

## 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 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592123

研究課題名（和文） 歯周靱帯の再生を主軸にした新規歯周再生療法の開発

研究課題名（英文）

Development of novel periodontal tissue therapy targeting for regeneration of periodontal ligament.

研究代表者

藤井 慎介 (FUJII SHINSUKE)

大阪大学・医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：60452786

研究成果の概要（和文）：ヒト歯根膜細胞に伸展力を負荷したところ発現量の増加した 216 個の遺伝子のうち、Wnt を歯周靱帯の再生を促進する因子として検出した。歯根膜細胞において Wnt5a 刺激により分化関連遺伝子発現が上昇し、運動能が促進した。また、Far-western 法および質量分析法を用いて、Wnt と結合する細胞外基質蛋白質 Nidogen-1 を同定した。二相分離法の結果、Nidogen-1 と結合した Wnt は親水相に分画された。Nidogen-1 と Wnt3a を混和後、細胞に刺激したところ、Wnt3a 刺激依存性のシグナル伝達が促進した。

研究成果の概要（英文）：We identified Wnt among 216 genes which were up-regulated in stretch loaded human periodontal ligament (PDL) cells, and we hypothesized that Wnt could regenerate PDL. Exogenous Wnt5a induced PDL differentiation related genes expression and stimulated migration of PDL cells. Furthermore, we clarified that Wnts bind to Nidogen-1, which is an extracellular matrix protein, using Far-western analysis and Mass analysis. Phase separation assay showed that Wnts binding Nidogen-1 were separated into hydrophilic phase. In addition, Nidogen-1 induced Wnt3a dependent intracellular signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯根膜・Wnt・細胞外基質・再生

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 歯根膜組織と進展力について

① 歯根膜組織には、咬合に伴う機械的  
刺激(圧迫力および伸展力)が作用しており、  
適切な咬合力は歯根膜組織を含む歯周組織

の恒常性の維持に重要である。歯根膜組織は  
線維成分等の細胞外基質に富んだ結合組織  
性の靱帯であり、歯牙を歯槽骨に結びつける  
アンカーとしての働き、咬合力の緩衝能、細  
菌感染からのバリアーとしての役割を果た

している。そのため歯周病などによって失われた歯周靭帯を再生させることによって歯周組織の機能を回復することが可能となる。

②伸展力が負荷された歯根膜細胞において、歯周靭帯の構成要素である弾性線維の肥厚を認めることが報告された(Tsuruga E ら他4名. J Periodont Res 44 巻 2号 2009)。このことから、伸展力が歯周靭帯の線維成分の合成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2)細胞外基質によるシグナル伝達の制御  
細胞外基質は、多細胞生物を構成するそれぞれの細胞を取り巻く環境因子であり、細胞の増殖や分化、接着、形態形成に必須である。歯根膜組織は細胞外基質に富んでいるが、その重要性について不明である。増殖分化因子は細胞外基質と結合し、その活性が制御されると考えられている。しかし、その知見は一部の増殖分化因子(FGF や HGF、TGF- $\beta$ )とヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)との関連にとどまっており、増殖分化因子と細胞外基質との相互作用についてはほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯周靭帯の再生を促進する因子を同定し、その因子と細胞外基質の相互作用に注目し、歯周靭帯の早期再生を可能にする新規の歯周組織再生療法を開発することを目的とした。

(1)歯周靭帯の再生を促進する遺伝子の同定  
機械的刺激として伸展力に着目し、この伸展力が負荷されたヒトプライマリー歯根膜細胞において発現が上昇する因子を検出した。

(2)検出因子が歯根膜細胞に与える影響について

①検出因子が歯根膜細胞の分化に与える影響について検討した。

②検出因子が歯根膜細胞の運動能に与える影響について検討した。

(3)検出因子と細胞外基質との相互作用について

①検出因子と相互作用する細胞外基質を同定した。

②同定した細胞外基質との相互作用が検出因子にの機能に与える影響について明らかにした。

## 3. 研究の方法

(1)歯周靭帯の再生を促進する遺伝子の同定  
ヒトプライマリー歯根膜細胞に線維芽細胞伸展装置システム(STREX社)を用いて進展力を負荷した群と負荷を加えていない群の歯根膜細胞から抽出し、精製したmRNAを用いてマイクロアレイ法をおこない、伸展力の負荷により発現量の増加した遺伝子を検出した。

(2)検出因子が歯根膜細胞に与える影響について

①検出因子の精製蛋白質刺激後の歯根膜細胞の遺伝子発現について検討した。

②Boyden チャンバー法および創傷治癒アッセイを用いて検出因子が歯根膜細胞の運動能に与える影響について検討した。

(3)検出因子と細胞外基質との相互作用について

①腫瘍細胞から調整した細胞外基質蛋白質の中で検出因子と結合する蛋白質についてFar-western法を用いて検出し、その蛋白質を質量分析法にて同定した。プルダウンアッセイにより結合の有無について検討した。

②同定した細胞外基質と検出因子を混和し、二相分離法を用いて生化学的特徴について検討した。また、それらを混和後に細胞に刺激し、検出因子の細胞に与える影響について生化学的および遺伝子発現について検討した。

## 4. 研究成果

(1)歯周靭帯の再生を促進する遺伝子の同定  
4種のヒトプライマリー歯根膜細胞に108%の伸展力を1時間負荷した。負荷した群と負荷を加えていない群の歯根膜細胞から抽出し、精製したmRNAを用いてマイクロアレイ法をおこない、伸展力の負荷により発現量の増加した遺伝子を216個検出した。その中でWnt3の発現が2.96倍に上昇していたことから(図1参照)、伸展力の負荷によりWntシグナル伝達が活性化されていることが示唆された。

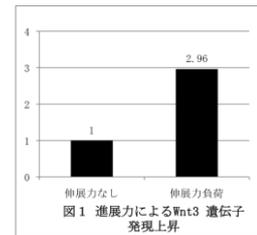


図1 伸展力によるWnt3 遺伝子発現上昇

(2)Wnt5a が歯根膜細胞に与える影響について

①精製Wnt5a刺激すると歯根膜細胞において分化関連遺伝子である $\alpha$ -SMAおよびperiostinの遺伝子発現が上昇した。

②Boyden チャンバー法および創傷治癒アッセイを用いて、精製Wnt5aが歯根膜細胞の運動能を促進することが明らかとなった。

(3)検出因子と細胞外基質との相互作用について

①腫瘍細胞から調整した細胞外基質蛋白質の中で検出因子と結合する蛋白質をFar-western法を用いて検出し、その蛋白質を質量分析法にてNidogen-1を同定した。プルダウンアッセイによりWnt3aおよびWnt5aがNidogen-1と直接結合することが明らかとなった(図2参照)。



図2 Wnt3aおよびWnt5aはNidogen-1と直接結合する

②Wnt は脂質修飾および糖鎖修飾をうけており、疎水性の特徴を有している。二相分離法の結果、Nidogen-1 は親水相に分画され、Nidogen-1 と結合した Wnt3a は親水相に分画された(図 3 参照)。また、Nidogen-1 と Wnt3a を混和後、細胞に刺激したところ、Wnt3a 刺激依存性の受容体 LRP6 のリン酸化レベル(図 4-a 参照)および標的遺伝子 *Axin2*(図 4-b 参照)の遺伝子発現が上昇した。

以上の結果より、歯周靭帯の再生を促進する因子として検出した Wnt が歯根膜細胞の分化・運動能を促進すること、細胞外基質が Wnt の生化学的特徴や作用を制御することが明らかとなった。

#### 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)

[雑誌論文] (計 9 件)

①Kono, K., Maeda, H., Fujii, S., Tomokiyo, A., Yamamoto, N., Wada, N., Monnouchi, S., Teramatsu, Y., Hamano, S., Koori, K., Akamine, A. Exposure to transforming growth factor- $\beta$ 1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines Cell Tissue Res (査読あり) (2013) 352:249-263 **10.1007/s00441-012-1543-0**

② Tomokiyo, A., Maeda, H., Fujii, S., Monnouchi, S., Wada, N., Hori, K., Koori, K., Yamamoto, N., Teramatsu, Y., Akamine, A. Alternation of extracellular matrix remodeling and apoptosis by activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway in human periodontal ligament cells. J. Cell. Biochem. (査読あり)113, 3093-3103 (2012) **10.1002/jcb.24186**

③Yamamoto, N., Maeda, H., Tomokiyo, A., Fujii, S., Wada, N., Monnouchi, S., Kono, K., Koori, K., Teramatsu, Y., Akamine, A. Expression and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on periodontal ligament cells. J. Clin. Periodontol. (査読あり)39, 555-564 (2012) **10.1111/j.16000-051X.2012.01881.x**

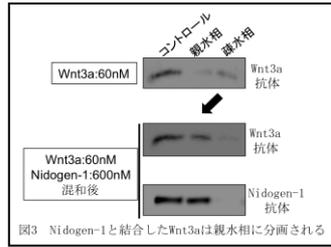


図3 Nidogen-1と結合したWnt3aは親水相に分画される

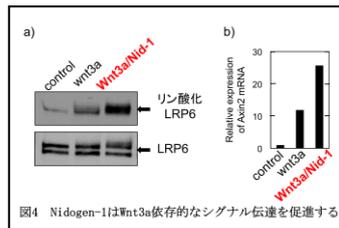


図4 Nidogen-1はWnt3a依存的なシグナル伝達を促進する

④ Tomokiyo, A., Maeda, H., Fujii, S., Monnouchi, S., Wada, N., Kono, K., Yamamoto, N., Koori, K., Teramatsu, Y., Akamine, A. A multipotent clonal human periodontal ligament cell line with neural crest cell phenotypes promotes neurocytic differentiation, migration, and survival. J. Cell. Physiol. (査読あり)227, 2040-2050, 2012 **10.1002/jcp.22933**

⑤ Maeda, H., Tomokiyo, A., Koori, K., Monnouchi, S., Fujii, S., Wada, N., Kono, K., Yamamoto, N., Saito, T., Akamine A. An in vitro evaluation of two resin-based sealers on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells. Int. Endod. J. (査読あり) 44, 425-431, 2011 **10.1111/j.1365-2591.2010.01845.x**

⑥ Kwon, SM., Kim, SA., Fujii, S., Maeda, H., Ahn, SG., Yoon, JH. Transforming growth factor  $\beta$ 1 promotes migration of human periodontal ligament cells through heat shock protein 27 phosphorylation. Biol. Pharm. Bull. (査読あり)34, 4, 486-489, 2011 **10.1248/bpb.34.486**

⑦ Monnouchi, S., Maeda, H., Fujii, S., Tomokiyo, A., Kono, K., Akamine, A. The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. J. Dent. Res. (査読あり) 90, 2, 181-185, 2011 **10.1177/0022034510382118.**

⑧ Maeda, H., Nakano, T., Tomokiyo, A., Fujii, S., Wada, N., Monnouchi, S., Hori, K., Akamine, A. Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. J. Endod. (査読あり) 36, 647-652, 2010 **10.1016/j.joen.2009.12.024.**

⑨ Fujii, S., Maeda, H., Tomokiyo, A., Monnouchi, S., Hori, K., Wada, N., Akamine, A. The effects of TGF- $\beta$ 1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human periodontal ligament stem/progenitor cell line. Cell Tissue Res. (査読あり) 342, 233-242, 2010 **10.1007/s00441-010-1037-x**

[学会発表] (計 12 件)

藤井慎介、基底膜蛋白質 Nidogen-1 は Wnt3a と結合し Wnt/ $\beta$  カテニン経路の活性化を促進する、第 85 回日本生化学会大会、2012、12 月、15 日

[図書] (計 2 件)

① Maeda, H., Monnouchi, S., Fujii, S.,

Tomokiyo, A., Wada, N., Akamine, A  
Potentials of periodontal ligament  
stem/progenitor cell lines in  
regeneration studies. Oral Craniofac  
Tissue Eng. 1,4,289-299, (2011)

②Maeda, H., Wada, N., Fujii, S., Tomokiyo,  
A., Akamine, A. Promise of periodontal  
ligament stem cells in regeneration of  
periodontium. Stem Cell Res. Ther. 33,  
1-3 (2011)

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科分子病態生化学

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 慎介 (FUJII SHINSUKE)

大阪大学・医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：60452786

### (2) 研究分担者

赤峰 昭文 (AKAMINE AKIFUMI)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：117053

(H23→H24:連携研究者)

前田 英史 (MAEDA HIDEFUMI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10284514

(H23→H24:連携研究者)

和田 尚久 (WADA NAOHISA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60380466

(H23→H24:連携研究者)

友清 淳 (TOMOKIYO ATSUSHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20507777

(H23 まで分担者として参画)