

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890109

研究課題名（和文） 歯根膜特異的分子 PLAP-1 の遺伝子多型による歯周炎炎症反応制御

研究課題名（英文） Gene polymorphism in PLAP-1 regulates inflammation of periodontal disease.

研究代表者

梶川 哲宏

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90611252

研究成果の概要（和文）：マウス歯根膜細胞（MPDL22）を用いた解析の結果、PLAP-1 は LPS 誘導性の炎症応答に対し抑制的に働くことが示唆された。さらに D14 型 PLAP-1 は、D13 型 PLAP-1 よりもこの抑制作用が弱かった。しかしながら、PLAP-1 KO マウスを用いた解析では、LPS 誘導性の炎症応答に対し有意な差は認められなかった。現在、今回作製した D13 型、D14 型 PLAP-1 発現アデノウイルスを用いて、in vivo 歯周炎 PLAP-1 遺伝子多型解析モデルの構築を行っている。

研究成果の概要（英文）：PLAP-1 inhibited LPS-induced inflammation with mouse periodontal ligament cells (MPDL22). In addition, the D14 allele of PLAP-1 inhibited LPS-induced inflammation more strongly compared to the D13 allele of PLAP-1. However, there was no significant difference of LPS-induced inflammation between PLAP-1 deficient mice and wild type mice. Now, I try to make the mouse model of periodontal disease which can elucidate the correlation between polymorphism in PLAP-1 and periodontal inflammation with D13- and D14-PLAP-1 expressing adenovirus system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：①PLAP-1 ②歯根膜 ③遺伝子多型 ④歯周炎 ⑤疾患感受性

1. 研究開始当初の背景

PLAP-1 は、我々の研究室においてヒト歯根膜 cDNA ライブラリーより発見された新規分子であり、歯根膜特異的に高い発現を認めることが明らかとなっている（Yamada et al. Gene. 2001）。さらに PLAP-1 が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化、特に BMP-2 誘導性の細胞分化を抑制することを報告している

（Yamada et al. J Bio Chem. 2007、Tomoeda et al. Biochem Biophys Res Commun. 2008）。歯根膜は歯と歯槽骨の 2 つの硬組織に囲まれながらも、靭帯として軟組織の性質を維持しているユニークな組織である。我々は PLAP-1 が恒常的に歯根膜に強く発現することで、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御し、歯根膜の軟組織としての恒常性が維持さ

れると考えている (Yamada et al. Japanese Dental Science Review. 2008)。一方、興味深いことに、PLAP-1 の N 末端領域のアスパラギン酸の連続配列の数が個人によって異なるという PLAP-1 遺伝子多型と変形性関節症の相関が報告された (Kizawa et al. Nat Genet. 2004)。N 末端のアスパラギン酸の連続数が 14 個である PLAP-1 (D14 型 PLAP-1) を保有するヒトは、他の型の PLAP-1 を保有するヒトと比べ、関節軟骨の恒常性が破綻しやすく、有意に変形性関節症を発症するリスクが高くなることがわかっている。歯根膜組織と関節軟骨は、細胞外基質を多く含むといった構造上の類似点や力の緩衝作用という機能面の類似点を有しており、関節軟骨の恒常性の維持に影響を与える PLAP-1 多型性が、歯根膜の機能にも影響を与える可能性が高いことが考えられる。我々は、PLAP-1 遺伝子多型が歯根膜組織の恒常性の維持におよぼす影響について詳細な *in vitro* 解析を行った結果、日本人において最も発現頻度の高い D13 型 PLAP-1 と比較して、D14 型 PLAP-1 はより強く歯根膜細胞の硬組織形成分化を抑制することを明らかとしている (未発表データ)。

一方、PLAP-1 と同じファミリーに属する Biglycan が細菌由来の Lipopolysaccharide (LPS) 誘導性炎症応答を制御しているという報告があり (Schaefer et al. J Clin Invest. 2005, Babelova et al. J Bio Chem. 2009)、Biglycan と相同性の高い PLAP-1 が LPS 誘導性の炎症応答に影響をおよぼす可能性は高いと考えられる。

そこで本研究課題では、PLAP-1 が LPS 誘導性の炎症応答に与える影響を明らかにすることで、PLAP-1 遺伝子多型と LPS 誘導性炎症応答の関係を解明することを立案した。

2. 研究の目的

PLAP-1 が LPS 誘導性の炎症応答に与える影響を分子・遺伝子レベルで明らかにすることで、PLAP-1 遺伝子多型と LPS 誘導性炎症応答の関係を解明する。

3. 研究の方法

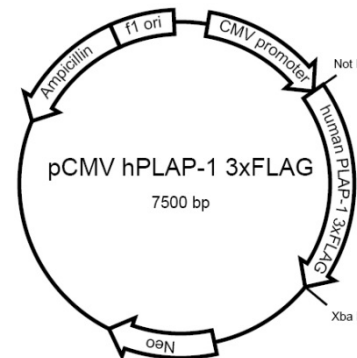
(1) PLAP-1 KO マウスを用いた LPS 誘導性炎症応答の解析

当研究室で樹立した 8 週齢の PLAP-1 KO マウスおよび野生型 (WT) マウス各 8 匹ずつに、*Porphyromonas gingivalis* (P. g.) 由来 LPS を 60 μ g/体重 g の量で腹腔内投与し、生存率を検討した。

(2) PLAP-1 安定発現株を用いた LPS 誘導性炎症応答の解析

マウス歯根膜細胞株である MPDL22 株に対し、当研究室で作製したプラスミドである CMV-D13 PLAP-1、CMV-D14 PLAP-1 をトランスフェクションし、D13 型 PLAP-1、D14 型 PLAP-1 安定発現株を樹立した。

作製したこれらの安定発現株に対し、P. g. 由来の LPS 刺激を行い、誘導される炎症性サイトカインの発現について検討を行った。



CMV プロモーター含有 PLAP-1 発現プラスミドの構造

(3) *in vivo* 歯周炎 PLAP-1 遺伝子多型解析モデルの構築

in vivo 歯周炎 PLAP-1 遺伝子多型解析モデルマウスを構築するため、D13 型 PLAP-1、D14 型 PLAP-1 発現アデノウイルスの作製を行った。

4. 研究成果

(1) PLAP-1 KO マウスを用いた LPS 誘導性炎症応答の解析

PLAP-1 KO マウスおよび WT マウスに P. g. 由来 LPS を腹腔内投与し、生存率を調べた。両群の生存率に有意な差は認められなかった。現在個体数を増やし、同様の実験を計画している。

(2) PLAP-1 安定発現株を用いた LPS 誘導性炎症応答の解析

作製した PLAP-1 安定発現株に対し、P. g. 由来の LPS 刺激を行い、誘導される IL-6 の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。その結果、コントロール株と比べ、PLAP-1 安定発現株では IL-6 の発現が抑制された。さらに D13 型 PLAP-1 と比べ、D14 型 PLAP-1 安定発現株ではこれら炎症性サイトカインの発現抑制作用が弱い傾向を示した。

(3) in vivo 歯周炎 PLAP-1 遺伝子多型解析モデルの構築

当教室で cDNA クローンの単離に成功している D13 型 PLAP-1、D14 型 PLAP-1 の cDNA を用いて、アデノウイルス作製のために必要な D13 型 PLAP-1、D14 型発現コスミドベクターを作製した。コスミドベクターの構造の確認のため、アデノ落としを行い、CAG プロモーター含有 PLAP-1 発現プラスミドを作製した (図 1)。作製した D13 型 PLAP-1、D14 型 PLAP-1 発現コスミドベクターを HEK293 細胞株にトランスフェクションし、一次ウイルスの作製を行った。HEK293 細胞株に一次ウイルスを感染させることで、二次ウイルスを作製した。続いて D13 型 PLAP-1、D14 型 PLAP-1 を発現する三次ウイルス、四次ウイルスを同様の方法で作製した。作製した四次ウイルスを、当研究室で樹立した PLAP-1 KO マウス由来の MEF 細胞に感染させ、抗 PLAP-1 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により培養上清中に PLAP-1 タンパクが発現していることを確認した (図 2)。さらに、この PLAP-1 発現ウイルス (1/3 希釈) を感染させた MEF 細胞に BMP-2 刺激を行い、ターゲット遺伝子である Id-1 の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で定量し、これまで当教室で行ってきた報告と同様に、ウイルス由来 PLAP-1 が BMP-2 の機能を抑制することを示した。以上のことから作製したアデノウイルスが機能的に働いていることが示された (図 3)。現在、このウイルスを増殖、精製し、PLAP-1 KO マウスへ適用させ、in vivo 歯周炎 PLAP-1 遺伝子多型解析モデルの構築およびその解析を実験計画中である。

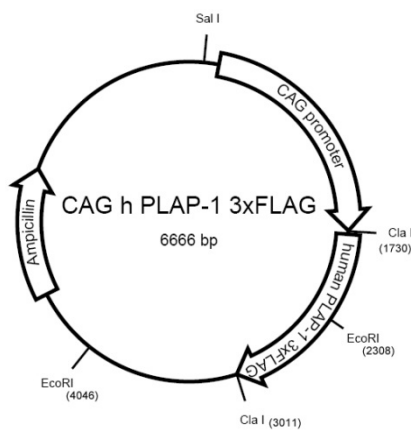


図 1. CAG プロモーター含有 PLAP-1 発現プラスミドの作製

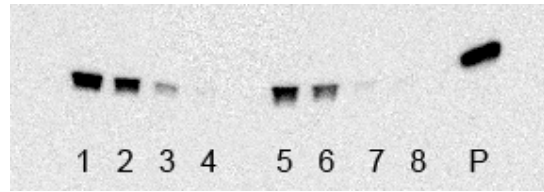


図 2. アデノウイルスを感染させた PLAP-1 KO マウス由来 MEF 細胞の培養上清中における PLAP-1 タンパク発現

1. D13 PLAP-1 adenovirus (原液)
2. D13 PLAP-1 adenovirus (1/3 希釈)
3. D13 PLAP-1 adenovirus (1/10 希釈)
4. D13 PLAP-1 adenovirus (1/20 希釈)
5. D14 PLAP-1 adenovirus (原液)
6. D14 PLAP-1 adenovirus (1/3 希釈)
7. D14 PLAP-1 adenovirus (1/10 希釈)
8. D14 PLAP-1 adenovirus (1/20 希釈)
- P. Positive control

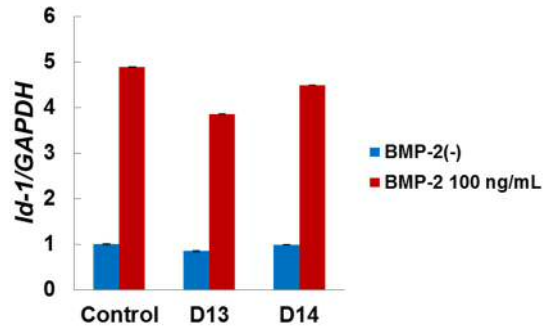


図 3. アデノウイルスを感染させた PLAP-1 KO マウス由来 MEF 細胞に BMP-2 刺激を行った際の Id-1 の発現

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 2 件)

① Hou J, Yamada S, Kajikawa T, Ozaki N, Awata T, Yamaba S, Murakami S.

Role of ferritin in the cytodifferentiation of periodontal ligament cells.

Biochem Biophys Res Commun. 、査読有、426、2012、643-8.

② Tsutsumi K, Fujikawa H, Kajikawa T, Takedachi M, Yamamoto T, Murakami S.

Effects of L-ascorbic acid 2-phosphate magnesium salt on the properties of human gingival fibroblasts.

J Periodontal Res. 、査読有、47、2012、
263-71.

〔学会発表〕(計2件)

① 梶川 哲宏、Inhibitory effects of
D14-PLAP-1 on periodontal ligament cell
differentiation、90th General Session of
the IADR、2012.6.20、Iguacu Falls、Brazil

② 梶川 哲宏、PLAP-1 遺伝子多型の歯根膜恒常
性における役割、第 54 回 春季 日本歯周
病学会学術大会、2011.5.27、福岡国際会議
場(福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶川 哲宏 (KAJIKAWA TETSUHIRO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：90611252