

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659923

研究課題名(和文) 遺伝性結合組織疾患モデルを用いた侵襲性歯周炎の分子病因解析

研究課題名(英文) Molecular pathogenesis of aggressive periodontitis utilizing hereditary connective tissue disorder mouse model

研究代表者

山田 聡 (YAMADA, SATORU)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40359849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、侵襲性歯周炎の分子病因の一端を明らかとすることを目的として、侵襲性歯周炎を随伴する遺伝性結合組織疾患に特異的な遺伝子変異(変異型TGF-β1型受容体)を再現した疾患モデルマウスを作製した。現在までのところ、同変異ヘテロマウスは、正常な発育を示し、繁殖も可能であった。一方、ヘテロ変異マウス同士での交配実験において、ホモ変異マウスは作出されないことから、同遺伝子のホモ変異は、致死性を示すことが示唆された。変異型TGF-β1型受容体では、TGF-βシグナルが活発化していることが明らかとなり、変異マウスにおいてもTGF-βシグナルが活性化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, we generated hereditary connective tissue disorder mouse model using TGF-β type I receptor point-mutation knock-in ES cells to investigate molecular pathogenesis of aggressive periodontitis. So far, knock-in hetero mice are fertile and show normal growth and development. On the other hand, knock-in homo mice is never produced. The TGF-β type I receptor point-mutation resulted in over-activation of TGF-β signal pathway in 293 cells, suggesting TGF-β signal disorder in the knock-in mice.

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：遺伝性結合組織疾患 TGF-beta 疾患モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

様々な細胞外マトリックス遺伝子の変異で引き起こされる遺伝性結合組織疾患のなかで、COL 遺伝子の変異により皮膚等の結合組織が脆弱となる Ehlers-Danlos 症候群の患者においては、重篤な歯周炎が随伴されることが知られている。遺伝性結合組織疾患の患者では、結合組織に富む歯周組織においても疾患表現型が現れ、歯周病に対する感受性が増している可能性が考えられる。しかしながら、様々な遺伝性結合組織疾患における歯周組織の表現型や歯周炎の疾患感受性などは、これまで殆ど研究報告されていない。一方、マルファン症候群では、結合組織のミクロフィブリルの主要構成成分である FIBRILLIN の異常から結合組織が脆弱となり大動脈の拡張や解離、弁の閉鎖不全などの症状を現すことが知られている。我々は、これまでに、同症候群と侵襲性歯周炎との関連性を明らかにするため、国立循環器病研究センターにおいて、同症候群患者を対象とした侵襲性歯周炎罹患実態調査研究を進めた結果、歯周組織に表現型を示す幾つかの症例を見出した。単一の遺伝性結合組織疾患であっても原因となる ECM 遺伝子のシーケンスは長大で、遺伝子変異は各患者ゲノムの異なった部位で起きている。それら遺伝子変異の発生日位によってコードするタンパク質の機能異常に差違が生じることから、原因遺伝子が同じでも、表現型としての臨床症状は大小様々なものが現れる。そこで、本研究課題は、歯周組織に表現型を示す遺伝性結合組織疾患特異的な遺伝子変異をマウスで再現することで、未だ不明な侵襲性歯周炎の分子病因を解明するという挑戦的萌芽研究である。

## 2. 研究の目的

本研究は、侵襲性歯周炎を随伴する遺伝性結合組織疾患患者に特異的な遺伝子変異(変異型 TGF- $\beta$ I 型受容体)を再現した疾患モデルマウスを作製し、同疾患モデルマウスの歯周組織における表現型および実験的歯周炎に対する疾患感受性を解析することにより、侵襲性歯周炎の分子病因の一端を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝性結合組織疾患モデルマウスの作製

当研究室で既に樹立した変異型 TGF- $\beta$ I 型受容体組み替え ES 細胞を、妊娠マウスから採取した胎盤胚へマイクロインジェクションし、偽妊娠マウスの子宮へ戻すことによりキメラマウスを産出した。産出されたキメラマウスを野生型マウスと交配することで、相同組換え ES 細胞由来の F1 マウスを得た。F1 マウスにおけるゲノム解析から遺伝子変異のノックインを確認した後、同 F1 マウスと Cre 発現トランスジェニックマウスとを交配することにより、F1 マウスゲノム上のネオマイシン耐性遺伝子カセットを取り除き、

遺伝性結合組織疾患モデルノックインマウスを樹立した。

### (2) 歯根膜細胞における TGF- $\beta$ の機能解析と変異型 TGF- $\beta$ I 型受容体シグナル伝達解析

培養歯根膜細胞を TGF- $\beta$  で刺激した。同細胞から全 RNA を精製し、歯根膜に特異的に発現されている Periostin、PLAP-1、また歯根膜に特徴的に発現している Cathepsin K の遺伝子発現を PCR 法により解析した。

次に、正常型マウス TGF- $\beta$ I 型受容体の cDNA クローンを鋳型として、ポイントミューテーション挿入キットを用いて、変異型マウス TGF- $\beta$ I 型受容体 cDNA クローンを作製した。正常型および変異型クローン発現ベクターを 293 細胞株へ遺伝子導入した。同細胞株を TGF- $\beta$  にて刺激し、経時的に全細胞可溶画分を採取した。同画分を SDS-PAGE にて展開し、メンブレンへ転写、抗リン酸化 smad2 抗体を用いたウエスタンブロットにて TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の活性化を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝性結合組織疾患モデルマウスの作製

変異型 TGF- $\beta$ I 型受容体組み替え ES 細胞から変異型 TGF- $\beta$ I 型受容体マウスの樹立に成功した。同遺伝子変異ヘテロマウスは、正常な発育を示し、繁殖も可能であった。ヘテロ変異マウス同士での交配実験において、ホモ変異マウスは作出されないことから、同遺伝子のホモ変異は、致死性を示すことが示唆された。

図 1 にジェノタイプ PCR 解析による遺伝子組み替え陽性 ES 細胞確認の結果を示す。

図 2 には、組み替え ES 細胞のインジェクションにより得られたキメラマウスを示す。毛色から高いキメラ率が得られたと判断される。

図 3 に CAG-Cre マウスと lox P 挿入変異型 TGF- $\beta$ I 型受容体マウスとの交配によりネオマイシン耐性遺伝子の除去に関する概念図を示す。

図 4 には、マウスゲノム中の lox P サイトにおけるジェノタイプ PCR 解析により変異型 TGF- $\beta$ I 型受容体マウスを確定した解析の結果を示す。

図1 ジェノタイプPCRによる組み替え陽性ES細胞の確認

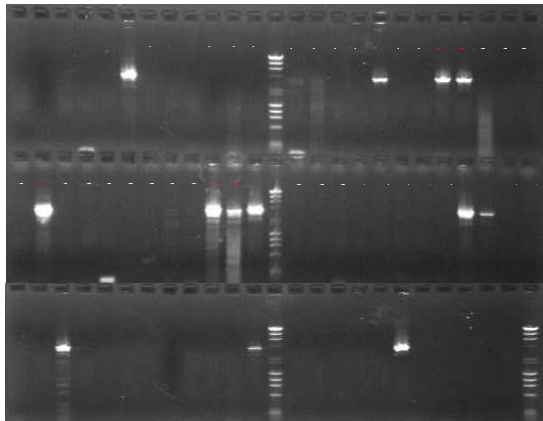


図2 組み替えES細胞から作製されたキメラマウス



図3 CAG-Cre マウスとの交配によるネオマイシン耐性遺伝子の除去 (概念図)

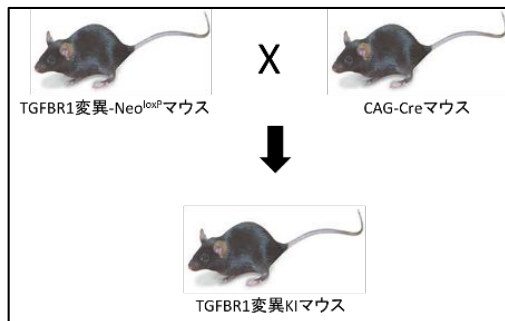
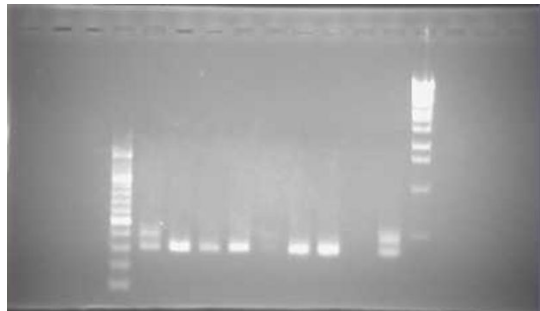


図4 TGF-βI 受容体変異マウス遺伝型の解析



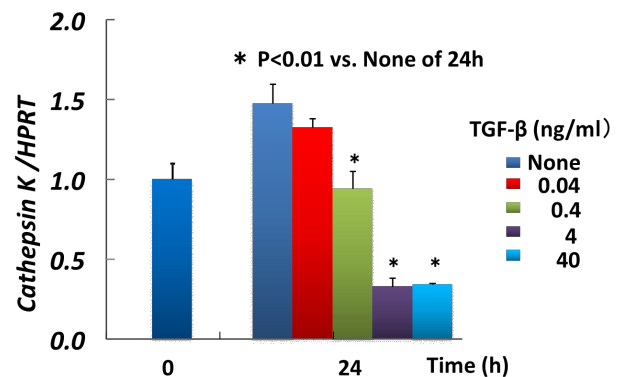
(2) 歯根膜細胞における TGF-βの機能解析と変異型 TGF-βI 型受容体シグナル伝達解析

歯根膜細胞を TGF-βにて刺激することで、歯根膜特異的遺伝子である Periostin、PLAP-1 の発現が誘導され、一方、Cathepsin K の発現は、TGF-β濃度依存的に抑制された。歯根膜細胞の機能に TGF-βが関与していることが示唆された。

変異型 TGF-βI 型受容体を発現した 293 細胞においては、正常型 TGF-βI 型受容体発現 293 細胞と比較して、smad2 のリン酸化が亢進していることが明らかとなり、変異型 TGF-βI 型受容体においては、TGF-βシグナル伝達が過剰に活性化していることが明らかとなった。

以上の結果から、変異型 TGF-βI 型受容体マウスにおいては、TGF-βシグナルが過剰に活性化することで、細胞および組織表現型が現れる可能性が示唆される。

図5 TGF-βによる Cathepsin K 遺伝子発現制御



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

尾崎巨弘、山田 聡、田内拓史、梶川哲宏、  
栗田敏仁、山羽聡子、阪下裕美、村上伸也、  
ヒト歯根膜細胞における cathepsin K の発現  
局在、日本歯周病学会 2012 秋季大会、2012  
年9月23日、つくば市

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 聡 (YAMADA SATORU)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40359849

(2)研究分担者

村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号・70239490

北村 正博 (KITAMURA MASAHIRO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号・10243247

北垣 次郎太 (KITAGAKI JIROUTA)

大阪大学・歯学部附属病院・特任講師

研究者番号・90570292