Ogawa T, Kojima T, Saito C, Moriyama K. Non-syndromic oligodontia with a novel mutation of PAX9. *J Dent Res.* 査読有, 2011 Mar;90(3):382-6. DOI: 10.1177/0022034510390042.
9. Saito M, Kurokawa M, Oda M, Oshima M, Tsutsui K, Kosaka K, Nakao K, Ogawa M, Manabe RI, Suda N, Ganjargal G, Hada Y, Noguchi T, Teranaka T, Sekiguchi K, Yoneda T, Tsuji T. ADAMTSL6B rescues fibrillin-1 microfibril disorder in Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. *J Biol Chem.* 査読有, 286: 38602-13, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M111.243451

〔学会発表〕(計 33 件)

1. 丁雪芳、鈴木聖一、志賀百年、大林尚人、倉林亨、森山啓司. コーンビームCTを用いた成人の舌体積と口腔容積の評価. 第72回日本矯正歯科学会大会、松本(キッセイ文化ホール・松本市総合体育館)、平成25年10月7-9日.
2. 高橋由記、東堀紀尚、高田潤一、幸田直己、森下真紀、志賀百年、辻美千子、森山啓司. 非症候性部分性無歯症の臨床的特徴について-顎顔面形態に関する検討-第72回日本矯正歯科学会大会、松本(キッセイ文化ホール・松本市総合体育館)、平成25年10月7-9日.
3. 松本静、東堀紀尚、高田潤一、八尋浩平、志賀百年、辻美千子、森山啓司. 非症候性部分性無歯症の臨床的特徴について-当科における患者動向に関する実態調査-第72回日本矯正歯科学会大会、松本(キッセイ文化ホール・松本市総合体育館)、平成25年10月7-9日.
4. 片柳みなみ、高田潤一、東堀紀尚、池田安紀津、Tsasan Tumurkhuu、志賀百年、辻美千子、森山啓司. 非症候性部分性無歯症の臨床的特徴について-家族歴、欠如部位および歯冠形態に関する検討-. 第72回日本矯正歯科学会大会、松本(キッセイ文化ホール・松本市総合体育館)、平成25年10月7-9日.
5. Aukkarasongsup P, Haruyama N, Matsumoto T, Shiga M, Moriyama K. Periostin inhibits hypoxia-induced periodontal ligament cell apoptosis. The 2nd Meeting of the International Association for Dental Research - Asia Pacific Region, Bangkok(タイ), Aug 21-23rd, 2013
6. 丁雪芳、鈴木聖一、鈴木尋之、志賀百年、辻美千子、榎本啓典、土井庄三郎、森山啓司. KGB 症候群が疑われた上顎巨大中切歯を有する一症例. 第53回日本先天異常学会学術集会、大阪(千里ライフサイエンスセンター)、平成25年7月21-23日.
7. 志賀百年、辻美千子、鈴木尋之、森田淳平、鈴木聖一、森山啓司. マルファン症候群患者3症例の口腔顎顔面形態と歯科矯正治療. 第53回日本先天異常学会学術集会、大阪(千里ライフサイエンスセンター)、平成25年7月21-23日.
8. 松本力、福岡裕樹、鎌田秀樹、志賀百年、川元龍夫、鈴木聖一、森山啓司. 顔面非対称を伴う骨格性下顎前突症患者における中顔面部の三次元形態解析. 第23回日本顎変形症学会総会、大阪(大阪国際会議場)、平成25年6月22-23日.
9. Ahiko N, Baba Y, Sato M, Kanazawa H, Shiga M, Tsuji M, Suzuki S, Kaneko T, kindaichi J, Moriyama K. Investigation of maxillofacial morphology and dental development in hemifacial microsomia. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida (U.S.A.), May 5-10, 2013.
10. Suda N. Periodontitis in a mouse model of Marfan syndrome is improved by Angiotensin II receptor blocker. International Symposium of Frontier Meeting, Florida (U.S.A.), Feb12-14, 2013.
11. Kamata H, Fukuoka H, Shiga M, HiShihori N, Kawamoto T, Moriyama K. Three-dimensional analysis of mandibular morphology in patients with facial asymmetry and Mandibular prognathism. The 45th Annual Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists. 平成24年11月06日-08日 COEX (SEOUL KOREA)
12. Suzuki H, Tsuji M, Shiga M, Okamura E, Suzuki S, Moriyama K. Supernumerary Teeth and Their Eruption State in Three Siblings with Cleidocranial Dysplasia. The 45th Annual Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists. 平成24年11月06日-08日 COEX (SEOUL KOREA)
13. 岡村絵里花、辻美千子、鈴木尋之、志賀百年、鈴木聖一、森山啓司. 当分野を受診した濃化異骨症2症例の顎顔面形態の特徴. 第71回日本矯正歯科学会大会 岩手県(マリオス)平成24年09月26日-28日.
14. アッカラソンサップ パピーナラット、春山直人、松本力、志賀百年、森山啓司. ペリオスチンはヒト歯根膜細胞における低酸素誘導性アポトーシスを抑制する. 第71回日本矯正歯科学会大会 岩手県(マリオス)平成24年09月26日-28日.
15. 宮本順、片岡恵一、スラポンサワッド タンヤポン、志賀百年、小川卓也、辻美千子、森山啓司. Noonan 症候群患者に関する検討(第1報)全身の臨床症状および成長様相について 第71回日本矯正歯

- 科学会大会 岩手県(マリオス)平成 24年 09月 26日-28日.
16. 藪中友絵、片岡恵一、宮本順、小倉健司、劉世類、志賀百年、辻美千子、森山啓司. Noonan 症候群患者に関する検討(第 4報)頭頸部の特徴について. 第 71 回日本矯正歯科学会大会 岩手県(マリオス)平成 24年 09月 26日-28日.
 17. 阿彦希、馬場祥行、佐藤麻緒、金沢英恵、志賀百年、辻美千子、小川卓也、鈴木聖一、金田一純子、森山啓司. Hemifacial microsomia の顎顔面形態および歯の形成・発育に関する検討. 第 71 回日本矯正歯科学会大会 岩手県(マリオス)平成 24年 09月 26日-28日.
 18. 鎌田秀樹、福岡裕樹、志賀百年、川元龍夫、鈴木聖一、森山啓司. 顔面非対称症例における下顎骨形態の三次元的解析. 第 46 回日本口腔科学会関東地方部会 埼玉県(埼玉医科大学川越クリニック)平成 24年 09月 08日.
 19. 志賀百年、小川卓也、森山啓司. Marfan 症候群患者に対する矯正治療の一例. 第 71 回東京矯正歯科学会大会東京都(有楽町マリオン)平成 24年 07月 12日.
 20. 志賀百年、辻美千子、鈴木尋之、岡村絵里花、鈴木聖一、森山啓司. 東京医科歯科大学顎顔面矯正学分野における先天異常疾患患者の来院動向と口腔内の特徴について. 第 52 回日本先天異常学会学術集会 東京都(東京女子医科大学)平成 24年 07月 06日-08日.
 21. 鈴木尋之、辻美千子、志賀百年、岡村絵里花、鈴木聖一、森山啓司. 鎖骨頭蓋異形成症の 3 同胞間における過剰歯および歯の萌出様相について. 第 52 回日本先天異常学会学術集会 東京都(東京女子医科大学)平成 24年 07月 06日-08日.
 22. 鎌田秀樹、福岡裕樹、山田大輔、志賀百年、川元龍夫、森山啓司. 顔面非対称を伴う骨格性下顎前突症例における下顎骨形態の三次元的解析. 第 22 回日本顎変形症学会総会 福岡県(福岡国際会議場)平成 24年 06月 18日-19日.
 23. 阿彦希、馬場祥行、佐藤麻緒、金沢英恵、志賀百年、森山啓司、金子剛、金田一純子. Hemifacial midrosomia の顎顔面形態および歯の形成に関する検討. 第 36 回日本口蓋裂学会総会・学術集会京都府(国立京都国際会館)平成 24年 05月 24日-25日.
 24. 志賀百年、馬場祥行、金沢英恵、佐藤麻緒、森山啓司、堀川玲子、金田一純子. 国立成育医療研究センターを受診したラッセル・シルバー症候群患者 3 例に対する歯科矯正治療. 第 70 回日本矯正歯科学会 & 第 4 回国際会議、名古屋(名古屋国際会議場)平成 23年 10月 17-20日.
 25. 辻美千子、小川卓也、岡村絵堅花、鈴木尋之、志賀百年、鈴木聖一、森山啓司. 当分野における先天異常患者の実態調査と当該患者に対するカウンセリングの概要について. 第 70 回日本矯正歯科学会 & 第 4 回国際会議、名古屋(名古屋国際会議場)平成 23年 10月 17-20日.
 26. 柘植理紗、小川卓也、上髭ト除塵、丸岡亮、大隈瑞恵、志賀百年、辻美千子、須田直人、小崎健次郎、森山啓司. 当分野を受診した Russel-Silver 症候群患者の臨床症状に関する検討. 第 70 回日本矯正歯科学会 & 第 4 回国際会議、名古屋(名古屋国際会議場)平成 23年 10月 17-20日.
 27. 佐藤智美、澤田絃美、志賀百年、吉崎正子、大隈瑞恵、辻美千子、佐藤麻緒、馬場祥行、金田一純子、小川卓也、森山啓司. Russel-Silver 症候群の頭部 X 線規格写真を用いた顎顔面形態に関する検討. 第 70 回日本矯正歯科学会 & 第 4 回国際会議、名古屋(名古屋国際会議場)平成 23年 10月 17-20日.
 28. 須田直人. 矯正歯科と遺伝性疾患. 生涯研修セミナー. 第 70 回日本矯正歯科学会 & 第 4 回国際会議、名古屋(名古屋国際会議場)平成 23年 10月 17-20日.
 29. 須田直人. 歯根膜における弾性線維の機能を考える. サテライトセミナー「歯周組織とは? 発生・由来・機能について考える」. 第 53 回歯科基礎医学会. 岐阜(長良川国際会議場)平成 23年 9月 30-10月 2日.
 30. Suda N. Fibrillin-1 is essential for the normal tissue architecture and gene expression of periodontal ligament. Gordon research conference. Biddeford, ME, (U.S.A.), July 24-29, 2011.
 31. Suda N. Effect of Angiotensin II receptor blocker on the experimental periodontitis in the mouse model of Marfan syndrome. Gordon-Kenan Research Seminar. Biddeford, ME, (U.S.A.), July 23-24, 2011.

32. 須田直人. 歯科のオリジナリティーに根差した基礎研究の意義. 第 70 回東京矯正歯科学会. 平成 23 年 7 月 20-21 日, 東京 (有楽町朝日ホール)
33. 志賀百年、馬場祥行、山田大輔、金沢英恵、徳山英二郎、金子剛、森山啓司、金田一純子. 成長期に顔面非対称が顕著となり外科的矯正治療を適用した 1 症例. 第 21 回日本顎変形症学会総会・30 周年記念国際シンポジウム. 東京 (一橋記念講堂) 平成 23 年 6 月 16-17 日.

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学顎顔面矯正学分野ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/grad/mort/mort-J.htm>

業績集

<http://www.tmd.ac.jp/grad/mort/research/achievement.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志賀 百年 (SHIGA Momotoshi)

東京医科歯科大学・歯学部付属病院・非常勤講師

研究者番号：20596134

(2) 研究分担者

須田 直人 (SUDA Naoto)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：90302885