

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390529
 研究課題名（和文）ペリオドンタル・システムバイオロジーの創生-歯周病関連遺伝子探求の分子基盤研究-
 研究課題名（英文）Periodontal system biology: analysis of molecular bases of periodontal disease associated genes.
 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

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、歯周組織生命システムネットワークデータベース（PsBND: Periodontal systems Biology Network Database）を構築した。PsBND データベースを他のヒト臓器・組織での遺伝子発現データベースと比較検討することにより、歯根膜特異的分子群として、Periostin アイソフォーム群、機械的刺激によって発現誘導されるグルタミン酸シグナル関連分子群、歯根膜特異的分子 PLAP-1 を見出した。同分子群の発現・機能解析の結果、歯根膜組織の恒常性維持に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed the periodontal system biology network database (PsBND) and analyzed the PsBND database comparing with other gene expression databases in order to identify periodontal ligament-specific genes. We found novel Periostin isoforms, glutamate-signaling associated molecules induced by mechanical stress and PLAP-1 periodontal ligament-specific. Functional analysis revealed that these molecules harmonized to keep homeostasis of periodontal ligament tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：歯周病学

1. 研究開始当初の背景

システムバイオロジーとは、ある生命現象を数百～数千の遺伝子・分子から構成された1つのネットワークとして包括的に理解するという新しい生物医学の分野で、細胞増殖・分化、神経再生等の基礎医学から癌治療学、メタボリックシンドローム等の臨床医学においても日本の研究グループを中心とした

先端的な研究が進められており、個別遺伝子研究からネットワーク生物学へと世界の研究アプローチの大転換が起きている (Kitano, H. *Nature Review Genetics*. 5:826, 2004)。多因子性疾患である歯周病においても、複数の遺伝因子、環境因子が複雑に絡み合うことにより疾病発症に関与していると考えられており、歯周病を真に理解するためには、個

別の遺伝子・分子を追求するだけでなく、このシステムバイオロジーに立脚した新しい研究アプローチが必須である。

これまでに我々の研究室では、歯周病研究にゲノム科学を応用した結果、*in vivo* ヒト歯根膜組織の網羅的遺伝子発現プロファイル解析 (Yamada S, et al. *Gene* 275:279, 2001)、世界で唯一のヒト歯根膜解析用カスタマイズド DNA マイクロアレイの開発、さらには歯根膜恒常性維持に重要な新規遺伝子 PLAP-1 の発見 (Yamada S, et al. *J Dent Res.* 85:447, 2006, Yamada S, et al. *J Biol Chem.* 282:23070, 2007) など、歯周組織におけるトランスクリプトーム解析を展開し、世界に先駆けた研究成果を挙げている。さらに我々は、歯周病研究の分子基盤となる 20,000 個ベースの完全長ヒト歯根膜遺伝子発現データベースの構築、歯根膜幹細胞のバイオインフォマティクス解析、次世代型歯周組織再生療法に応用可能な脂肪組織由来間葉系幹細胞のトランスクリプトーム解析を展開しており、本研究課題では、これら研究成果をさらに発展させ、統合することにより、世界初のペリオドンタル・システムバイオロジーの確立を目指す。

2. 研究の目的

歯周病を「歯周組織における生命システムの破綻」として理解した上で、歯周病の病因、病態、治療、再生過程を分子・遺伝子から構成されたネットワークとして解明することにより歯周病関連遺伝子の同定を行い、遺伝子・分子レベルでの早期診断法の開発、新規の再生治療薬・療法の開発等の一助となる研究基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織生命システムネットワークデータベースの構築と解析

歯周組織における *in vivo* 恒常性維持の分子・遺伝子制御メカニズム情報を包含したヒト歯周組織遺伝子発現プロファイル、ヒト完全長 20K 歯根膜遺伝子発現データベース

(Ful-PerioGen データベース)、咬合性外傷による歯周組織破壊の *in vitro* 遺伝子発現解析、歯根膜細胞分化誘導遺伝子発現プロファイル解析の各実験データを統合することで歯周組織生命システムネットワークデータベース (PsBND: Periodontal systems Biology Network Database) を構築した。

PsBND データベースを他のヒト臓器・組織での遺伝子発現データベースと比較検討することにより、新規の遺伝子・分子群、他の組織での発現が低く歯根膜に特異的に発現している遺伝子・分子群を抽出した。さらに PubMed 文献検索と組み合わせることにより、これまでに歯根膜組織における機能・

発現に関する報告がない遺伝子・分子群を抽出した。

(2) 歯根膜特異的遺伝子群の *in vitro* 解析

データ解析により抽出した遺伝子のうち歯根膜特異的 Periostin アイソフォームについては、コードタンパクを強発現させる発現ベクターを構築し、マウス歯根膜細胞株

(MPDL22) に遺伝子導入することで、強発現した細胞株を樹立した。同細胞株を石灰化誘導培地にて長期培養し、遺伝子操作が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程に及ぼす影響を石灰化物形成能にて比較検討した。グルタミン酸関連分子群については、培養歯根膜細胞を石灰化誘導培地にて培養する際に、外来性にグルタミン酸を添加し、その際の細胞分化過程をアルカリフォスターゼ (ALPase) 活性を指標に比較した。

(3) 歯根膜特異的遺伝子群の *in vivo* 発現解析

6 週齢の雄 ICR 系マウスの上顎第 1 臼歯にスプリングワイヤーを装着し、ダイヤルテンションゲージを用いて 10 g の矯正力を口蓋側に向けて付加した。矯正力付加前と付加後 12 時間、24 時間後において第 1 臼歯口蓋根を含む厚さ約 7 μm の横断切片を作製し、グルタミン酸関連遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。さらに、PsBND データベースにも見出された歯根膜特異的遺伝子 PLAP-1 について、マウス歯胚発生期におけるタンパク発現を抗 PLAP-1 抗体を用いた免疫組織染色にて解析した。

(4) 歯根膜特異的遺伝子改変マウスの作製と歯周組織表現型解析

歯根膜特異的 Periostin アイソフォームおよび歯根膜特異的分子 PLAP-1 のタンパクコード領域をマウス組織での遺伝子強発現の実績がある CAG プロモーター下流に組み込み、トランスジェニック (TG) ベクターを構築した。同 TG ベクターを受精直後のマウス卵子にマイクロインジェクションにて遺伝子導入後、子宮に戻すことにより、歯周組織において各遺伝子を強発現するトランスジェニックマウスを作製した。さらに、PLAP-1 については、コード遺伝子領域を含むマウスゲノムクローンを単離し、ネオマイシン遺伝子を挿入することで PLAP-1 ノックアウト

(KO) ベクターを構築した。次に、同 KO ベクターを用いた相同組み換えにより樹立した遺伝子組み換え ES 細胞株から PLAP-1 KO マウスを作製し、PLAP-1 遺伝子を欠損させた場合の歯周組織表現型を解析した。

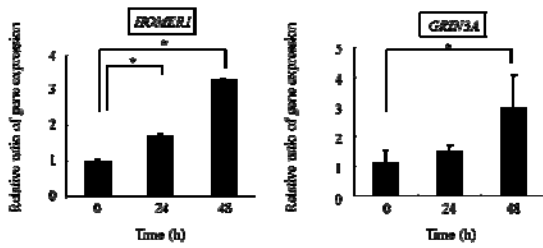
4. 研究成果

(1) 歯周組織生命システムネットワークデータベースの構築と解析

構築した歯周組織生命システムネットワークデータベース (PsBND) の解析から、歯

根膜および骨膜特異的な発現を示す Periostin において、新しい歯根膜特異的 Periostin アイソフォームを見出した。さらに、歯根膜細胞において機械的刺激により発現誘導されるグルタミン酸関連遺伝子を見出した (図 1)。また、歯根膜に非常に特異的な発現を示す PLAP-1 遺伝子の発現も見出された。本研究では、以上の遺伝子群に注目して更なる詳細な解析を進めていった。

図1 機械的刺激によるグルタミン酸関連遺伝子の発現上昇

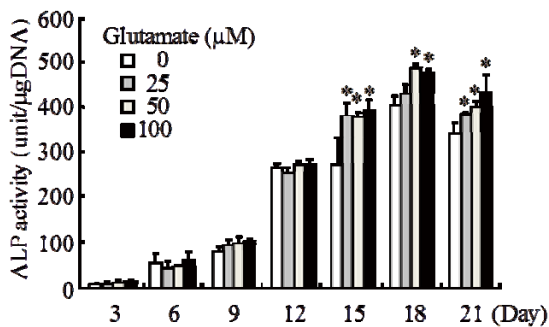


(2) 歯根膜特異的遺伝子群の *in vitro* 解析

歯根膜特異的 Periostin アイソフォームを過剰発現した MPDL22 株を抗 Integrin α v 中和抗体存在下にて石灰化誘導培地で培養を行い、石灰化物形成に対する影響について検討するために培養 12 日目にアリザリン染色にて石灰化物形成の比較を行った。その結果、コントロール抗体添加群に比べ、抗 Integrin α v 中和抗体添加群では歯根膜特異的 Periostin アイソフォームで誘導される歯根膜細胞の石灰化物形成が有意に抑制された。

次に、培養ヒト歯根膜細胞を石灰化誘導培地にて硬組織形成細胞へと分化誘導する際、外来性にグルタミン酸を添加し、21 日間培養を続けた。その結果、グルタミン酸を添加すると、培養 15 日目以降、対照群と比較して、濃度依存的に ALPase 活性が有意に上昇することが明らかとなった (図 2)。

図2 グルタミン酸による歯根膜細胞分化促進

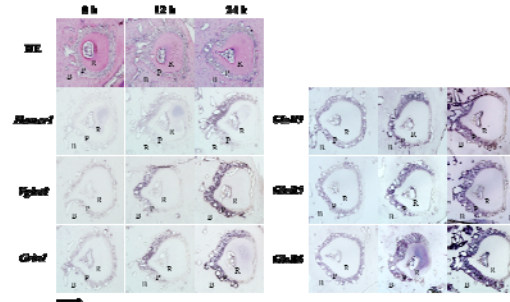


(3) 歯根膜特異的遺伝子群の *in vivo* 発現解

析

マウス矯正モデルにおいて実際に歯に矯正力を付与し、歯根膜に機械的刺激を加えた際のグルタミン酸関連遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにて解析した。その結果、機械的刺激が加わる伸展側の歯根膜においてグルタミン酸関連遺伝子 (*Homer1*, *Vglut1*, *Grin1*, *GluR3*, *GluR5*, *GluR6*) の発現が上昇することが明らかとなった (図 3)。

図3 マウス矯正モデルにおけるグルタミン酸関連遺伝子の発現



次に、歯胚発生期における PLAP-1 タンパクの発現を解析したところ、帽状期、鐘状期において PLAP-1 タンパクの明らかな発現は検出されなかった。一方、鐘状期後期以降の歯小嚢 (将来、歯根膜となる組織) 領域において PLAP-1 タンパクの発現が認められた。

(4) 歯根膜特異的遺伝子改変マウスの作製と歯周組織表現型解析

歯根膜特異的 Periostin アイソフォームおよび歯根膜特異的分子 PLAP-1 トランスジェニックマウスの作製に成功した。同マウスは、交配可能で成体における明らかな形態学的な異常は認めなかった。歯周組織の表現型を組織学的に解析した結果、明らかな表現型は見出されなかった。さらに、PLAP-1 ノックアウトマウスの作製に成功した。現在、ヘテロ型を交配させることによりホモ型マウスの作出を行っている。

以上の結果から、PsBND データベースから見出された様々な歯根膜特異的遺伝子・分子が、歯根膜の発生・分化・組織の恒常性維持・再生などの各ステージで発現・機能することで、歯周組織における生命システムを司っていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Fujihara C, Yamada S, Ozaki N, Takeshita N, Kawaki H, Takano-Yamamoto T, Murakami S. Role of

Mechanical stress-induced glutamate signaling-associated molecules in cytodifferentiation of periodontal ligament cells. J Biol Chem 285:28286-28297, 2010. 査読有り

〔学会発表〕(計 11 件)

① Ozaki N, Yamada S, Fujihara C, Tauchi T, Kajikawa T, Awata T, Ozawa Y, Murakami S, Cathepsin K expression in human periodontal ligament cells, 89th IADR, 2011. 3. 18. San Diego, USA

② Yamada S, Mechanical stress induced glutamate signaling associated molecules regulate the cytodifferentiation of periodontal ligament cells, 韓国歯周病学会 50 周年記念大会、2010. 11. 28. ソウル、韓国

③ 尾崎亘弘、山田 聡、藤原千春、田内拓史、梶川哲宏、栗田敏仁、小澤康宏、村上伸也、ヒト歯根膜組織完全長 cDNA ライブラリーを用いた Cathepsin K の同定および機能解析、第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2010. 10. 28.

④ Kajikawa T, Yamada S, Ozawa Y, Fujihara C, Tauchi T, Ozaki N, Murakami S, Gene polymorphism in PLAP-1/asporin regulates mineralization of periodontal ligament cells, 88th IADR, 2010. 7. 16. Barcelona, Spain

⑤ 梶川哲宏、山田 聡、小澤康宏、藤原千春、田内拓史、尾崎亘弘、村上伸也、マウス歯周組織発生過程における PLAP-1 タンパクの発現解析、第 132 回日本歯科保存学会春季学術大会、2010. 6.4. 熊本市

⑥ 田内拓史、山田 聡、前田憲一郎、藤原千春、梶川哲宏、尾崎亘弘、村上伸也、新規歯根膜特異的 Periostin アイソフォーム TypeII の機能解析、第 53 回春季日本歯周病学会、2010. 5.14. 盛岡市

⑦ 藤原千春、山田 聡、田内拓史、梶川哲宏、尾崎亘弘、小澤康宏、村上伸也、グルタミン酸シグナルによる歯根膜細胞の分化制御、第 131 回日本保存学会秋季大会、2009. 10. 30. 仙台市

⑧ 山田 聡、歯周組織恒常性維持の分子基盤研究・歯根膜特異的分子 PLAP-1 の解析、第 59 回春季日本歯周病学会、2009. 5. 16. 岡山市

⑨ 梶川哲宏、山田 聡、小澤康宏、藤原千春、田内拓史、平野裕之、村上伸也、マウス歯周組織における PLAP-1 タンパクの発現、第 59 回春季日本歯周病学会、2009. 5. 15. 岡山市

⑩ Yamada S, Tauchi T, Fujihara C, Kajikawa T, Ozawa Y, Kitamura M, Murakami S, Periodontal ligament-specific periostin positively regulates mineralization of periodontal ligament cells, 87th IADR, 2009. 4. 3. Miami, USA

⑪ Fujihara C, Yamada S, Yoneda S, Tauchi T, Kajikawa T, Ozawa Y, Murakami S, Mechanical stress-induced glutamate signaling in periodontal ligament cells, 86th IADR, 2008. 7. 5. Toronto, Canada

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

柳田 学 (YANAGITA MANABU)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80379081