

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20890245

研究課題名（和文） F-spondin を用いた歯周病治療薬開発に関する基礎研究

研究課題名（英文） A basic study of periodontal tissues regeneration by periodontal ligament specific gene, “ F-spondin” .

研究代表者

西田 英作 (NISHIDA EISAKU)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10512519

研究成果の概要（和文）：歯小囊特異的に発現する遺伝子、F-spondin は歯根膜発生過程において TGF- $\beta$  を取り巻く遺伝子を介して重要な役割を担っている。F-spondin の過剰発現ならびにノックダウン実験により培養ヒト歯根膜細胞の I 型コラーゲンならびに XII 型コラーゲンの発現を誘導し、そして F-spondin をノックダウンするとこれらの遺伝子発現が低下することが明らかになった。すなわち F-spondin は歯根膜形成過程において、コラーゲン線維形成を調節する細胞外マトリックスである可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： F-spondin, a specific dental follicle cell gene can play a important role during periodontal ligament development via TGF- $\beta$ . It became clear that F-spondin guided the type I collagen and type XII collagen expression of periodontal ligament cell by overexpression and knockdown experiment. Thus, F-spondin can control the form of the collagen matrix in the tooth development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 21 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：歯周病、歯根膜、創薬、再生、歯小囊

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯肉、歯根膜、歯槽骨に炎症が波及し、歯の指示を喪失する炎症性の疾患である。歯周病罹患部位に対する処置は、スクレーピング・ルートプレーニングなど原因除去療法が中心であるが、重篤な歯槽骨吸収を伴った場合、歯周ポケットが残存したり、著しく審美・機能を損ねた治癒形態をとらざるを得なかったりと問題点は多い。現在、臨床で歯周病患者に対する再生療法として、GTR法、エムドゲイン等が行われているが、適応症例は限定されており、上記のような重症患者には適さない。そこで、疾患や外傷により一度失った組織・臓器を再生させる再生医療を歯周組織再生に応用すべく、歯根膜発生メカニズムに基づいた歯周組織再生療法を確立することを目的とし、歯根膜マーカーの検索を試みている。

歯周病で侵された歯周組織を再生させるためには、歯周組織の発生ならびに再生機構を理解する必要がある。これらの問題に対応するためには、歯周組織発生の分子メカニズムの解明が必要となる。胎生期の歯胚発生過程では、歯周組織発生において中心的な役割を果たすのは、歯小囊である。歯小囊はcap stage 歯胚の外周に形成され、early bell stage、late bell stage と発生が進行し、歯根形成期には歯根膜、セメント質および歯槽骨を形成する細胞に分化していく。しかしながら歯小囊の分化に関わる分子については充分に理解されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

歯根膜の発生は、歯小囊細胞中に存在する前駆体細胞の分化により制御されている。しかし歯根膜細胞系譜決定に関わるマーカー分子が同定されていないため、これまでその

詳細な分子機構の解明は大きく立ち遅れてきた。本研究では歯根膜発生に関わる分子群の全貌を明らかにするために、ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイリングデータベースを作製し、網羅的解析により歯根膜マーカー分子の検索を試みた。ヒト歯根膜 cDNA ライブラリーを作製し、これまでに 10,000 個の EST の配列解析、ならびにクラスタリングを行い、機能別に分類してヒト歯根膜 EST データベース (periome データベース) を構築した。Periome データベースは 481 個の既知遺伝子群(78%)、101 個の機能未知遺伝子群(16%)と 35 個の機能未知翻訳産物群(6%)で構成されていた。

次に歯根膜細胞系譜決定に関わるマーカー分子を同定する目的で、細胞外マトリックスに分類される遺伝子群の中で歯小囊と歯根膜に特異的に発現する遺伝子群を *in situ* hybridization 法によりスクリーニングした。その結果、我々は F-spondin が歯胚発生過程において、歯小囊に特異的に発現することを見出した。

F-spondin は cap stage の歯小囊で発現がはじまり、early bell stage, late bell stage と、分化の進行に伴いその発現が歯小囊で特異的に増強する。出生後の歯根膜形成期における F-spondin の発現パターンを解析すると、F-spondin は生後 7 日目の歯根膜形成期の歯小囊では、発現が明らかに低下し、生後 35 日目の成熟した歯根膜においては、発現が消失することが分かった。この結果より F-spondin は、歯小囊の発生に関わる分子であることが示唆された。

F-spondin は、トロンボスポンディンタイプ I モチーフの繰り返し構造を有する TSP スーパーファミリーに属する細胞外マトリックスであり、これまでに F-spondin は、神経細胞の遊走と分化に関与していることが

報告されている。線虫変異体株の解析結果から、F-spondin の遺伝子変異により筋肉基底膜の形成不全が起きてしまい、その結果、形態形成の異常が生じることが報告されている。このことから、F-spondin が器官形成を制御する細胞外マトリックスであることが示唆される。また最近ではセメント芽細胞の分化に関わることが報告されているが、歯根膜発生過程における、その役割は全く不明である。

本研究課題では F-spondin の歯根膜形成過程における役割を解析するとともに、歯周病治療用創薬として開発することを目的としている。

### 3. 研究の方法

In vitro にて F-spondin の機能を調べるために、レンチウイルス発現システムを用いて、培養ヒト歯根膜細胞（以下 HPDL という）における過剰発現実験を行う。レンチウイルスは、非分裂細胞にも遺伝子導入が可能であることから、ほぼすべての脊椎動物細胞へ高効率に遺伝子を導入することが可能である。また、GFP を遺伝子導入した HPDL を Negative control として用いる。そして F-spondin が歯根膜に及ぼす影響を解析するために、歯根膜の、コラーゲン線維形成に関わる主な遺伝子である I 型コラーゲンと XII 型コラーゲンの発現をリアルタイム PCR 法にて解析を行う。

また、次に F-spondin ノックダウン実験にて I 型および XII 型コラーゲン遺伝子の発現を抑制するかを解析する。F-spondin に対する shRNAi 発現ベクターを、レンチウイルスシステムを用いて HPDL に感染させ、realtime PCR 法を用いて解析する。また、ネガティブコントロールとして shRNAi-Luciferase ウイルスを作製、使用する。F-spondin のノックダウン効果を確認後、I 型コラーゲンおよび XII 型コラーゲンの遺伝子発現 real-time PCR 法にて確認する。

### 4. 研究成果

まず F-spondin のレンチウイルス発現シス

テムを用いて、F-spondin が HPDL で過剰発現できているかを、Western Blotting 法にて解析した。F-spondin を遺伝子導入した HPDL では、F-spondin 蛋白は培養上清および細胞質画分で発現が確認された。一方、GFP を遺伝子導入した HPDL では、F-spondin 蛋白の発現は検出されないことから、HPDL において F-spondin が過剰発現されたことがわかった。

また、歯根膜形成に関わる代表的な遺伝子である I 型コラーゲンと XII 型コラーゲンの発現量をリアルタイム PCR 法にて解析した結果、F-spondin を過剰発現させた HPDL での I 型コラーゲンの遺伝子発現は、GFP 導入細胞と比較して 1.8 倍増加しており、また XII 型コラーゲンの発現は 5.7 倍増加することが判明した。

次に F-spondin ノックダウン実験を行った。F-spondin のノックダウン効果を、realtimePCR 法を用いて調べたところ、F-spondin を shRNAi でノックダウンした HPDL は、luciferase をノックダウンした細胞と比較して、ノックダウンによる HPDL の形態変化は観察されなかったが、その発現量は約 25% まで抑制されたことが確認できた。そこで F-spondin をノックダウンした HPDL を用いて I 型および XII 型コラーゲンの遺伝子発現を確認したところ、両方の遺伝子発現は明らかに低下していることが解った。

この結果より、F-spondin はコラーゲン線維形成に関わる遺伝子の発現を調節している可能性が示された。

### 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）

〔学会発表〕（計 2 件）

西田英作、吉成伸夫 新規歯小嚢マーカー分子、F-spondin の機能解析、第 68 回松本歯科大学学会、2009 年 7 月 11 日、塩尻

西田英作、齋藤正寛、吉成伸夫 新規歯小嚢マーカー分子、F-spondin の培養ヒト歯根膜

細胞を用いた機能解析、第 129 回秋季日本保存学会、2008 年 11 月 6 日、富山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 英作 (EISAKU NISHIDA)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10512519