

Fig. 3. Mutation to LRR5/PLAP-1/aspurin rescues the inhibitory effects of PLAP-1/aspurin on BMP-2-induced cytodifferentiation. (A) Schematic representation of the model structure of mouse PLAP-1/aspurin viewed from the concave surface. The overall feature is a typical long leucine-rich repeat fold, and the molecular surface is occupied with many aromatic and charged residues. In general, protein/protein interactions prefer strong hydrophobic interaction by using aromatic residues. The existence of charged residues would probably make the monomer stable as well as the dimer conformation. (B) Close-up view of the potential binding site. Glu-194 is shown in green space-fill in the model and Arg-170 (right side) and Arg-219 (left side) are shown in purple space-fill. The other residues are shown in line and their carbon, nitrogen, hydrogen and oxygen atoms are colored in gray, blue, white and red, respectively. The secondary structure is represented with ribbon; the β -sheet is drawn in yellow, turn in blue, loop in cyan and helix in red. (C) Schematic structure of PLAP-1/aspurin. PLAP-1/aspurin contains 10 LRRs in the core protein. We introduced the single nucleotide mutation, for mutant I (Glu-194 to Lys), mutant II (Glu-194 to Gly), and mutant III (Arg-170 to Glu, Arg-219 to Glu). Letters on the right side indicate the charge of residues 170, 194, and 219 after the induction of the mutation. (D) ALPase activity in MPDL22 cells stably expressing wild-type or mutant PLAP-1/aspurin cultured for 48 h with BMP-2 (100 ng/ml). MPDL22 stably transfected with expression vector was the control. Letters under the vector name indicate the charge of residues 170, 194, and 219. (E) Real-time PCR analysis of osteix mRNA expression using total RNA isolated from the above-mentioned MPDL22 transfectants. Letters under the vector name indicate the charge of residues 170, 194, and 219. Data represent means \pm SEM in triplicate assays. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test) vs. control. (For interpretation of color mentioned in this figure the reader is referred to the web version of the article.)

Therefore, we generated mutants of mouse PLAP-1/aspurin. The cells expressing mutant I (E194K) and mutant II (E194G) showed almost equivalent ALPase activity and osteix mRNA expression to control but the cells expressing mutant III (R170E, R219E) showed half the inhibition for BMP-2 stimulation compared to wild-type PLAP-1/aspurin. To introduce the mutation Glu-194 for Lys (mutant I), positively charged residues were gathered at the center of the concave surface, whereas to introduce the mutation Arg-170 and Arg-219 for Glu (mutant III), negatively charged residues were gathered. Although each of them exhibited ionic instability, mutant I showed complete rescue but mutant III showed half rescue. This fact raised the possibility that Glu-194 (LRR5) of PLAP-1/aspurin plays a critical role in the interaction with BMP-2

and that Arg-170 and Arg-219 would be supportive. It was reported that biologically active decorin was a monovalent ligand for various extracellular matrix proteins, growth factors, and cell surface receptors [21]. However the other report challenged this view. The concave surface of decorin was involved in a high-affinity dimer interaction, and, therefore, was unlikely to be available for ligand binding [22]. The sites where we introduced the mutation were considered to be involved in direct contact at the dimer interface in terms of this report. There is the possibility that Glu-194 and surrounding charged residues are not the exact residues to bind to BMP-2 but the residues involved in the dimer-to-monomer transition of PLAP-1/aspurin, which leads to the association of PLAP-1/aspurin with BMP-2. Although there exists such contradic-

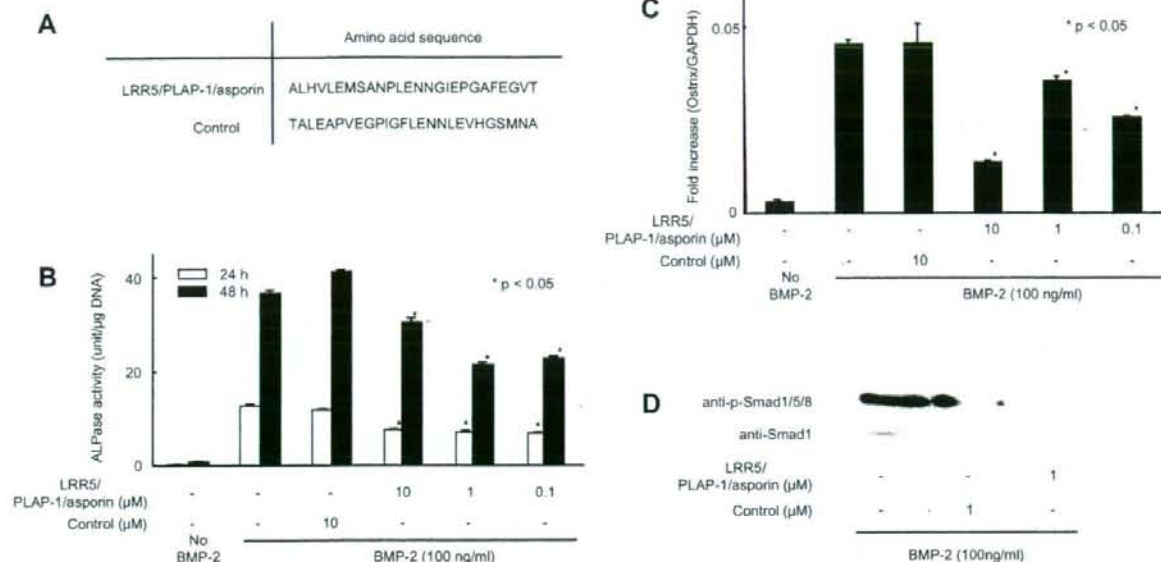


Fig. 4. LRR5/PLAP-1/asporin peptide inhibits the BMP-2-induced cytodifferentiation. (A) The amino acid sequences of LRR5/PLAP-1/asporin and control peptides. (B) ALPase activity in MPDL22 cells cultured for 24 h and 48 h with BMP-2 (100 ng/ml) in the presence or absence of LRR5/PLAP-1/asporin at indicated concentrations or control (10 μM). (C) Real-time PCR analysis of osterix mRNA expression using total RNA isolated from the above-mentioned MPDL22 cells of 48 h treatment. Data represent means ± SEM in triplicate assays. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test) vs. control peptide treatment. (D) The effect of LRR5/PLAP-1/asporin on the BMP-2-induced phosphorylation of Smad1/5/8 determined by Western blot analysis using anti-phospho-Smad1/5/8 antibody (upper panels). Whole cell extracts were lysed from MPDL22 cells after 30 min treatment with BMP-2 (100 ng/ml) in the presence or absence of LRR5/PLAP-1/asporin (1 μM) or control (1 μM). The lower panel shows the expression of Smad1 to demonstrate normalized loading of protein.

tion at the present, our results using the LRR5/PLAP-1/asporin peptide strongly suggests the direct interaction via LRR5 between PLAP-1/asporin and BMP-2. The detailed role of the central LRR and the residues within it upon the PLAP-1/asporin–BMP-2 interaction needs to be elucidated using PLAP-1/asporin protein in future studies.

This work is first to report the structure–function relationship between PLAP-1/asporin and BMP-2. PLAP-1/asporin can inhibit BMP-2-induced cytodifferentiation via the center part of LRR, especially LRR5, so that the PDL would not be mineralized but act as the connective tissue showing high osteoblastic potential *in vivo*.

Acknowledgments

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (Nos. 17390560, 17390561, 19771611), and the 21st Century COE entitled “Osaka University Graduate School of Dentistry supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. It was also supported by a grant from the Smoking Research Foundation.

References

- 1] W. Beertsen, C.A. McCulloch, J. Sodek, The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue, *Periodontol* 2000 13 (1997) 20–40.
- 2] P. Lekic, C.A. McCulloch, Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue, *Anat. Rec.* 245 (1996) 327–341.
- 3] B.M. Seo, M. Miura, S. Gronthos, P.M. Bartold, S. Batouli, J. Ibrahim, M. Young, P.G. Robey, C.Y. Wang, S. Shi, Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *Lancet* 364 (2004) 149–155.
- 4] Y. Saito, T. Yoshizawa, F. Takizawa, M. Ikegame, O. Ishibashi, K. Okuda, K. Hara, K. Ishibashi, M. Obinata, H. Kawashima, A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and

- Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 4191–4200.
- 5] S. Yamada, S. Murakami, R. Matoba, Y. Ozawa, T. Yokokoji, Y. Nakahira, K. Ikezawa, S. Takayama, K. Matsubara, H. Okada, Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene, *Gene* 275 (2001) 279–286.
- 6] S. Yamada, M. Tomoeda, Y. Ozawa, S. Yoneda, Y. Terashima, K. Ikezawa, S. Ikegawa, M. Saito, S. Toyosawa, S. Murakami, PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 23070–23080.
- 7] Y. Yamaguchi, D.M. Mann, E. Ruoslahti, Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin, *Nature* 346 (1990) 281–284.
- 8] A. Hildebrand, M. Romaris, L.M. Rasmussen, D. Heinegard, D.R. Twardzik, W.A. Border, E. Ruoslahti, Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta, *Biochem. J.* 302 (Pt 2) (1994) 527–534.
- 9] X.D. Chen, L.W. Fisher, P.G. Robey, M.F. Young, The small leucine-rich proteoglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation, *FASEB J.* 18 (2004) 948–958.
- 10] S.G. Buchanan, N.J. Gay, Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 65 (1996) 1–44.
- 11] E. Schonherr, M. Broszat, E. Brandan, P. Bruckner, H. Kresse, Decorin core protein fragment Leu155–Val260 interacts with TGF-beta but does not compete for decorin binding to type I collagen, *Arch. Biochem. Biophys.* 355 (1998) 241–248.
- 12] L. Svensson, D. Heinegard, A. Oldberg, Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4–5, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20712–20716.
- 13] H. Kizawa, I. Kou, A. Iida, A. Sudo, Y. Miyamoto, A. Fukuda, A. Mabuchi, A. Kotani, A. Kawakami, S. Yamamoto, A. Uchida, K. Nakamura, K. Notoya, Y. Nakamura, S. Ikegawa, An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis, *Nat. Genet.* 37 (2005) 138–144.
- 14] P.G. Scott, C.M. Dodd, E.M. Bergmann, J.K. Sheehan, P.N. Bishop, Crystal structure of the biglycan dimer and evidence that dimerization is essential for folding and stability of class I small leucine-rich repeat proteoglycans, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 13324–13332.
- 15] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- 16] K. Mizuguchi, C.M. Deane, T.L. Blundell, M.S. Johnson, J.P. Overington, JOY: protein sequence-structure representation and analysis, *Bioinformatics* 14 (1998) 617–623.

- [17] R.A. Sayle, E.J. Milner-White, RASMOL: biomolecular graphics for all, *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995) 374.
- [18] G. Nareyek, D.G. Seidler, D. Troyer, J. Rauterberg, H. Kresse, E. Schonherr, Differential interactions of decorin and decorin mutants with type I and type VI collagens, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3389–3398.
- [19] S. Yamada, Y. Ozawa, M. Tomoeda, R. Matoba, K. Matsubara, S. Murakami, Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.* 85 (2006) 447–451.
- [20] K.N. Sulochana, H. Fan, S. Jois, V. Subramanian, F. Sun, R.M. Kini, R. Ge, Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27935–27948.
- [21] S. Goldoni, R.T. Owens, D.J. McQuillan, Z. Shriver, R. Sasisekharan, D.E. Birk, S. Campbell, R.V. Iozzo, Biologically active decorin is a monomer in solution, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 6606–6612.
- [22] P.G. Scott, P.A. McEwan, C.M. Dodd, E.M. Bergmann, P.N. Bishop, J. Bella, Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 15633–15638.

Nicotine Inhibits Mineralization of Human Dental Pulp Cells

Manabu Yanagita, DDS, PhD, Yoichiro Kasbiwagi, DDS, Ryobei Kobayashi, DDS, PhD, Miki Tomoeda, DDS, PhD, Yosbio Shimabukuro, DDS, PhD, and Shinya Murakami, DDS, PhD

Abstract

Nicotine is a major component of tobacco smoke, and signals via nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). However, little is known about the effects of nicotine on human dental pulp cells (HDPCs). In this study, we assessed the effects of nicotine on mineralization in HDPCs. We confirmed messenger RNA expression of nAChR subunits and examined the effects of nicotine on expression of extracellular matrices (ECMs), alkaline phosphatase (ALP) activity, and mineralized nodule formation by HDPCs. Gene expression of nAChR subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 4$ was detected in HDPCs. Interestingly, the messenger RNA expression of dentin matrix acidic phosphoprotein-1, bone sialoprotein, and ALP activity were significantly reduced in nicotine-treated HDPC. In addition, mineralized nodule formation, which was examined by alizarin red staining, was also inhibited in HDPCs by the same treatment. These results indicate that nicotine suppresses the cytodifferentiation and mineralization of HDPCs, possibly via nAChR. (*J Endod* 2008;34:1061–1065)

Key Words

Dental pulp cells, mineralization, nicotine

From the Department of Periodontology, Division of Oral Biology and Disease Control, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan.

Supported in part by the 21st Century COE entitled "Origination of Frontier BioDentistry" at Osaka University Graduate School of Dentistry; the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; and a grant from the Smoking Research Foundation.

Address requests for reprints to Dr Shinya Murakami, Department of Periodontology, Division of Oral Biology and Disease Control, Osaka University Graduate School of Dentistry, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. E-mail address: ipshinya@dent.osaka-u.ac.jp.

0099-2399/\$0 - see front matter

Copyright © 2008 American Association of Endodontists. doi:10.1016/j.joen.2008.06.005

Tobacco smoking is associated with the development of numerous diseases such as cancers, vascular diseases, chronic obstructive pulmonary diseases, and periodontal diseases (1–3). Nicotine is one of the main components of tobacco smoke and a selective agonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Human nAChRs are pentamers that are ligand-gated ion channels consisting of α -subunits ($\alpha 1$ – $\alpha 7$, $\alpha 9$, and $\alpha 10$), β -subunits ($\beta 1$ – $\beta 4$), and ϵ , γ , and δ subunits (ϵ). So far, two types of pentamer have been revealed: one is muscle nAChR, and the other is neuronal nAChR. Muscle nAChRs were first identified at the neuromuscular junction and contain $\alpha 1/\beta 1/\epsilon/\delta$ subunits. On the other hand, the expression of neuronal nAChR was discovered in the central nervous system, and these nAChRs contain $\alpha 2$ – $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, and $\beta 2$ – $\beta 4$ subunits. Interestingly, it has been recently reported that these receptors are also expressed on epithelial cells (5), fibroblasts (6), lymphocytes (7), and alveolar macrophages (8).

Tooth injury and dental caries induce reactionary or reparative dentinogenesis. It has been well known that dental pulp contains cells capable of regenerating dentin/pulp complex (9). In fact, previous reports showed that cultured dental pulp cells form calcified nodules in vitro (10). On the other hand, it was recently shown that odontoblasts generated in vitro from human dental pulp explants responded to cariogenic bacteria and decreased the function of dentin matrix synthesis and mineralization (11).

Nicotine has been shown to inhibit bone growth, to depress osteoblast activity (12), and to impair bone repair (13). However, nicotine has also been reported to stimulate alkaline phosphatase activity in rat osteoblastic cells (14) and induce osteoblastic cell proliferation (15). These reports suggest that nicotine can modulate the functions of osteoblastic lineage cells.

Because little is known about the effects of nicotine on human dental pulp cells (HDPCs), we investigated the expression of nAChR and the effects of the ligand, nicotine, on cytodifferentiation and mineralization in HDPCs.

Materials and Methods

Culture of HDPCs

HDPCs were isolated from healthy dental pulp of first premolar teeth of individuals undergoing tooth extraction for orthodontic treatment, as described previously in detail (16). All the patients gave informed consent before collection of samples, and the protocols were approved by the Institutional Review Board of Osaka University Graduate School of Dentistry. In this study, we established three cell lines from different volunteers, and all cell lines were used in each experiment. After the cells reached confluence, we replaced the culture medium (α -Eagle's minimum essential medium [MEM] supplemented with 10% fetal calf serum [FCS]) with the mineralization medium (α -MEM supplemented with 10% FCS, 10 mmol/L β -glycerophosphate, and 50 μ g/mL ascorbic acid). We replaced the mineralization medium every 3 days with or without nicotine (1 mmol/L or 10 nmol/L), which was prepared in PBS and neutralized to pH 7.2.

Detection of nAChRs in HDPCs by Real-time Polymerase Chain Reaction

HDPCs were seeded at a density of 10^5 cells/dish in a 60-mm dish and grown to confluency with α -MEM supplemented with 10% FCS. After culture of HDPCs with or without nicotine, total RNA was extracted from each cell by RNaseasy (TEL-TEST, Friedwood, TX) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA synthe-

TABLE 1. Real-Time PCR Primers for nAChR Subunits Used in This Study

Gene		Primer	Reference
alpha1	Forward	5'-CCA GAC CTG AGC AAC TTC ATG G-3'	10
	Reverse	5'-AAT GAG TCG ACC TGC AAA CAC G-3'	
alpha2	Forward	5'-TGA CCC ACA TGA CCA AGG CCC A-3'	22
	Reverse	5'-TGG TGA ACA GCA GGT ACT CGC C-3'	
alpha3	Forward	5'-CCG AGG CCC CTC TAC GGT-3'	23
	Reverse	5'-CAC ACA GCT TAG TGC TTA-3'	
alpha4	Forward	5'-CAC GTT TGC CAA ATT TTC CT-3'	24
	Reverse	5'-CCG AGT CCT GCA GGT AGA AG-3'	
alpha5	Forward	5'-CCA TCA TCT TCA AAA GTC ATA-3'	23
	Reverse	5'-CCC ATT TAT AAA TAA CAG GAA C-3'	
alpha6	Forward	5'-GCT GTG CAA CTG AGG AGA GGC T-3'	22
	Reverse	5'-AAG ACG GTG AGC GAC AGC AGC-3'	
alpha7	Forward	5'-CCC AAG TGG ACC AGA GTC AT-3'	10
	Reverse	5'-GAT GTA CAG CAG GTT CCC GT-3'	
alpha9	Forward	5'-CGA GAT CAG TAC GAT GGC CTA G-3'	10
	Reverse	5'-TCT GTG ACT AAT CCG CTC TTG C-3'	
alpha10	Forward	5'-TCT CAA GCT GTT CCG TGA CC-3'	25
	Reverse	5'-AAG GCT GCT ACA TCC ACG C-3'	
beta1	Forward	5'-GTG TCA GGG TCA GGG TTG GT-3'	26
	Reverse	5'-TGC GGC GGA TGA TGA GGT AG-3'	
beta2	Forward	5'-GGC ATG TAC GAG GTG TCC TT-3'	24
	Reverse	5'-CAC CTC ACT CTT CAG CAC CA-3'	
beta3	Forward	5'-AAG GGG AAC AGA AGG GAC GG-3'	22
	Reverse	5'-GAA GCA GTA CGT CGC GGA CG-3'	
beta4	Forward	5'-GTT CAT GTT TGT GTG CGT CC-3'	24
	Reverse	5'-AAC CCA GAA AGA AGC AGC AA-3'	
HPRT	Forward	5'-CGA GAT GTG ATG AAG GAG ATG GG-3'	20
	Reverse	5'-GCC TGA CCA AGG AAA GCA AAG TC-3'	

sis and amplification via polymerase chain reaction (PCR) were performed, as described previously (17). The primers used for PCR are listed in Table 1 (8, 16, 18–21). After denaturation at 95°C for 5 minutes, each cycle consisted of 95°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute. Amplified products were analyzed by electrophoresis at 100 V for 30 minutes on 1.5% tris-acetate - EDTA agarose gels containing 0.5 µg/mL ethidium bromide. Human brain and muscle RNA samples (TAKARA-Bio Inc, Otsu, Japan) were used as a positive control for nAChR subunits (muscle for α1 and β1 and brain for α2-7, α9-10, and β2-4).

Quantitative Real-time PCR for Extracellular Matrices

Real-time PCR was performed with an ABI 7700 system (Applied Biosystems, Tokyo, Japan). Reactions were performed according to the manufacturer's protocol. The primers used for real-time PCR were as follows: hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT), (sense) 5'-GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG TCA A-3' and (antisense) 5'-GTC AAG GGC ATA TCC TAC AAC AAA C-3'; collagen type I, (sense) 5'-CTG CTG GAC GTC CTG GTG-3' and (antisense) 5'-ACG CTG TCC AGC AAT ACC TTG-3'; bone sialoprotein (BSP), (sense) 5'-CTG GCA GGG TAC AGG GTT AG-3' and (antisense) 5'-ATC GGT GCC GTT TAT GCC TTG-3'; dentin matrix acidic phosphoprotein (DMP)-1, (sense) 5'-AGA TCA GCA TCC TGC TCA TGT TC-3' and (antisense) 5'-TGG TGC CTG AGC CAA ATG AC-3'; and dentin sialophosphoprotein, (sense) 5'-TGG AGA CAA GAC CTC CAA GAG TGA-3' and (antisense) 5'-TGC TGG GAC CCT TGA TTT CTA TTC-3'.

Alkaline Phosphatase Activity and Mineralization Assay

Alkaline phosphatase activity (ALP) activity was assessed according to the procedure described previously (22). In brief, after washing twice with PBS, cells were homogenized in 1 mL 0.9% NaCl and 0.2% Triton-X-100 (Wako, Osaka, Japan) at 4°C in a glass homogenizer and then centrifuged for 15 minutes at 12,000g. ALP activity in the supernatant was measured by using p-nitrophenyl phosphate (pNP) as a sub-

strate. Subsequently, the supernatant was mixed with 0.5 mol/L tris-HCl buffer (pH 9.0) containing 0.5 mmol/L pNP and 0.5 mmol/L MgCl₂. Next, the samples were incubated at 37°C for 30 minutes, and the reaction was stopped by addition of 0.25 mL 1 mol/L NaOH. Using a spectrometer, hydrolysis of pNP was monitored as a change in A_{410nm}; p-nitrophenol was used as a standard. One unit of activity was defined as the enzyme activity hydrolyzing 1 nmol pNP in 30 minutes. Histochemistry for staining calcified nodules was performed by using the alizarin red staining method (23). Cell layers were washed twice with PBS and then fixed in dehydrated ethanol. After fixation, the cell layers were stained with 1% alizarin red S in 0.1% NH₄OH (pH 6.3–6.5) for 5 minutes. The dishes were washed with H₂O and then observed microscopically, digitized, and analyzed by using the WinRoof software program (Mitani Corporation, Fukui, Japan).

Statistical Analysis

Statistical analysis of the results was performed by one-way analysis of variance. Differences were considered statistically significant when *p* values were less than 0.05.

Results

Neuronal and Muscle-type nAChR Are Expressed on HDPCs

We examined the expression of nAChR subunit messenger RNA on HDPCs using real-time PCR. As shown in Figure 1A, we found that all HDPCs expressed messenger RNA for muscle-type nAChR subunits (α1 and β1) and neuronal-type nAChR subunits (α2, α4, α5, α6, α7, β2, and β4). However nAChR subunits α3, α9, α10, and β3 were not detected in HPDC.

Nicotine Reduces Messenger RNA Expression of Extracellular Matrices in HDPCs

We then examined the effects of nicotine (10⁻³ mol/L) on gene expression of the extracellular matrices (ECMs) (Fig. 1B). HDPCs that

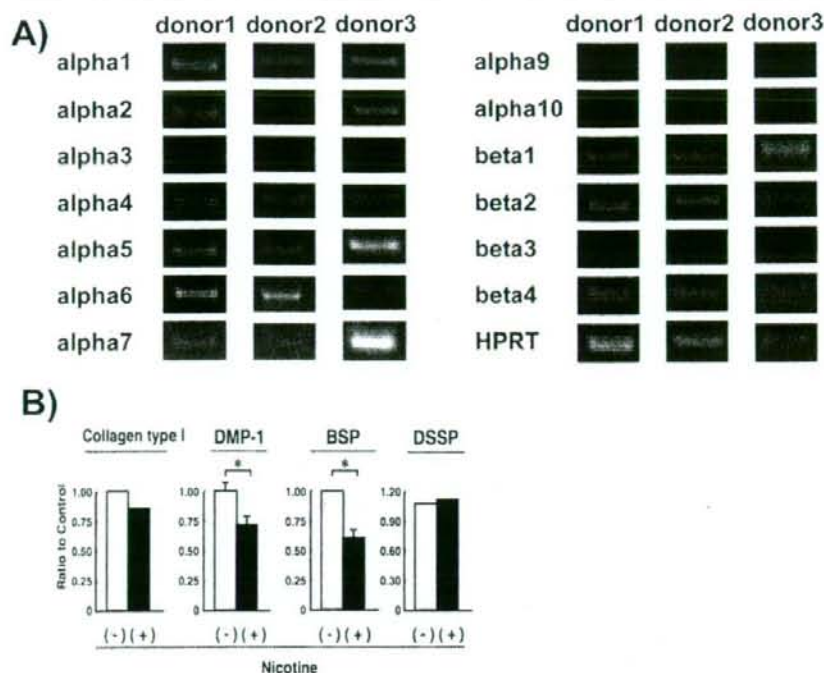


Figure 1. (A) The expression of nAChR messenger RNA in HDPCs. Results of three different donors are shown. The number of PCR cycles is 30 and 24 for nAChRs and HPRT, respectively. (B) The analysis of messenger RNA expression in ECM by real-time PCR. RNA samples were obtained from HDPC 2 days after nicotine treatment (10^{-5} mol/L). The relative expression of each ECM was standardized against the amount in HPRT, and the expression of ECM in HDPC without nicotine has been taken as 1.0. Values are means \pm standard deviation of three determinations. * $p < 0.05$ compared with nontreated.

were treated with nicotine showed significantly decreased messenger RNA expression of DMP-1 and BSP. However, nicotine did not affect the gene expression of collagen type I and dentin sialophosphoprotein.

Nicotine Inhibits Mineralized Nodule Formation in HDPCs

We cultured HDPCs with or without nicotine in mineralization medium and then examined ALP activity and mineralized nodule formation by the HDPCs. Nicotine significantly inhibited ALP activity of HDPCs compared with that of HDPCs in the absence of nicotine (Fig. 2A). Next, we investigated mineralized nodule formation by HDPCs on day 24. As shown in Figure 2B, nicotine reduced alizarin red staining intensity. Interestingly, even a low concentration of nicotine (10^{-8} mol/L) decreased mineralized nodule formation by the HDPCs.

Discussion

To the best of our knowledge, we provide evidence for the first time that HDPCs express neuronal nAChR subunits $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, and $\beta 4$ and muscle nAChR subunits $\alpha 1$ and $\beta 1$ as assessed by real-time PCR. Among cells that have the ability to be calcified or mineralized, there has been only one previous report that the $\alpha 4$ nAChR was expressed in human primary osteoblasts (24). Previous studies reported that human gingival fibroblasts responded to nicotine. However, the expression of nAChR was not investigated (25). We also examined nAChR expression in human gingival fibroblasts and observed the same pattern of expression of nAChR as was found in HDPCs (unpublished data). As well as in neural cells, nAChR have been reported to be expressed on bronchial epithelial cells (HBECs). The stimulation of HBECs with nicotine induced calcium influx, which was inhibited by nAChR antagonists (26). However, not all subunits of nAChR expressed

at messenger RNA levels were detected at protein levels in HBECs (26). Although the present study suggests that HDPCs express functional nAChR, it will be necessary to examine the protein level of nAChR expression in HDPCs.

Nicotine has been reported to have several positive and negative effects on host defense and reparative responses (3). We examined the expression of some ECMs, which are closely associated with mineralization, and revealed by real-time PCR that nicotine reduced the messenger RNA expression of DMP-1 and BSP (Fig. 1B). In addition, nicotine suppressed the induction of ALP activity (Fig. 2A) and reduced calcified nodule formation (Fig. 2B). These findings suggest that nicotine decreases the expression of ECM involved in mineralization and negatively regulates the mineralization of HDPCs probably via nAChR. Both DMP-1 and BSP are small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins and are involved in the regulation of mineralization (27). So far, there are only a few reports describing the effect of nicotine on the expression of ECMs related to mineralization. Those studies showed that nicotine upregulated osteopontin expression in human primary osteoblastic cells (24) and that nicotine induced BSP and collagen type I but downregulated osteopontin in osteosarcoma cell lines (28). In addition, the present study suggests that nicotine plays a role as a negative regulator in the mineralization of HDPCs by reducing ECM expression. Thus, the effects of nicotine on ECM are still controversial and may be dependent on each cell type.

It is well known that smoking is a risk factor for the progression of periodontal diseases (3) and that nicotine alters the cellular functions of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts (29). Nicotine concentration is known to reach mM levels in the saliva of deep inhalers of smoke (30), and periodontal tissues are considered to be exposed to

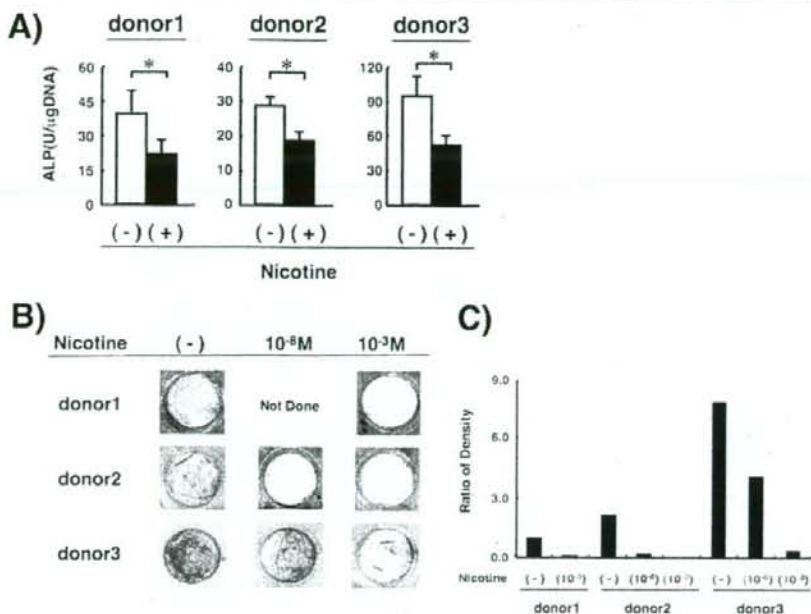


Figure 2. (A) The effects of nicotine on ALP activity in HDPCs. As described in the Materials and Methods section, HDPCs were cultured in 24-well plates in the presence or absence of nicotine for 21 days, and ALP activities were measured. Values are means \pm standard deviation of three determinations. * $p < 0.05$ compared with nontreated. (B) The effects of nicotine (10^{-8} mol/L or 10^{-3} mol/L) on mineralization in HDPCs. Alizarin red staining was performed after 24 days of culture in mineralization medium. Results of one representative experiment out of three identical experiments are shown, and (C) the relative expression of value of alizarin stain of each data shown in Figure 2B was quantitated and normalized to alizarin stain without nicotine of donor 1.

a similar concentration of nicotine. In fact, it has been reported that smokers showed impaired periodontal tissue regeneration compared with nonsmokers (31). The other report suggested smoking may be a risk factor in the outcome of endodontic restorations and implant treatment (32). On the other hand, there is little information about the correlation between smoking and the regeneration of the dentin/pulp complex. Because the nicotine concentration in smokers' sera was 25 to 444 nmol/L (33), nicotine concentration in the dental pulp tissues of smokers is expected to be at 10 to 1,000 nmol/L levels. Figure 2B and C showed that even 10 nmol/L nicotine reduced calcified nodule formation. This suggests the possibility that a low concentration of nicotine circulating in the blood stream can suppress calcified nodule formation and that nicotine or cigarette smoke constituents can reduce reactionary or reparative dentinogenesis.

Nicotine is known to activate several mitogen-activated protein kinase signaling pathways in a variety of cell types. Among mitogen-activated protein kinases, it has been reported that nicotine stimulation rapidly increases extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation (34). ERK1/2 is involved in cellular growth and differentiation in response to various cytokines and growth factors. Although previous reports suggested that nicotine has cytotoxicity (29), we did not observe any cytotoxic effects of nicotine (data not shown). Rather than inducing cell death, the exposure of HDPCs to nicotine increases the amount of DNA in the cells, and this process may involve ERK1/2. Although it has been suggested that the ERK pathway may be involved in mineralization or osteoblast differentiation both positively (35) and negatively (36), the present study suggests that signaling via the ERK pathway induced by nicotine negatively regulates the mineralization of HDPCs.

In summary, we show that nicotine inhibits the differentiation and mineralization of HDPC in vitro, probably via nAChRs. Our results sug-

gest that the functions of dentin matrix synthesis and mineralization are decreased in the HDPC of smokers.

References

- Carbone D. Smoking and cancer. *Am J Med* 1992;93:135-7.
- Heeschen C, Jang JJ, Weis M, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:833-9.
- Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol* 2000;2007;43:267-77.
- Conti-Tronconi BM, McLane KE, Rafferty MA, Grando SA, Protti MP. The nicotinic acetylcholine receptor: structure and autoimmune pathology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994;29:69-123.
- Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, et al. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 1998; 54:779-88.
- Arredondo J, Hall LL, Ndoye A, et al. Central role of fibroblast alpha3 nicotinic acetylcholine receptor in mediating cutaneous effects of nicotine. *Lab Invest* 2003;83:207-25.
- Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 2000;86:29-48.
- Wang H, Yu M, Ochan M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003;421:384-8.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13625-30.
- Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol* 1991;36:117-28.
- Durand SH, Flacher V, Romeas A, et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol* 2006;176:2880-7.
- Pocock NA, Eisman JA, Kelly PJ, Sambrook PN, Yeates MG. Effects of tobacco use on axial and appendicular bone mineral density. *Bone* 1989;10:329-31.
- Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999;45:294-301.

14. Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone* 1991;12:283–6.
15. Kumer AR, El-Ghorab N, Marzec N, Margaroni JE 3rd, Dziak R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int J Mol Med* 2006;17:121–7.
16. Shimabukuro Y, Ueda M, Ichikawa T, et al. Fibroblast growth factor-2 stimulates hyaluronan production by human dental pulp cells. *J Endod* 2005;31:805–8.
17. Yamagita M, Shimabukuro Y, Nozaki T, et al. IL-15 up-regulates NOS expression and NO production by gingival epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:329–34.
18. Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, et al. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett* 1999;266:17–20.
19. Mihovilovic M, Roses AD. Expression of alpha-3, alpha-5, and beta-4 neuronal acetylcholine receptor subunit transcripts in normal and myasthenia gravis thymus. Identification of thymocytes expressing the alpha-3 transcripts. *J Immunol* 1993;151:6517–24.
20. Walskuch A, Guyon T, Bruand C, Tzaros S, Cohen-Karninsky S, Berrich-Akoin S. Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis. *J Immunol* 1996;157:5752–60.
21. Yamaguchi H, Friedman H, Yamamoto Y. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in controlling *Chlamydia pneumoniae* growth in epithelial HEp-2 cells. *Infect Immun* 2005;73:3645–7.
22. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946;164:321–9.
23. Dahl LR. A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1952;80:474–9.
24. Walker LM, Preston MR, Magnay JL, Thonius PB, El Haj AJ. Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* 2001;28:603–8.
25. Chang YC, Tsai CH, Yang SH, Liu CM, Chou MY. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human gingival fibroblasts stimulated with nicotine. *J Periodontol Res* 2003;38:496–501.
26. Carlisle DL, Liu X, Hopkins TM, Swick MC, Dhir R, Siegfried JM. Nicotine activates cell-signaling pathways through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung cancer cells. *Pain Pharmacol Ther* 2007;20: 629–41.
27. Moses KD, Butler WT, Qin C. Immunohistochemical study of small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins in reactionary dentin of rat molars at different ages. *Eur J Oral Sci* 2006;114:216–22.
28. Tanaka H, Yamabe N, Suzuki N, et al. Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sci* 2005;77:2275–84.
29. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodontol Res* 2002;37:279–85.
30. Feysrabend C, Higginbottom T, Russell MA. Nicotine concentrations in urine and saliva of smokers and non-smokers. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;284:1002–4.
31. Stavropoulos A, Marlas N, Herrero F, Karring T. Smoking affects the outcome of guided tissue regeneration with bioresorbable membranes: a retrospective analysis of intrabony defects. *J Clin Periodontol* 2004;31:945–50.
32. Doyle SL, Hodges JS, Pesun JJ, Barsden MK, Bowles WR. Factors affecting outcomes for single-tooth implants and endodontic restorations. *J Endod* 2007;33:399–402.
33. Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feysrabend C. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J* 1980;280:972–6.
34. Arredondo J, Cherniavsky M, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grand SA. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J* 2006;20:2093–101.
35. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mhalawale G, Marshak DR, Pittenger MF. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2000;275:9045–52.
36. Nakayama K, Yamura Y, Suzuki M, et al. Receptor tyrosine kinases inhibit bone morphogenetic protein-Smad responsive promoter activity and differentiation of murine MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 2003;18:827–35.

歯根膜の分子基盤研究

山田 聡* 村上伸也*

歯を支える歯周組織のなかでも、とくに重要で特殊な機能を有する歯根膜の分子基盤を解明する目的で、ヒト歯根膜3'末端cDNAライブラリ解析をもとにして、ヒトの*in vivo*歯根膜においていかなる遺伝子がいかなる頻度で発現しているのかを示すヒト歯根膜遺伝子発現プロファイルを作成した。その結果、歯根膜の特徴的な機能・形態を分子・遺伝子レベルで明らかにすることができた。さらに、歯根膜に特異的に発現している細胞外基質蛋白PLAP-1を見出した。発現・機能解析の結果、PLAP-1は、硬組織形成に対して抑制的に作用することにより、硬組織形成能を有しながらも石灰化せず、線維性の結合組織として機能する歯根膜の恒常性を維持している可能性が示された。

はじめに

ヒトゲノムプロジェクト完了の結果、ヒトの全ゲノム配列が解読され、その遺伝子総数は2万2千個前後であることが明らかとなった。生命科学は、ポストゲノム時代に突入し、DNAからヒトへという新しい研究アプローチがなされつつある。われわれはこれまでに、歯周組織のなかでも、歯周組織の恒常性維持および歯周病によって破壊された歯周組織の修復・再生に中心的な役割を果たしている歯根膜に着目し研究をおこなっている。本稿では、そのなかの1つとして歯根膜研究の新しいアプローチを紹介したい。

【キーワード】

歯根膜
ポストゲノムサイエンス
3'末端cDNAライブラリ
歯根膜遺伝子発現プロファイル
歯根膜特異的分子PLAP-1

1. ポストゲノムサイエンスとしての歯根膜研究

ヒトの歯根膜は、歯と歯槽骨という2つの硬組織の間に存在するコラーゲン線維に富む非石灰化された結合組織であり、線維性付着により歯を歯槽骨に保持するという役目を担いながら、咬合時の感覚受容器としても機能している。また、歯根膜は、100~250 μ mの幅を保ちながら、咬合力、矯正力といったメカニカルストレスに反応して歯槽骨、セメント質および結合組織のリモデリングをおこなない、歯周組織の動的平衡を保っていると考えられている。近年の研究から歯根膜は、石灰化関連分子やサイトカインを自ら産生することにより歯周組織の再生をもたらすこと、また、歯根膜組織は歯周組織の再生を可能ならしめる未分化間葉系細胞群のリザーバーとなっている重要な組織であることなどが明らかとなっている¹⁾。また、歯根膜由来の培養細胞を用いた数々の研究により、歯根膜由来の線維芽細胞は歯肉由来の線維芽細胞と比較して高い石灰化能を有し、硬組織形成に関与

*YAMADA Satoru, MURAKAMI Shinya/大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 歯周病診断制御学

する分子群の発現が高いことも明らかにされている²⁾。この重要かつユニークな組織である歯根膜において、これまで形態的・機能的な特徴についての研究が中心になされてきたが、遺伝子・分子レベルでの特徴については十分解析されたとはいえない。

ポストゲノムサイエンスとして、ヒト身体の各組織・細胞における特有の遺伝子発現パターンを大規模・網羅的に解析することにより、各々の組織・細胞における遺伝子発現の組み合わせを解明し、分子生物学的な側面からその組織・細胞の特徴や特有の機能を明らかにしようとする組織遺伝子発現プロファイル解析がおこなわれている。その1つとして、解析したい組織・細胞から3'末端cDNAライブラリを構築するOkuboら³⁾の方法が挙げられる。この3'末端cDNAライブラリは、各cDNAクローンのインサートサイズが、3'末端のpoly Aから上流の最初のMboIサイトまでの平均250塩基対となっており、逆転写酵素の効率やクローニング効率といったさまざまな二次的な影響を受けにくいことが特徴となっている。したがって、ライブラリ中のcDNAクローンの存在比率は、ソースとなった組織・細胞でのmRNA構成を正確に再現しているものと考えられる。このライブラリから無作為にクローンを抜き取り解析することにより、実際の組織・細胞における構成遺伝子の割合を正確に再現した「絶対的な」遺伝子発現量を示すプロファイリングが可能となる。さらに、同様の手法を用いて作成された身体各組織・細胞の遺伝子発現プロファイルデータを集積しデータベース化することにより(BodyMapプロジェクト)、各組織・細胞の遺伝子発現プロファイルをBodyMapデータベース上で比較検討し、組織・細胞特異的な遺伝子発現パターンを捉え、さらには特異的に発現する遺伝子を単離・同定することを可能にしている。そこで、われわれは、この手法を用いて歯根膜における遺伝子発現プロファイル解析(歯根膜のBodyMap)をおこなうこ

とを試みた。

2. 歯根膜の遺伝子発現プロファイル解析

われわれ⁴⁾は、インフォームドコンセントが得られた矯正治療中の患者から治療のため便宜抜去された歯の歯根膜よりmRNAを抽出し、Okuboraの方法に従って歯根膜由来3'末端cDNAライブラリを構築した(図1)。前述のように、このライブラリ中のcDNAクローンの存在比率は*in vivo*歯根膜での恒常的なmRNA構成を正確に再現しているものと考えられる。そこで、無作為に選択した1752個のcDNAクローンの塩基配列をDNAシーケンサーにて解読し、コンピューター解析による出現頻度および遺伝子バンクへの相同性検索をおこない、ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイルを作成した(頻度7以上を表1に示す)。

歯根膜はコラーゲン線維に富んだ結合組織であり、そのコラーゲン線維を構成する主要な成分はI型およびIII型コラーゲンである。ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル解析の結果、*collagen type I alpha-2*、*collagen type I alpha-1*および*collagen type III alpha-1*遺伝子の高発現を認め、歯根膜組織の特徴を遺伝子発現の側面からも裏付けた。また、*ribosomal protein* 遺伝子の高い発現を認めており、歯根膜組織ではコラーゲンの生合成がさかんにおこなわれ、結合組織のリモデリングが恒常的になされていることが推測される。ついで高い発現を認める*osteonectin* 遺伝子のコードする蛋白質は、骨において豊富にみられる非コラーゲン性の基質蛋白質であり、骨芽細胞から分泌され、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を用いた系において石灰化ノジュールの形成にあわせてその発現が上昇するとの報告がある⁵⁾。また、歯根膜細胞においては、*osteonectin* 蛋白質の発現上昇がmatrix metalloproteinases (MMPs)の産生を亢進させることにより、MMPsが細胞外基質を分解し、細胞外の微小環境を変化させ、歯根膜細胞の増殖を促進していると考えられている⁶⁾。これらの知

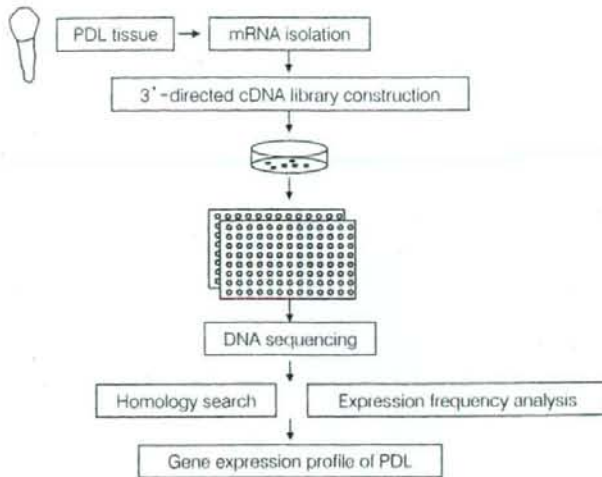


図 1. ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル解析

表 1. ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル

遺伝子名	発現頻度
<i>collagen type I alpha-2</i>	63
<i>collagen type III alpha-1</i>	47
<i>collagen type I alpha-1</i>	45
<i>osteonectin</i>	22
<i>ribosomal protein L21</i>	12
<i>periostin</i>	8
<i>ribosomal protein S18</i>	8
<i>ribosomal protein L13a</i>	7
unknown(PLAP-1)	7

見より *osteonectin* は歯根膜組織のリモデリングを調整すると同時に硬組織形成に関与する分子であると考えられる。さらに、*periostin* 遺伝子の高い発現も同時に認められた。*periostin* 遺伝子は MC3T3-E1 のライブラリより単離・同定された遺伝子であり、骨膜表面と歯根膜組織に局在し、骨芽細胞の前駆細胞を遊走させ、歯槽骨および歯根膜組織のリモデリングをおこなっていると考えられている⁷⁾。この *osteonectin* および *periostin* 遺伝子の高発現は、ヒト歯根膜組織の硬組織形成能を裏付けるものと考えられる。ヒト歯根膜組織

遺伝子発現プロファイル解析により、新陳代謝の活発な線維性結合組織でありながら高い硬組織形成能をもつ歯根膜の組織特異性を遺伝子発現状況の側面から忠実に再現することができた。

3. 歯根膜特異的分子 PLAP-1

歯根膜組織遺伝子発現プロファイルのなかに、出現頻度 7 という高発現を示すにもかかわらず、遺伝子バンクにも登録されていないまったく未知の新規 3' 末端配列が発見された(表 1)。全長 cDNA クローニングの結果、この遺伝子は全長 2.5kbp で、382 アミノ酸をコードする新規の遺伝子であることが明らかとなった(図 2A)。われわれ⁸⁾は、この遺伝子を *periodontal ligament associated protein-1(PLAP-1)* と命名し、予想される蛋白をプロテインデータベースにて検索したところ、興味深いことに、骨の形成や形態維持に重要な役割を果たしている細胞外基質プロテオグリカンである Decorin および Biglycan に対して非常に高い相同性を有する分子であることが明らかとなった。一方、ヒトの身体を構成する各組織より作成した臓器別遺伝子発現プロファイルをデータベース化した東大医科研 BodyMap データベース

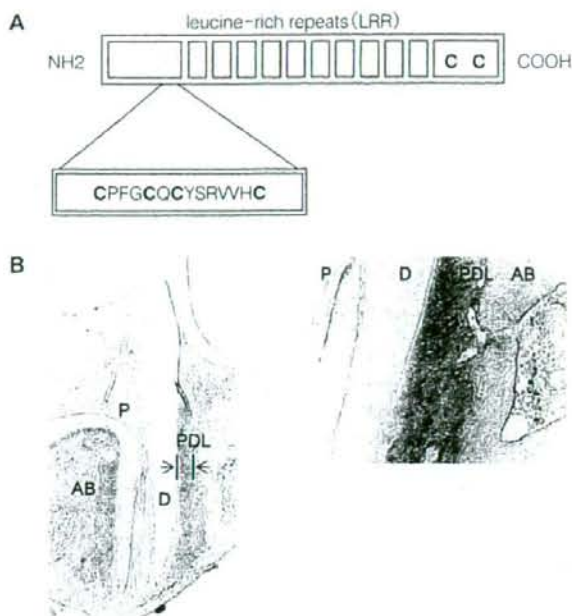


図 2. 歯根膜特異的細胞外基質 PLAP-1

A: PLAP-1 蛋白の構造

中央部に 10 個の LRR, N 末端および C 末端にシステインモチーフを有し, small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) ファミリーに属する。

B: *in situ* ハイブリダイゼーション

(Yamada S *et al.*, 2007⁹⁾より改変引用)
マウス上顎歯周組織における *PLAP-1* 遺伝子の発現を解析した。左倍率 50 倍, 右倍率 200 倍。AB: 歯槽骨, D: 象牙質, P: 歯髄, PDL: 歯根膜

を遺伝子検索した結果, *PLAP-1* 遺伝子は, わずか心臓結合組織および表皮乳頭状組織においてのみ, それぞれ一回の発現頻度でしか検出されなかった。これらの結果より, *PLAP-1* 遺伝子は歯根膜組織に特徴的に発現されており, その遺伝子産物である PLAP-1 蛋白は細胞外基質として, 歯根膜における硬組織形成に関与している可能性が示唆された。

そこで, 生体内における PLAP-1 の発現を解析するために, マウス歯周組織において *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなったところ, *PLAP-1* 遺伝子は, 歯根膜に特異的に発現しており, 歯肉や口腔上皮, 歯槽骨, 骨膜などにはまったくその発現が認められないことが明らかとなった(図 2B)。つぎに, 硬組織形成を誘導した歯根膜細胞において *PLAP-1* 遺伝子の発現を解析したところ, 硬組織形成に伴ってその遺伝子発現が亢進することが示された。さらに, 各種増殖因子による *PLAP-1* 遺伝子発現への影響を検討したところ, 骨形成誘導能をもつ BMP-2 および BMP-4 によって, PLAP-1 の発現が誘導され, 塩基性線維

芽細胞増殖因子 (FGF-2) 添加により *PLAP-1* 遺伝子の発現が著明に抑制された⁹⁾。すなわち *PLAP-1* 遺伝子は硬組織形成の過程でそれらサイトカインにより発現制御を受けている可能性が示唆された。

つぎに *in vitro* において PLAP-1 を歯根膜細胞に強発現させ, その分化過程に及ぼす影響を検討した。興味深いことに, 歯根膜細胞において PLAP-1 を強発現させることにより ALPase 活性の上昇および石灰化ノジュール形成が抑制され, BMP-2 刺激によって誘導される ALPase 活性の上昇も抑制された。一方, RNAi により歯根膜細胞の内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現を抑制したところ, PLAP-1 を強発現させた場合とは逆に, BMP-2 刺激によって誘導される ALPase 活性がより増強された。さらに, リコンビナント PLAP-1 蛋白と BMP-2 蛋白との免疫沈降実験から, PLAP-1 と BMP-2 は直接結合することが明らかとなり, PLAP-1 は, 歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化および硬組織形成を負に制御する分子であることが示され, その作用機序の一部は,

BMP-2を細胞外でアンタゴナイズし、BMPシグナルを抑制することにより担われている可能性が示唆された⁹⁾。

以上から、歯根膜特異的分子であるPLAP-1は、硬組織形成に対して抑制的に作用することにより、硬組織形成能を有しながらも石灰化せず、線維性の結合組織として機能する歯根膜の恒常性を維持していることが示唆された。

おわりに

歯周組織の恒常性維持および歯周組織の再生・修復において中心的な役割を果たしている歯根膜について、われわれがこれまでに進めてきたトランスクリプトーム解析を中心とした研究をご紹介した。興味深いことに、他の複数の研究グループが、われわれと同時期に相次いでPLAP-1と同一の遺伝子を心臓または膝軟骨からクローニングし、*asporin*と名付けている¹⁰⁾¹¹⁾。最近、*asporin*が変形性関節症の原因遺伝子であり、TGF- β の作用を阻害することにより関節軟骨の再生・修復を制御していることも明らかとなっている¹²⁾。関節軟骨は、細胞外基質が豊富で関節に加わるメカニカルストレスを緩和するクッションとしての機能も有し、歯根膜との形態的・機能的な類似性が高い組織と思われることから、PLAP-1/*asporin*が、歯根膜あるいは関節軟骨といった特殊な組織において、組織恒常性の維持や再生・修復の中心的な役割を果たしている重要な因子の一つであることが示唆される。現在、歯周病とPLAP-1/*asporin*との関連性について解析をはじめており、その臨床研究の成果が待たれるところである。

文献

1) Seo BM *et al*: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal

ligament. *Lancet* **364**: 149-155, 2004

- 2) Somerman M *et al*: A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblast *in vitro*. *J Dent Res* **67**: 66-70, 1988
- 3) Okubo K *et al*: Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet* **2**: 173-179, 1992
- 4) Yamada S *et al*: Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene* **275**: 279-286, 2001
- 5) Kelm R *et al*: Osteonectin in matrix remodeling. A plasminogen-osteonectin-collagen complex. *J Biol Chem* **269**: 30147-30153, 1994
- 6) Fujita T *et al*: Effects of transforming growth factor-beta 1 and fibronectin on SPARC expression in cultures of human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int* **26**: 1065-1072, 2002
- 7) Wilde J *et al*: The divergent expression of periostin mRNA in the periodontal ligament during experimental tooth movement. *Cell Tissue Res* **312**: 345-351, 2003
- 8) Yamada S *et al*: Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. *J Dent Res* **85**: 447-451, 2006
- 9) Yamada S *et al*: PLAP-1/*asporin*: a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem* **282**: 23070-80, 2007
- 10) Henry SP *et al*: Expression pattern and gene characterization of *asporin*, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem* **276**: 12212-12221, 2001
- 11) Lorenzo P *et al*: Identification and characterization of *asporin*, a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem* **276**: 12201-12211, 2001
- 12) Kizawa H *et al*: An aspartic acid repeat polymorphism in *asporin* inhibits chondrogenesis and increase susceptibility to osteoarthritis. *Nature Genet* **37**: 138-144, 2005

歯周組織再生の現状と将来の展望

村上伸也* 橋川智子

大阪大学大学院歯学研究科歯周病分子病理学・歯周病診断制御学 *教授

Summary

歯周病は、歯を支えている歯周組織が慢性炎症的に破壊されていく疾患である。近年、歯根周囲の靭帯組織（歯根膜）に未分化間葉系幹細胞が成人になってもリザーブされていることが明らかにされ、同細胞を種々の方法で活性化することにより、失われた歯周組織を再生しようとする試みがなされている。GTR法やエナメルマトリクスタンパクを用いた既存の治療法に加えて、FGF-2などのサイトカインの局所投与や脂肪組織由来幹細胞の移入により、歯周組織再生誘導を図ろうとする臨床研究が推進されている。

I 歯周組織再生療法の現状

1 歯周病と歯周組織再生療法

われわれの歯は、2種類の硬組織（セメント質、歯槽骨）と2種類の軟組織（歯肉、歯根膜）からなる歯周組織により、顎骨に強固に支持されている。歯周病は細菌バイオフィーム（プラーク）に起因する感染症であり、疾患の進行に伴い、歯の支持組織である歯周組織が慢性炎症的に破壊される（図1）。歯周病は成人が歯を失う最大の原因であり、成人の約80%が罹患している「口」の生活習慣病としても位置づけられている。歯周治療の原則は、原因である細菌バイオフィームを歯根表面の壊死セメント質とともに機械的に除去することであるが、それだけでは創傷治癒の場にいち早く到

達する歯肉上皮により治癒が完了してしまい、セメント質や歯槽骨の新生を伴った真の歯周組織再生は望めない。したがって、中高年者、高齢者のQOLの維持・増進を考えたとき、予知性の高い新規歯周組織再生療法の開発は社会的急務であるといえる。

これまでの研究成果より、歯根周囲の靭帯組織である歯根膜組織のなかに骨芽細胞やセメント芽細胞へ分化し得る間葉系幹細胞が成人になっても存在することが示され¹⁾、歯根膜に存在するこのような細胞の機能を十分に発揮させる工夫をすることにより、従来の歯周治療では不可能と考えられてきた歯周組織の再生を誘導することが歯科医学的に可能であると現在では考えられている（図2）。

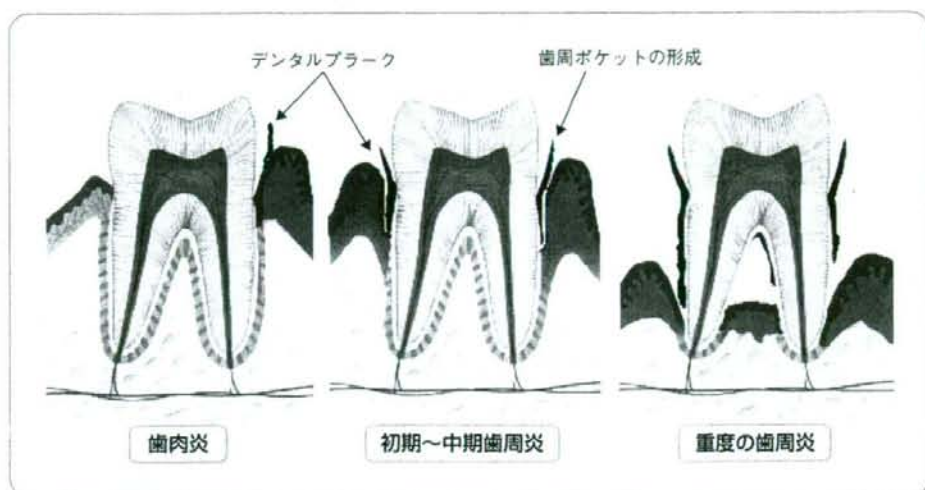


図1 歯周組織と歯周病

歯は歯周組織(歯肉・歯根膜・セメント質・歯槽骨)により顎骨に支持されている。そして歯周病は、デンタルプラーク中の細菌の影響により歯周組織が慢性炎症的に破壊されてゆく疾患である。

ここでいう歯周組織の再生というのは、①歯周組織欠損部に面する歯根面に歯根膜由来細胞が選択的、優先的に誘導され、②これら歯根膜由来細胞中に含まれる未分化間葉系幹細胞(歯周組織幹細胞)が分化能を保有したまま増殖し、硬組織形成細胞(骨芽細胞やセメント芽細胞)や歯根膜線維芽細胞として部位特異的な分化を遂げ、③歯根膜線維芽細胞によって産生されたコラーゲン線維束が骨芽細胞やセメント芽細胞により新生された骨組織、セメント質に埋入され歯と歯槽骨間に線維性の結合(いわゆる新付着)が再生されることを意味している。

2 歯周組織再生療法の現状

現在臨床応用されている歯周組織再生療法は、患歯の歯根膜組織に内在するいわゆる「歯周組織幹細胞」を幹細胞源に用いたものである。歴史の長いものとしては「骨移植」があげられる。これは患者の顎骨を一部採取・粉碎して得られた自家骨やアパタイトのような人工骨を歯周組織欠損部に充填することにより、同部の骨再生を促そうとす

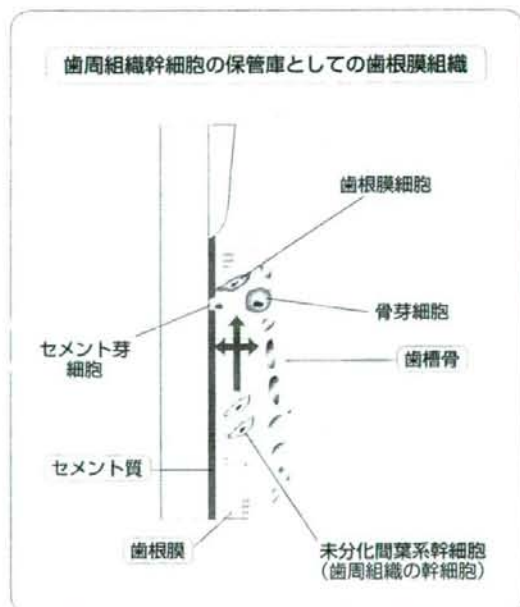


図2 「歯周組織幹細胞」としての未分化間葉系幹細胞が存在する歯根膜組織の概念図

歯根膜中にはセメント芽細胞、骨芽細胞、歯根膜細胞などへ分化する能力を保持しているいわゆる「歯周組織幹細胞」が、成人になっても存在している。

るものである。1980年代に入り、「guided tissue regeneration (GTR)法」が臨床応用されるように

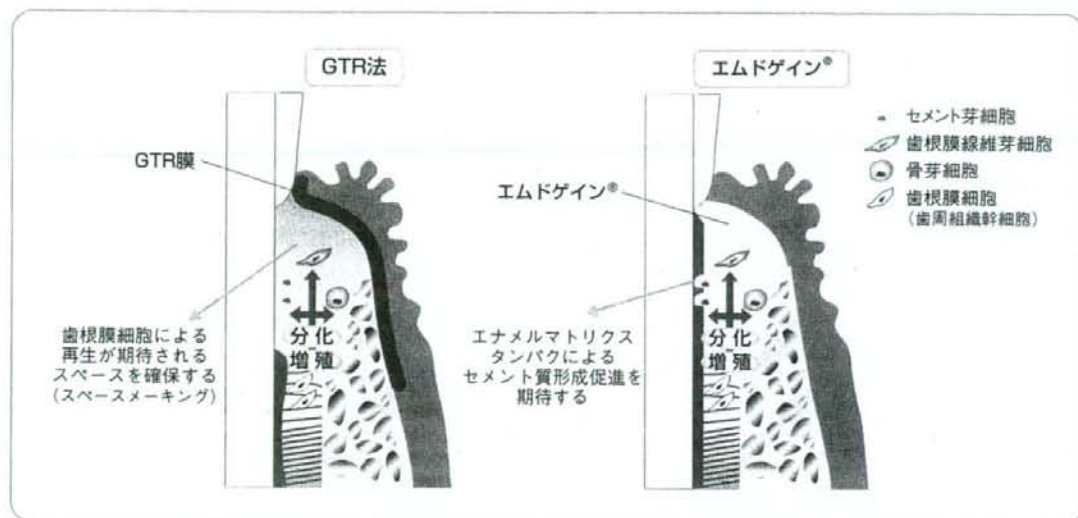


図3 現行の歯周組織再生療法

現在、GTR法とエムドゲイン®による歯周組織再生療法が臨床応用されており、ともに臨床の場で一定の成果をあげている。これらとともに、歯根膜中に存在する内在性「歯周組織幹細胞」の潜在能力を引き起こすことにより、歯周組織再生を誘導しようとするものである。

なった(図3)。これは、歯周組織欠損部を生体親和性のGTR膜で覆うことにより、歯肉上皮由来および歯肉結合組織由来の細胞が同上欠損部へ侵入するのを防ぎ、歯根膜由来細胞を同上欠損部へ到達させることにより、歯周組織再生を誘導しようとする治療法である。その後1990年代に入り、「エナメルマトリクスタンパク(EMD):エムドゲイン®」が臨床応用されるようになる(図3)。この

タンパクは歯の発生期にヘルトヴィッヒ上皮鞘(Hertwig's epithelial sheath)から分泌されるタンパクでセメント質の形成を促す作用を有しているといわれている。6ヵ月齢ブタの下顎骨歯胚から生成されたEMDが現在臨床応用されており、EMDを歯周外科時に歯周組織欠損部へ投与することによりセメント質形成が、ひいては歯周組織再生が誘導されると考えられている。

II 歯周組織再生療法の将来展望

1 サイトカイン療法による歯周組織再生誘導

先に述べた現行の歯周組織再生療法は、臨床の場で一定の成果をあげているものの、適応症・予知性などにつき、改善されるべき点があることが指摘されている。そこで、I-1で述べた歯周組織再生の過程をサイトカインの局所投与により活性化し、歯周組織再生を積極的に促進しようとする新

たな治療法の確立が試みられている。表1にはこれまでに動物実験などでその有効性が報告されているサイトカインを示している。このうち、PDGF-BBと β -TCPを組み合わせたものが歯周組織再生誘導用のdeviceとして米国FDAの承認を受け、現在米国にて臨床応用が開始されている²⁾。

筆者らの研究室では、強力な血管新生作用と間葉系細胞の増殖誘導能を有する塩基性線維芽細胞増殖因子[basic fibroblast growth factor:

表1 サイトカインによる歯周組織再生誘導

①PDGF-BB (platelet-derived growth factor)	+	IGF-1 (insulin-like growth factor-1)
②BMP-2 (bone morphogenetic protein-2)		
③TGF- β (transforming growth factor- β)		
④OP-1 (BMP-7) (osteogenic protein-1)		
⑤BDNF (brain-derived neurotrophic factor)		
⑥VEGF (vascular endothelial growth factor)		
⑦PDGF-BB (platelet-derived growth factor)	+	β -TCP (GEM21S®) (b-tricalcium phosphate)
⑧FGF-2 (bFGF) (basic fibroblast growth factor)		

bFGF (FGF-2))に着目し、FGF-2を歯周外科時に歯槽骨欠損部に局所投与することにより、歯周病により失われた歯周組織の再生を人為的に誘導・促進する、新しい歯周組織再生療法の開発に取り

組んできた。

a. 動物実験における塩基性線維芽細胞増殖因子 FGF-2の歯周組織再生誘導効果の検討

筆者らは、FGF-2が実際に歯周組織再生を促進するか否かを以下の動物実験により検証した^{3,4)}。ビーグル犬およびカニクイザルの下顎臼歯部複根歯に歯周病モデル(2級根分岐部病変)を作製し、架橋ゼラチンを基剤としたFGF-2を実験側の歯周組織欠損部に填入し、対照側には同基剤のみを填入した。そして、FGF-2投与後それぞれ6週および8週経過した後に、FGF-2投与部位に歯周組織の再生が誘導されているか否かを検討した。その結果、FGF-2投与側では、肉眼的にも明らかな骨の新生が認められた(図4)^{3,4)}。そして、組織学的にも新生歯槽骨、新生歯根膜、新生セメント質が観察され、統計学的にも有意な歯周組織再生が誘導、促進されているのが明らかにされた(表2)。これ以外の歯周組織欠損モデルに対しても同様の

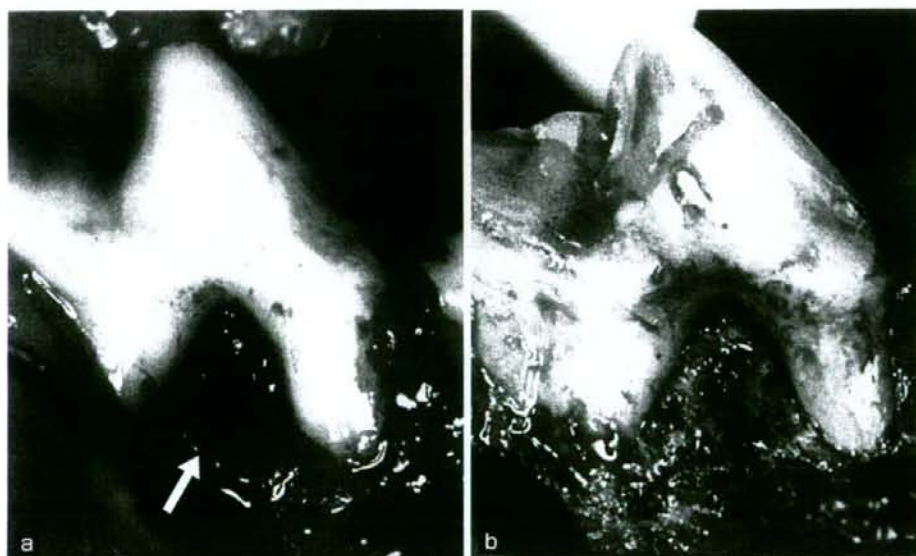


図4 FGF-2投与によりビーグル犬の根分岐部病変に誘導された歯周組織再生

0.1%FGF-2投与前**図a**、投与6週後**図b**の2級根分岐部病変における歯槽骨の新生(骨充填)の様子を示す。

(村上伸也、高山真一：bFGFの現状と将来展望、歯界展望、医歯薬出版、536、2002.)

(文献3)より)

表2 ビーグル犬およびカニクイザルに作製した実験的2級根分岐部病変に対するFGF-2の歯周組織再生誘導効果

a	ビーグル犬 (%)	対照側 (n=6)	FGF-2側 (n=6)
	新生骨形成率	35.4 ± 8.9	83.6 ± 14.3*
	新生骨染形成率	16.6 ± 6.2	44.1 ± 9.5*
	新生セメント質形成率	37.2 ± 15.1	97.0 ± 7.5*
*: p < 0.01		(文献3)より改変)	
b	カニクイザル (%)	対照側 (n=6)	FGF-2側 (n=6)
	新生骨形成率	54.3 ± 8.0	71.3 ± 13.5*
	新生骨染形成率	31.6 ± 3.5	48.7 ± 8.9**
	新生セメント質形成率	38.8 ± 8.6	72.2 ± 14.4**
*: p < 0.05 ** : p < 0.01			

FGF-2投与時の欠損量を100%とし、6週後aおよび8週後bに新生が確認された骨・骨梁・セメント質量をそれぞれ百分率で表している。対照側には基剤のみを投与した。

(文献4)より改変)

処置を行い、そのすべてにおいて、歯肉上皮の下方増殖・骨性癒着・歯根吸収などの異常な治療形態を生じない、統計学的に有意な歯周組織再生が誘導されてくることを確認している。

b. 臨床試験におけるFGF-2の歯周組織再生誘導効果

2001年よりFGF-2の歯周組織再生誘導効果ならびに安全性の検討を目的として、多施設参加の第II相臨床試験(プラセボを含む用量反応同時対照による二重盲検試験)が行われた。その結果、ヒトの2壁性および3壁性歯槽骨欠損に対し、0.3% FGF-2含有ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)製剤の局所投与がX線写真上で統計学的に有意な歯槽骨新生を誘導し得ることが確認されている。また、同試験期間中には安全性上問題になるような事例は認められなかったと報告されている。FGF-2のヒトに対する安全性および歯周組織再生誘導に対する有効性についてのさらなる検討のために、2005年8月より後期第II相の臨床試験(プラセボを含む二重盲検・並行群間比較用量反応試験)が展開されている。

2 細胞移植による歯周組織再生療法の開発

a. 細胞移植による歯周組織再生療法の必要性

先に述べたGTR膜、EMDおよびサイトカインを用いた歯周組織再生療法は、すべて内在性の歯根膜組織由来幹細胞のもつ自己修復力を活性化することにより歯周組織再生を図るアプローチと捉えることができる。一方、生体内の幹細胞数は加齢とともに減少することが知られている。したがって、歯周組織再生に関しても、高齢者の方や、重度歯周病の場合には内在性の歯根膜細胞の活用だけでは十分な再生量が期待できないことが危惧される。そのような場合には、ほかの組織より採取した間葉系幹細胞を歯周組織欠損部へ移植することにより、歯周組織再生を促すことが必要になるものと考えられる。

b. 移植細胞の選択

—脂肪組織由来幹細胞の可能性—

従来、再生医療のための幹細胞源としては、骨髓より採取したものが広く使用されている。しかしながら、骨髓からの幹細胞の採取は、身体への侵襲が大きく、また採取できる細胞数も限定される。そこで、筆者らの研究室では、採取に際して患者への負担がより少なく、安全性も高いと考えられる脂肪組織中に存在する未分化間葉系幹細胞に着目した。すでに*in vitro*において、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞(ADSC)が、脂肪、骨、軟骨、筋肉など中胚葉性の細胞へ分化することが報告されており、ADSCがmultipotentな細胞であることが明らかにされている⁵⁾。筆者らの研究室でも、ヒト脂肪組織より単離したADSCが骨芽細胞lineageへの分化能を有していることを*in vitro*にて確認している。そこで、ビーグル犬を用いた歯周病モデルを用いて、ADSC移植による歯周組



図5 ビーグル犬を用いたADSC移入による歯周組織再生誘導実験
 ビーグル犬の下顎臼歯頰側分岐部に人工的2級分岐部病変を作成し、同部に同一ビーグル犬の腹部大網脂肪組織より分離したADSCを、足場材としてのフィブリンゲルとともに移植する。

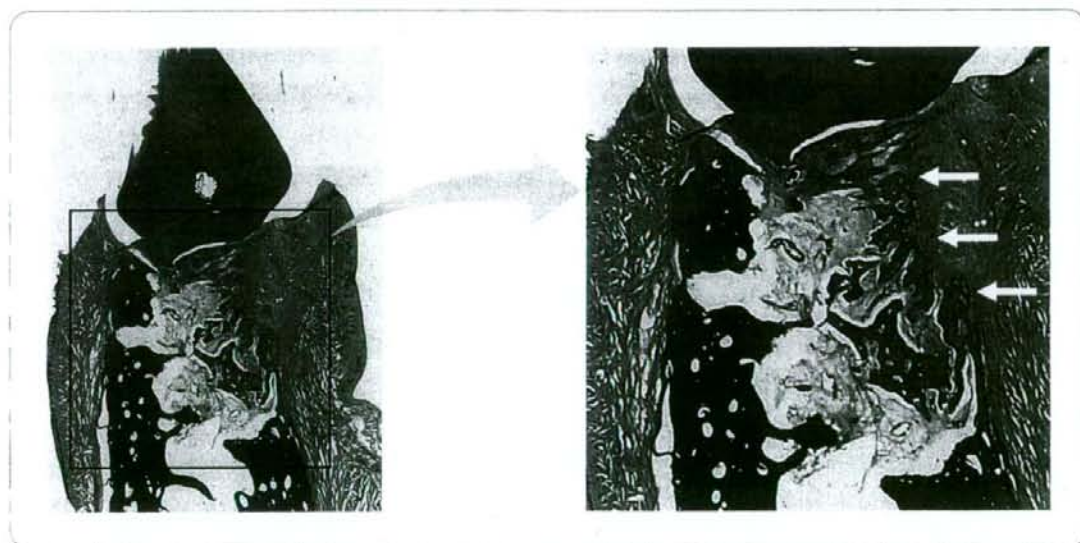


図6 ビーグル犬へのADSC移入による歯周組織再生
 作成した左右両側の人工的骨欠損のうち一側を被験部位として、ADSC+フィブリンゲルを移植した。一方、対照部位にはフィブリンのみを移植した。移植後6週目に屠殺し、組織切片を作成して組織学的に歯周組織再生効果を評価した。ADSC移植後6週目の組織学的解析を示す。矢印部に著明な骨の新生を伴う歯周組織再生が認められた。

組織再生誘導効果について検討を行った(図5)。ビーグル犬の第四前臼歯分岐部に人工的歯周組織欠損(2級分岐部病変)を作成し、腹部より採取した脂肪より単離したADSCをフィブリンゲルとともに同欠損部へ移植した結果を図6に示してい

る。組織学的解析を行った結果から、移植部には著明な新生骨が確認されている。このように、生体内に豊富に存在し採取も簡便かつ安全に行える脂肪組織は、歯周組織再生療法において、有用な幹細胞源となり得ることが強く示唆されている。

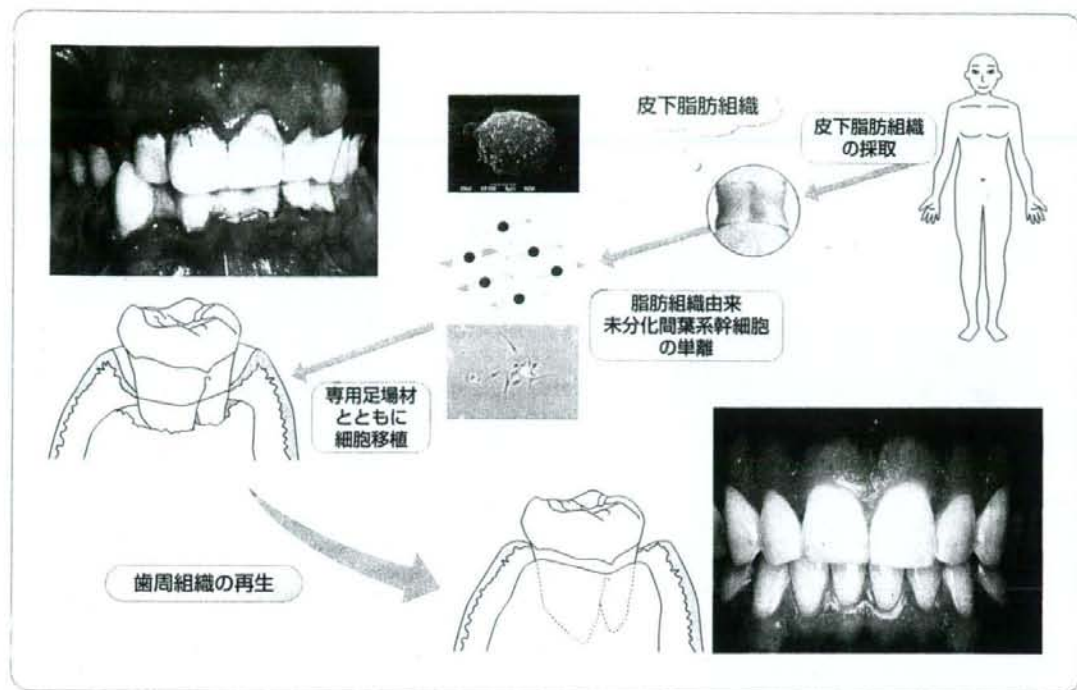


図7 ADSC移入による次世代型歯周組織再生療法の開発

患者から皮下脂肪を採取し、そこからADSCを分離した後、適切な足場材とともに同細胞を歯周組織欠損部に移入することにより、同部の歯周組織再生を促そうとするものである。

c. 至適足場材の選定

上述したような中等度歯周病の症例においては、レシビエント由来フィブリンを足場材として使用することにより細胞を移植することが可能であるが、より重度の歯周組織破壊を伴う症例においては、組織工学的な工夫を加味することが必要とされる。すなわち、組織再生を期待する場(スペース)を保持するスペースメイキング能力を有し、かつ、適度の賦形性とさらには骨伝導性を有するような適切な歯周組織再生誘導用足場材の開発が期待される。しかしながら、現時点では、ヒドロキシアパタイト、乳酸・グリコール酸共重合体など足場材候補となる既存の製品が数種類存在するが、重度歯周病再生治療用にカスタマイズされた効果的な足場材の報告はきわめて少なく、至適足場材の開発および選定は今後の重要な課題と

して残されている。

d. 幹細胞移植を用いた歯周組織再生療法の今後の展望

歯周組織は、歯槽骨・セメント質・歯根膜・歯肉から構成される複雑な組織であり、各組織を歯周組織破壊の度合いに応じて自由自在に再生させることが最終目標である。今後、安全性が担保されており、かつ幹細胞の遊走・増殖、さらには骨芽細胞やセメント芽細胞への分化を支える至適足場材を選定することにより、細胞移入による歯周組織再生療法の適応症例はおおいに拡大するものと思われる(図7)。そして近未来には、サイトカイン・幹細胞・足場材の3要素を最適条件で融合させた、真のオーダーメイド歯周組織再生療法の確立が強く望まれる。