

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 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：2014～2015

課題番号：26893146

研究課題名(和文) 歯根膜特異的分子PLAP-1によるFGF-2機能の制御機構解明

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of FGF-2 by periodontal ligament specific molecule, PLAP-1

研究代表者

栗田 敏仁 (AWATA, TOSHIHITO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：30733026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：PLAP-1は、歯根膜に高頻度かつ特異的な発現を示す細胞外基質であり、BMP-2およびTGF- β の機能を抑制することが明らかとなっているが、歯周組織で重要な働きを担うFGF-2との相互作用に関しては未だ不明である。そこで、本研究ではPLAP-1とFGF-2との相互作用について明らかにすることを目的として解析を行った結果、PLAP-1がFGF-2の機能を促進的に制御していることが明らかとなった。FGF-2を歯槽骨欠損部に局所投与することで歯周組織再生を促すことが既に明らかとなっているため、今後、本研究結果が細胞外基質とサイトカインとを併用した新規歯周組織再生療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：PLAP-1 is an extracellular matrix protein that is predominantly expressed in the periodontal ligament within periodontal tissue. It was previously revealed that PLAP-1 negatively regulates BMP-2 and TGF- β activity through direct interactions. However, the interaction between PLAP-1 and FGF-2, which is a critical growth factor in tissue homeostasis and repair, has not been defined yet. In this analysis, we revealed that PLAP-1 positively regulates FGF-2 activity. Topical application of recombinant FGF-2 in intrabony defects significantly stimulates periodontal regeneration. This approach may be useful in several regenerative medicine applications using extracellular matrix and growth factors concomitantly.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周再生医学 歯周病 歯周組織再生療法 歯根膜 PLAP-1 FGF-2

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、歯と歯槽骨という二つの硬組織の間に存在し、コラーゲンをはじめとする細胞外基質に富んだ結合組織である。そして、その形態的・機能的な特性を維持するために、細胞外基質が重要な役割を果たしている。細胞外基質は組織の構造を形づくり、その強度を担うのみならず、様々なサイトカイン・増殖因子を捕らえ必要に応じて放出することで、細胞の増殖・分化を制御し多様な生命現象に関わっていることが近年注目されている。我々の研究室においてヒト歯根膜 cDNA ライブラリーより同定された PLAP-1 は、歯根膜に高頻度かつ特異的な発現を示す細胞外基質である。これまでの歯根膜細胞を用いた解析から、PLAP-1 が BMP-2 および TGF- β のアンタゴニストとして機能することで、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を抑制することが明らかになっている。このことから、PLAP-1 は様々なサイトカインの機能を制御することで、歯根膜の恒常性維持に関与していると考えられている。一方、FGF-2 は胎生期から成体を通じて様々な組織で幅広く発現し、強力な間葉系細胞の増殖誘導作用および血管新生作用を持つほか、組織の創傷治癒、骨・軟骨の形成に関与するなど多彩な作用を有している。歯周組織においても、歯根膜、歯肉結合組織、歯肉上皮細胞間隙など広範囲に FGF-2 の発現が確認されており、歯周組織の創傷治癒過程において FGF-2 の発現が誘導されることから、FGF-2 が歯周組織の恒常性維持・創傷治癒過程で重要な役割を果たしていることが示唆されている。さらに、我々の研究室では、FGF-2 を歯周外科治療時に歯槽骨欠損部へ局所投与することにより、歯周組織再生が誘導されることを明らかとしている。我々は、これまでの予備実験の結果から、PLAP-1 ノックアウト (*Plap-1*^{-/-}) マウスにおいて FGF-2 シグナルが低下している可能性を見出しており、このことは PLAP-1 と FGF-2 とが何らかの相互作用を有することを示唆している。

2. 研究の目的

PLAP-1 は歯根膜に高発現することで様々なサイトカイン・増殖因子の機能を制御することが示唆されているが、歯周組織の恒常性維持や創傷治癒過程で重要な働きを担う FGF-2 との相互作用に関しては、未だ詳細な解析はなされていない。そこで、本研究では我々の研究室で樹立した *Plap-1*^{-/-} マウスおよび同マウス由来の細胞を用いて、PLAP-1 と FGF-2 との相互作用について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

野生型(WT)および *Plap-1*^{-/-} マウス由来のマウス胎仔線維芽細胞(MEFs)を用いて、FGF-2 に対する反応性について比較検討を行った。また、歯根膜細胞を用いて siRNA

導入による PLAP-1 の機能抑制実験を行った。さらに、免疫共沈析により PLAP-1、FGF-2、FGF 受容体の分子間相互作用について検討し、免疫細胞化学解析により MEFs における PLAP-1、FGF-2、FGF 受容体の局在についても解析した。

(1) MEFs を用いた解析

Plap-1^{-/-} MEFs における FGF-2 誘導性細胞動態の解析

WT および *Plap-1*^{-/-} マウスから MEFs を分離、培養し、FGF-2 に対する反応性について比較検討を行った。すなわち、WT および *Plap-1*^{-/-} MEFs を FGF-2 で刺激し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応を BrdU にて、細胞内シグナル Erk のリン酸化をウエスタンブロッティングにて、また FGF-2 刺激により誘導される遺伝子 (*Sprouty*, *Has*) の発現解析を Real-Time PCR 法により解析した。

PLAP-1 発現が *Plap-1*^{-/-} MEFs の FGF-2 誘導性細胞動態に与える影響の解析

我々が作製した PLAP-1 発現アデノウイルスを *Plap-1*^{-/-} MEFs に感染させ、PLAP-1 を高発現させた *Plap-1*^{-/-} MEFs、およびコントロールウイルスを感染させた *Plap-1*^{-/-} MEFs を FGF-2 で刺激し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応、細胞内シグナル伝達、FGF-2 刺激により誘導される遺伝子の発現解析を行い、各群を比較検討した。

(2) 歯根膜細胞を用いた解析

歯根膜細胞において PLAP-1 による FGF-2 の機能制御に関する解析を行うために、マウス歯根膜細胞株へ *Plap-1* 特異的 siRNA を導入し、*Plap-1* の発現を抑制した群、およびコントロール siRNA を導入した群を作製し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応、細胞内シグナル伝達、FGF-2 刺激により誘導される遺伝子の発現解析を行い、各群を比較検討した。

(3) PLAP-1 と FGF-2 関連分子の免疫共沈析

MEFs における免疫細胞化学解析
細胞外における PLAP-1 と FGF-2、さらには FGF 受容体との分子間相互作用について検討するため、我々の作製した histidine 標識リコンビナント PLAP-1 タンパクを用いて、免疫共沈析を行った。次に、PLAP-1 と FGF-2 とが結合しうるか否かについて検討を行った。また、歯根膜において FGF-2 の受容体は主に FGF 受容体 1(FGFR1)であることが示されていることから、PLAP-1 と FGF-2、FGFR1 との免疫共沈析を行い、FGF-2 の FGFR1 への結合能に PLAP-1 が与える影響についても解析した。さらに、WT MEFs において PLAP-1 と FGF-2 との免疫細胞化学解析、また WT および *Plap-1*^{-/-} MEFs における FGF-2 と FGFR1 との免疫細胞化学解析を行い、MEFs における PLAP-1、FGF-2、FGFR1 の局在についても検討した。

4. 研究成果

(1)

MEFs を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、

FGF-2 で刺激し、24 時間後の BrdU の取り込み量を測定し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応を検討した。その結果、*Plap-1*^{-/-} MEFs は WT MEFs と比較して、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応の有意な低下を認めた(図 1)。次に、FGF-2 刺激により誘導される遺伝子の発現解析を行った。FCS 非存在下で一晩培養した MEFs を FGF-2 で刺激し、1 時間後の FGF-2 誘導性 *Spry2*、*Has2* 遺伝子の発現を Real-Time PCR にて解析した。その結果、*Plap-1*^{-/-} MEFs においては WT MEFs と比較して、有意に FGF-2 誘導性 *Spry2*、*Has2* 発現の低下を認めた(図 2)。続いて、MEFs における FGF-2 の細胞内シグナル伝達解析を行った。MEFs を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、FGF-2 で刺激し、細胞を回収して Erk1/2 のリン酸化をウェスタンブロッティングにより検討した。その結果、*Plap-1*^{-/-} MEFs においては、WT MEFs と比較して、FGF-2 誘導性の Erk1/2 のリン酸化の低下が認められた。

Plap-1^{-/-} MEFs における FGF-2 に対する反応性の低下が、PLAP-1 発現の有無によるものであることを明らかにするため、PLAP-1 発現が *Plap-1*^{-/-} MEFs の FGF-2 誘導性細胞動態に与える影響について解析を行った。まず、PLAP-1 発現アデノウイルスを *Plap-1*^{-/-} MEFs に感染させ、24 時間後の培養上清を回収した。同上清のウェスタンブロッティングを行い、PLAP-1 タンパクの発現を確認した。コントロールとしては Lac Z 発現アデノウイルスを使用した。同細胞を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、FGF-2 で刺激し、24 時間後の BrdU の取り込み量を測定し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応を検討した。その結果、PLAP-1 発現群(Ad-PLAP-1)ではコントロール群(Ad-lacZ)と比較して、FGF-2 誘導性細胞増殖反応の有意な亢進を認めた(図 3)。さらに同細胞を用いて FGF-2 の細胞内シグナル伝達解析を行った。LacZ および PLAP-1 発現 *Plap-1*^{-/-} MEFs を FGF-2 で刺激して細胞を回収し、Erk1/2 のリン酸化をウェスタンブロッティングにより検討した。その結果、Ad-PLAP-1 では Ad-lacZ と比較して、FGF-2 誘導性の Erk1/2 のリン酸化の亢進が認められた。

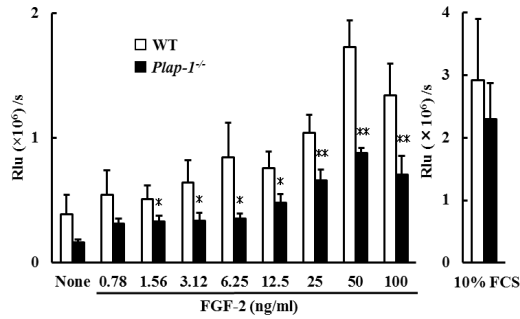
(2) 歯根膜細胞においても、MEFs と同様に PLAP-1 による FGF-2 の機能制御について検討するため、マウス歯根膜細胞株 MPDL22 を用いて siRNA により内在性 *Plap-1* 遺伝子の発現を抑制した MPDL22 を作製した。まず、*Plap-1* siRNA 導入による発現抑制を Real-Time PCR により確認した。その結果、*Plap-1* siRNA 導入群ではコントロール群と比較して、有意な内在性 *Plap-1* 遺伝子発現の抑制を認めた。そこで、コントロール群および *Plap-1* siRNA 導入群を FGF-2 で刺激し、内在性 *Plap-1* 遺伝子発現抑制が FGF-2 誘導性の細胞増殖反応に与える影響を解析した。コントロール群および *Plap-1* siRNA 導入群

を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、FGF-2 で刺激し、24 時間後の BrdU の取り込み量を測定し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応を検討した。その結果、コントロール群では FGF-2 の濃度依存的な細胞増殖反応を認めた一方、内在性 *Plap-1* 遺伝子発現抑制群においては、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応が有意に低下していることが明らかとなった。

(3) MEFs および歯根膜細胞を用いた解析結果から、PLAP-1、FGF-2 および FGFR に何らかの分子間相互作用があることが想定されたため、まず免疫共沈法を用いて PLAP-1 と FGF-2 とが直接結合し得るか否かについて検討を行った。免疫共沈解析は、histidine 標識リコンビナント PLAP-1 タンパクとリコンビナント FGF-2 タンパクを混和し、Agarose 結合 His-probe を用いて免疫沈降を行った。そしてウェスタンブロッティングにより FGF-2 の共沈の有無を解析した。その結果、FGF-2 の共沈を認め、PLAP-1 と FGF-2 の結合が明らかとなった。次に、PLAP-1 と FGF-2 の結合が FGFR1 への結合能に与える影響について解析を行った。histidine 標識リコンビナント PLAP-1 タンパクとリコンビナント FGF-2 タンパクを混和し、さらにリコンビナント FGFR1 α /Fc chimera タンパクを加えた。同混合溶液に Protein A/G PLUS-Agarose を添加して Fc 部位にて FGFR1 を免疫沈降し、FGF-2 および PLAP-1 の共沈の有無をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、PLAP-1 を添加することにより、FGF-2 の FGFR1 に対する結合量が増加することが明らかとなった(図 4)。すなわち、PLAP-1 が FGF-2 と結合することで、FGF-2 の FGFR1 に対する結合能が増強されることが示唆された。また、WT MEFs において PLAP-1 と FGF-2 との免疫細胞化学解析を行った結果、PLAP-1 と FGF-2 との共局在が明らかとなった。さらに、WT および *Plap-1*^{-/-} MEFs における FGF-2 と FGFR1 との免疫細胞化学解析から、WT MEFs と比較して *Plap-1*^{-/-} MEFs では、FGF-2 と FGFR1 との共局在部位が減少していることが明らかとなった。

以上の結果から、PLAP-1 は FGF-2 と直接結合することで、FGF-2 の FGFR1 への結合能を増強することが示された。

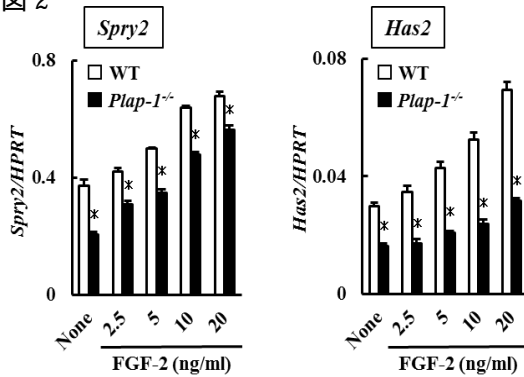
図 1



* : $p < 0.05$ vs WT、** : $p < 0.01$ vs WT

Plap-1^{-/-} MEFs における FGF-2 誘導性細胞増殖反応解析(Awata T et al. *J Dent Res.* 2015 より引用)

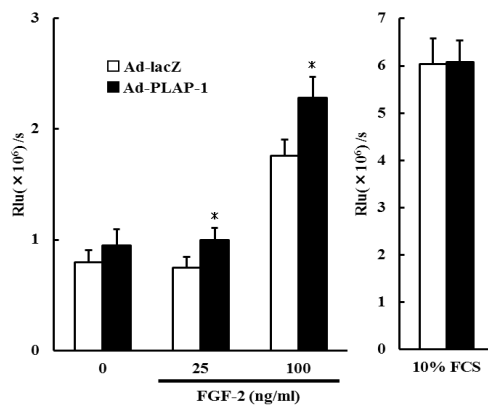
図 2



* : $p < 0.01$ vs WT

Plap-1^{-/-} MEFs における FGF-2 誘導性遺伝子発現解析(Awata T et al. *J Dent Res.* 2015 より引用)

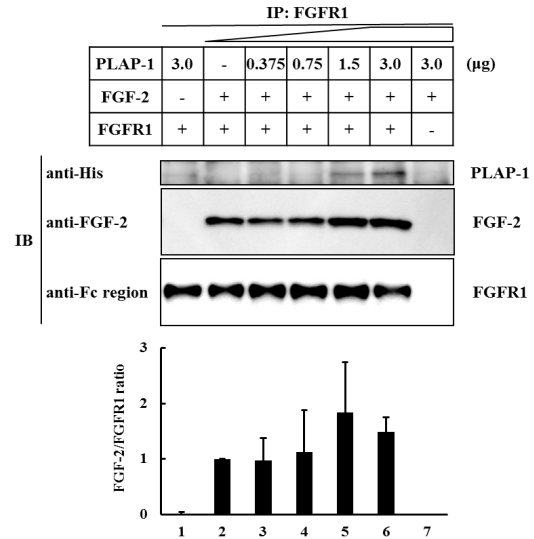
図 3



Rlu/s: Relative light unit/second、* : $p < 0.05$ vs Ad-lacZ

PLAP-1 発現が *Plap-1*^{-/-} MEFs の FGF-2 誘導性細胞増殖反応に与える影響の解析(Awata T et al. *J Dent Res.* 2015 より引用)

図 4



FGF-2 の FGFR1 への結合に PLAP-1 が与える影響の解析(Awata T et al. *J Dent Res.* 2015 より引用)

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 1 件)

Awata T, Yamada S, Tsushima K, Sakashita H, Yamaba S, Kajikawa T, Yamashita M, Takedachi M, Yanagita M, Kitamura M, and Murakami S. 2015. PLAP-1/Asporin Positively Regulates FGF-2 Activity. *J Dent Res.*94(10):1417-24. 査読有
DOI: 10.1177/0022034515598507.

〔学会発表〕(計 1 件)

粟田敏仁、山田 聡、山羽聡子、阪下裕美、津島賢一郎、竹立匡秀、村上伸也. 歯根膜特異的分子 PLAP-1 は FGF-2 の機能を促進する. 第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会 2014 年 10 月 19 日 兵庫県神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 : 平成 年 月 日
国内外の別 :

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：平成 年 月 日

取得年月日：平成 年 月 日

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粟田 敏仁 (AWATA, Toshihito)

大阪大学 歯学部附属病院 医員

研究者番号：30733026