

## 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24年5月14日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791767

研究課題名（和文）セメント芽細胞マーカー遺伝子 f-spondin の機能解明

研究課題名（英文）The investigation on the function of cementblast marker gene, f-spondin.

研究代表者

北川 雅恵 (KITAGAWA MASAE)

広島大学・病院・助教

研究者番号：10403627

研究成果の概要（和文）：

F-spondin (SPON1)の歯周組織における機能を解明するために、in vivo および in vitro で検討を行った。In vivo では、トランスジェニックマウス(SPON1-Tg)を作製し、根尖部のセメント質形成量を wild type と比較し、SPON1-Tg において軽度の増加が認められた。In vitro ではヒトセメント芽細胞 (HCEM) に BMP7 を添加すると OPN および BSP の発現の増加が認められ、これまでの我々の結果と併せ、SPON1 は BMP7 を分泌させ石灰化を誘導することが示された。一方、歯周病原細菌由来 LPS 刺激により、歯周靭帯細胞と比較して HCEM および SPON1 過剰発現株では IL-6 および PGE2 の産生が有意に抑制された。よって、SPON1 は石灰化だけでなく、炎症も制御する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the function of f-spondin (SPON1) in the periodontal tissue, we researched in vivo and in vitro. In vivo, we made transgenic mouse (SPON1-Tg), and compared the amount of periapical cementum formation of SPON1-Tg with that of wild type. SPON1-Tg showed the slight increase of the cementum formation. In vitro, this experiment showed that expressions of OPN and BSP in human cementoblast-like cells (HCEM) were increased by BMP7 peptide. On the other hand, the expression of IL-6 and production of PGE2 induced by Aa-LPS in HCEM and SPON1 overexpressing HPL cells were significantly inhibited as compared with periodontal ligament cells. These results suggested the possibility that SPON1 would control not only the calcification but the inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：セメント芽細胞、F-spondin、歯周組織

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでにヒトセメント芽細胞株

(HCEM)を樹立し(Kitagawa et al., Bone, 2007)、HCEM 細胞と同一個体由来の歯周

靱帯 (HPL) 細胞の遺伝子を網羅的に解析することにより HCEM 細胞にのみ発現する f-spondin (SPON1) を同定した。SPON1 は歯周組織において HCEM にのみ発現が認められること、また、未分化なセメント芽細胞として位置づけられている HPL 細胞に SPON1 を過剰発現させることにより、HPL 細胞の石灰化が促進することを明らかにし、SPON1 がセメント質形成に関与する可能性があることを報告してきた (Kitagawa et al., BBRC, 2007)。

## 2. 研究の目的

本研究では (1) SPON1 のセメント質形成における役割を *in vivo* において明らかにするため、SPON1 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (SPON1-Tg マウス) を作製し、組織学的検討を行うこと (2) HCEM における石灰化促進のメカニズムを解明することおよび (3) 炎症時のセメント芽細胞における SPON1 の機能を明らかにすることを目的に検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) SPON1-Tg マウス

SPON1-Tg マウスを作製するために、発現コンストラクトを作製し、このコンストラクトをマウス受精卵にマイクロインジェクション後、ファウンダーマウスを得た。さらに、交配を行い、Tg マウスの系統化を行った。

得られた SPON1-Tg マウスおよび wild type (雄、10-12 週齢) の、組織標本作製し、全身臓器の異常および根尖部のセメント質形成量を解析ソフト (Image-J) を用いてその面積を比較検討した。

### (2) SPON1 の石灰化促進メカニズムの解明

これまでの研究で、SPON1 は HCEM 細胞の石灰化を促進している可能性が示され、さらに HPL 細胞に SPON1 を過剰発現させた (HPL-SP) 細胞と HPL 細胞のマイクロアレイを行ったところ、HPL-SP にのみ強発現する遺伝子として BMP7 を同定した。本研究では BMP7 のペプチド (R&D) を用いて、HCEM 細胞の石灰化分化への影響を検討した。

### (3) HCEM 細胞に対する歯周病原細菌由来 LPS の影響

HCEM 細胞を用い、歯周病原細菌由来 Aa-LPS 刺激による SPON1 発現と石灰化マーカーおよび炎症性サイトカイン発現について *in vitro* において検討を行った。また、SPON1 ノックダウンによる影響を検討するため、siSPON1 を用いて検討を行った。

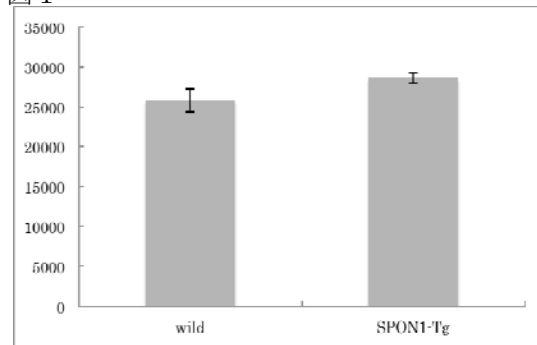
さらに、上記の結果より IL-6 の発現に注

目し、HCEM 細胞、HPL 細胞および (HPL-SP) 細胞における IL-6 および PGE2 の発現について RT-PCR、ELISA により検討を行った。

## 4. 研究成果

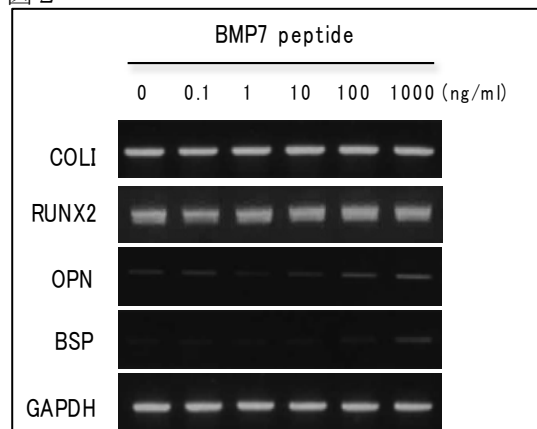
(1) 作製した SPON1-Tg マウスの組織学的検討を全身の各臓器 (脳、舌、甲状腺、肺、心臓、胃、肝臓、膵臓、脾臓、腸、腎臓) において行ったが、wild type マウスと比較して明らかな違いは認められなかった。次に、セメント質形成を比較するために、10-12 週齢の wild type および SPON1-Tg マウスの下顎臼歯の歯根を用いて検討した。HE 標本では SPON1-Tg マウスの下顎臼歯歯根は、wild type マウスと比較して有細胞性セメント質の軽度の形成量増加がみられたが、有意差は認められなかった (図 1)。

図 1



(2) BMP7 ペプチドを HCEM 細胞に添加したところ、1  $\mu\text{g/ml}$  でボーンシアロプロテイン (BSP) の発現が、100  $\text{ng/ml}$  以上でオステオポンチン (OPN) の発現増強が認められた (図 2)。

図 2

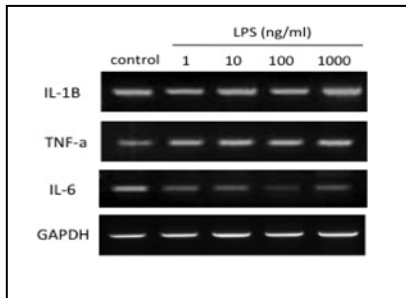


また、Hakki らもマウスのセメント芽細胞株 OCCM30 細胞を用いた実験で、BMP7 ペプチドにより石灰化能が促進されることを報告している (J Periodontol, 2010)。

我々のこれまでの研究内容と併せると、セメント芽細胞の分化にはBMP7が深く関わっており、このBMP7はセメント芽細胞自身がSPON1により産生・分泌され、オートクライン的にセメント芽細胞に作用していることが明らかとなった。

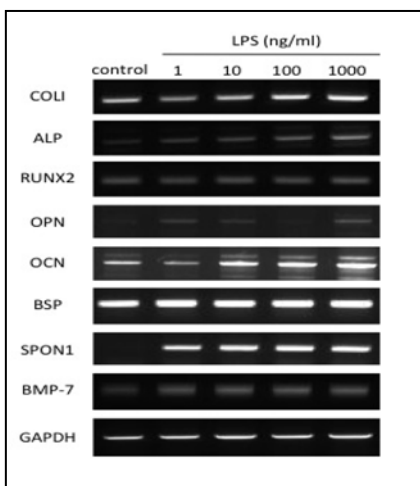
(3) LPSはHCEM細胞のSPON1の発現を著しく増加させ、IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ の発現は軽度増加したが、有意差は認められなかった。一方、IL-6の発現はLPS刺激により減少した(図3)。

図3



また、石灰化関連遺伝子であるタイプIコラーゲンやアルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、BMP7の発現は増加した(図4)。臨床的にセメント質は歯槽骨と比較して、歯周炎が生じても吸収が起こりにくい。よって、本結果は、炎症時においてHCEM細胞がSPON1やBMP7および石灰化関連遺伝子の発現を増強して石灰化を亢進させ、セメント質が吸収されることに抵抗している可能性を示している。

図4

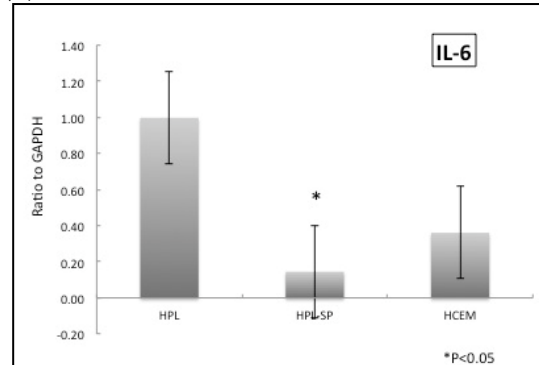


さらに、siSPON1をトランスフェクションし、LPSによる炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8)の発現を検討したが、いずれのサイトカインのmRNA発現においてもSPON1ノックダウンによる有意な差は認め

られなかった。

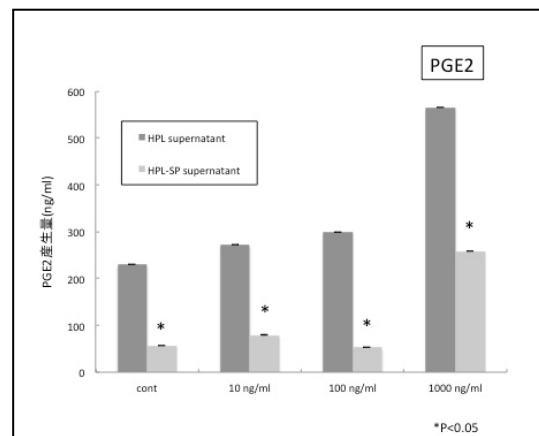
一方、HPL-SP細胞では、HPL細胞と比較して炎症性サイトカインのうちIL-6の発現が有意に抑制され(\*P<0.05)、HCEM細胞でもHPL細胞と比較してIL-6の発現低下が認められた(図5)。

図5



LPS刺激によるPGE2のタンパク産生量は、HPL細胞およびHPL-SP細胞いずれにおいてもLPSにより促進されたが、HPL細胞と比較するとHPL-SP細胞ではPGE2産生量は約1/3に抑制された(\*P<0.05)。既にPGE2がNK- $\kappa$ Bを介してIL-6の転写を制御することは報告されており、本結果もPGE2産生量の低下により、IL-6のmRNA発現がHPL-SPやHCEMでは減少したと考える(図6)。

図6



以上の結果より、成熟セメント芽細胞に恒常的に発現しているSPON1はBMP7を介し、セメント芽細胞の石灰化能を高めセメント質形成、維持に関わる事が明らかとなった。また、LPS刺激でSPON1発現が著しく上昇し、BMP7や石灰化関連遺伝子の発現上昇を介してセメント質形成を亢進するばかりでなく、炎症性メディエーターであるPGE2産生およびIL6発現を抑制することで炎症に伴うセメント質吸収を負に制御している可能性が示された。

今後は、SPON1の炎症に抵抗するメカニズムの詳細を明らかにしていく予定である。

さらに、今回作製したSPON1のトランスジェニックマウスは我々が世界で初めて作製したものである。今回の結果では、有意差が得られなかったが、今後は週齢を変え、セメント質の形成量を比較検討していく。

#### 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)

Kitagawa M. et al., F-spondin regulates the differentiation of human cementoblast-like (HCEM) cells via BMP7 expression., BBRC, 査読有, 2012, 418, 229-233.

[学会発表] (計 1 件)

Kitagawa M. F-spondin promotes the differentiation of human periodontal ligament cells. The 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 10 Oct 2011, Hiroshima, Japan.

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北川 雅恵 (KITAGAWA MASAE)

広島大学・病院・助教

研究者番号：10403627

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

① 高田 隆 (TAKATA TAKASHI)

広島大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10154783

② 宮内 睦美 (MIYAUCHI MUTSUMI)

広島大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50169265