

れるところである。

以上述べてきたように、歯小囊には歯周組織形成能力を有する前駆体細胞集団が存在する。この発生過程で、腱/靭帯形成因子および歯小囊に特異的な細胞外基質因子が歯根膜細胞への運命決定機構に関わる可能性が考えられた。

今後、非可逆性の炎症性崩壊を伴う重篤な歯周病の再生医療の開発のためには、歯小囊細胞を中心とする歯周組織発生機構の全貌を明らかにすることが必須になるであろう。

(齋藤 正寛)

文 献

- 1) MacNeil RL, Berry JE, Strayhorn CL, et al : Expression of type I and xii collagen during development of the periodontal ligament in the mouse. Arch Oral Biol 43 : 779-787, 1998
- 2) Oh SP, Griffith CM, Hay ED, et al : Tissue-specific expression of type xii collagen during mouse embryonic development. Dev Dyn 196 : 37-46, 1993
- 3) Francis-West PH, Parish J, Lee K, et al : Bmp/Gdf-signalling interactions during synovial joint development. Cell Tissue Res 296 : 111-119, 1999
- 4) Sena K, Morotome Y, Baba O, et al : Gene expression of growth differentiation factors in the developing periodontium of rat molars. J Dent Res 82 : 166-171, 2003
- 5) Morotome Y, Goseki-Sone M, Ishikawa I, et al : Gene expression of growth and differentiation factors-5, -6, and -7 in developing bovine tooth at the root forming stage [erratum in Biochem Biophys Res Commun 246 : 925, 1998]. Biochem Biophys Res Commun 244 : 85-90, 1998
- 6) Yokoi T, Saito M, Kiyono T, et al : Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. Cell Tissue Res : 2006 (in press)

- 7) Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, et al : Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res* 14 : 1239-1249, 1999
- 8) Kruzynska-Frejtag A, Wang J, Maeda M, et al : Periostin is expressed within the developing teeth at the sites of epithelial-mesenchymal interaction. *Dev Dyn* 229 : 857-868, 2004
- 9) Rios H, Koushik SV, Wang H, et al : Periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol* 25 : 11131-11144, 2005
- 10) Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, et al : Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 287 : 289-300, 2003
- 11) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364 : 149-155, 2004

8

セメント質の発生・再生機構

セメント質は歯根象牙質外周に形成される硬組織で、歯根と歯根膜を繋ぎ合わせるための重要な石灰化組織である。またセメント質の再生は、歯周組織再生における結合組織性再付着を獲得するために必須の過程になる。したがって、セメント質の発生・再生機構の解明は歯周病再生医療の開発のため重要な研究項目とされている。これまでのセメント質発生研究は、セメント芽細胞が培養不可能であることと、セメント質のマーカー分子が同定されていないため、十分に理解されてこなかった。最近では歯小囊細胞の培養が可能になり、これらの細胞を用いてセメント芽細胞へ分化誘導できるようになった。

そこで、本項では歯小囊細胞を中心としたセメント質発生機構を述べ、そしてセメント質再生の可能性について論じる。

1. セメント質の発生機構

第2章で述べたようにセメント質の発生起源は歯小囊細胞であり、歯根象牙質完成後に歯小囊細胞が歯根象牙質上に遊走、そして接着してからセメント芽細胞へ分化する。現在、セメント質の特異マーカー遺伝子は同定されていないが、この過程においてセメント芽細胞に分化すると骨シアロ蛋白 (bone sialoprotein : BSP)、オステオカルシン (osteocalcin) とオステオポンチン (osteopontin) などの骨基質蛋白を発現することが報告されている¹⁾。これらの骨基質蛋白は、石灰化物の形成以外にセメント芽細胞を歯根面への

遊走および接着を制御していると考えられている。たとえばBSPおよびオステオポンチンはハイドロキシアパタイトへの結合能力を有し、なおかつインテグリンを介して細胞接着および遊走活性を有している⁷⁾。おそらくセメント芽細胞はオートクライン的にBSPおよびオステオポンチンを分泌し、歯根面上に強固に接着し、セメント質マトリックス(基質)成分を歯根上に沈着することが考えられる。このようにセメント芽細胞は骨芽細胞と類似した表現型を示し、また骨基質蛋白はセメント質形成においても重要な役割を果たす。

では、セメント芽細胞と骨芽細胞は同じ機構で細胞分化が制御されているのであろうか? 第2章で述べたように、骨芽細胞と異なりセメント芽細胞の発生には歯小囊細胞とマラッセ残存上皮細胞による上皮-間葉系細胞の相互作用が関わる。そしてこの時期に発現するエナメル上皮由来の特有な細胞外蛋白質(エナメル蛋白)がセメント芽細胞分化を制御することが示唆されてきた⁸⁾。実際にエナメル蛋白の主成分であるアメロブラスチン(ameloblastin)およびアメロジェニン(amelogenin)がヘルトウイグリン糖鞘で発現しており、またアメロジェニンを含むエナメル蛋白の粗精製液を歯小囊細胞で作用させると、オステオカルシンを発現するセメント芽細胞分化誘導可能であることが報告された⁹⁾。

これらの報告より、アメロジェニンを中心とするエナメル蛋白がセメント芽細胞分化能力を有することが示唆されてきた。しかし最近のアメロブラスチンおよびアメロプラスチンの遺伝子欠損マウスの解析結果より、これらのマウスではエナメル質形成不全症が引き起こされるが、セメント質形成には影響がないことが報告された^{7,8)}。これらの報告より、おそらくアメロブラスチンおよびアメロプラスチンの働きを補償してしまう他のエナメル蛋白が存在し、これらがセメント質形成を制御する可能性が考えられた。

このようにセメント質発生機構は不明な点が多く残されているが、おそらくセメント芽細胞分化を制御する特殊な細胞外環境因子が存在する可能性が



図1 抗セメント質抗体とセメント質形成機構の解析

抗CAP抗体(3G9)はウシセメント質およびセメント芽細胞を特異的に染色する(矢印)。そこで歯小囊細胞が3G9陽性のセメント芽細胞への分化能力を有するかを検証した。CAP:セメント質由来細胞接着因子, DP:歯乳頭細胞, DF:歯小囊細胞, HRS:ヘルトヴィッヒ上皮鞘。

りえられる。

2. セメント質由来接着因子

上述のごとく、セメント質と骨は構造が類似していることから、その判別は困難を極めている。筆者らはこの難題にアプローチするため、セメント質よりマーカー分子の精製を試みた。ウシセメント質脱灰抽出画分よりセメント質に特異的に存在する細胞外基質因子をカラムクロマトグラフィにて精製を進めたところ、セメント質由来細胞接着因子(cementum derived attachment protein: CAP)が候補分子として精製された⁹⁾。

CAPは線維芽細胞に対して細胞接着活性を示し、そして $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介してMAP kinase経路を活性化する特徴を有していた¹⁰⁾。このような特徴を有するCAPがセメント質に特異的に存在するかを調べるために、抗CAPモノクローナル抗体(3G9)を作製し、免疫組織学的にCAPの特異性を解析した。セメント質形成期の歯胚を用いて免疫染色を行った結果、3G9は

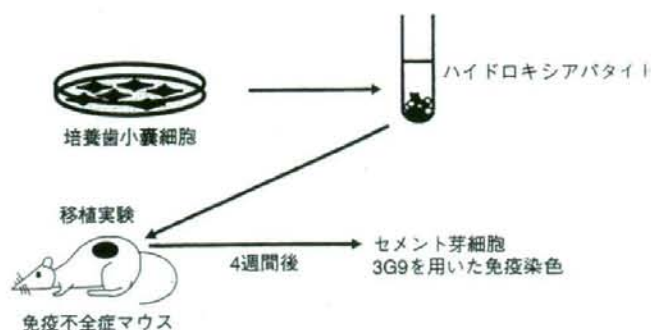


図2 生体内分化誘導法を用いたセメント質形成解析システム
培養歯小囊細胞をハイドロキシアパタイトと混ぜ、免疫不全症マウスへ皮下移植する。4週間後に移植片を摘出し、セメント芽細胞分化を3G9を用いた免疫染色で解析した。

セメント質を特異的に認識することが観察され、CAPがセメント質特異的な細胞外基質因子であることが確認された¹¹⁾。興味深いことに、3G9はドメイン芽細胞にも特異的に反応するため、同抗体がセメント芽細胞のマーカーとして使用できることも確認された(図1)。

3. セメント芽細胞前駆体の採取

上述のごとく3G9がセメント芽細胞のマーカーとして使用できることから、もし歯小囊細胞中にセメント芽細胞前駆体が存在すれば、分化誘導により3G9陽性のセメント芽細胞に分化する仮説を立てた(図1)。この仮説を立証するために、図1に示すように歯根形成期の歯胚より歯小囊細胞を分離培養した。そして図2に示すように、同細胞をハイドロキシアパタイトと混ぜて培養した後に免疫不全マウスへ移植し、セメント芽細胞への分化能力を検討した。結果は、歯小囊細胞移植片内で3G9陽性のセメント芽細胞が分化す

ることから、同細胞中にセメント芽細胞前駆体が存在することが判明した¹²⁾。そこで歯小囊細胞を不死化させ、セメント芽細胞を分離することを試みた。

初代培養した細胞集団より特定の細胞を分離するのに、細胞不死化は最も有効な手段である。細胞不死化の分子機構に関しては、清野らがヒト細胞の寿命延長に p16^{ink4a}-網膜線維芽腫蛋白質 (retinoblastoma protein: Rb) 経路の不活化とテロメラーゼの活性化が必要になることを報告している¹³⁾。これまで p16^{ink4a}-Rb 経路の不活化には SV-40T 抗原あるいはヒトパピローマウイルス (human papilloma virus) E6E7 などのウイルス由来のがん遺伝子が使用されてきた。しかしこれらは、細胞の寿命延長には効果的だが、細胞分化にも影響を与えることも少なくはない。そこでより特異的に p16^{ink4a}-Rb 経路を不活化するため、p16^{ink4a}の転写抑制因子である Bmi-1 と、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素サブユニット (hTERT) を遺伝子導入し、歯小囊細胞の不死化を試みた。

不死化した歯小囊細胞の寿命は延長され、さらに同細胞よりセメント芽細胞前駆体細胞の株化に成功した (図 3 A)¹⁴⁾。興味深いことにセメント芽細胞前駆体は *in vitro* では未分化状態を維持するが、免疫不全マウスへ移植することにより 3G9 陽性のセメント芽細胞に分化する特性を有していた。さらにセメント芽細胞前駆体により形成されたセメント質内にシャーピー線維による投錨構造を示すことから、機能的なセメント質を形成したことが確認された (図 3 B)。

4. 組織工学的手法を用いた歯科再生医療技術の開発

前述のごとく、セメント芽細胞前駆体の分離に不死化技術が有効であることが示された。したがって、不死化技術を利用すれば、抜歯歯牙より幹細胞あるいは前駆体を採取し、歯周病再生医療に必要な細胞数を生体外増幅することも可能になる。このような技術が可能になれば、歯周病で部分的に崩壊

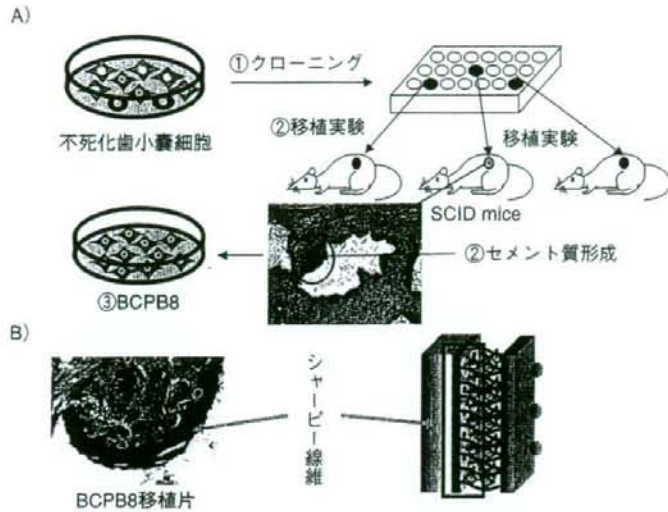


図3 セメント芽細胞前駆体株 BCPB8 の採取方法とその特性

A) セメント芽細胞前駆体細胞株の樹立方法：不死化歯小囊細胞より単細胞クローンを樹立し①，移植実験にてセメント質形成を有するクローンをスクリーニングし②，セメント芽細胞前駆体細胞株 (bovine cementoblast progenitor: BCPB8) を樹立した③。B) BCPB8 の特性：BCPB8 は移植することにより生体内でシャーピー線維構造物を形成した。

を受けた組織に対して，組織工学的手法を用いた再生医療技術により対応できるようにするであろう。このような組織工学的手法を用いた新規歯周病再生療法の可能性について，その概略を図4に示した。

この戦略では，試験管内でセメント芽細胞前駆体を生体吸収性材料に自着させる。そしてこの生体材料を，歯周病治療では再生の必要な部位へ挿入して歯周組織の再生を促す。インプラント（人工歯根）治療ではこの生体材料をインプラント担体に付着させ，表面上にセメント質を形成させ，最終的には歯根膜付インプラントを生体内で形成することを目指している。

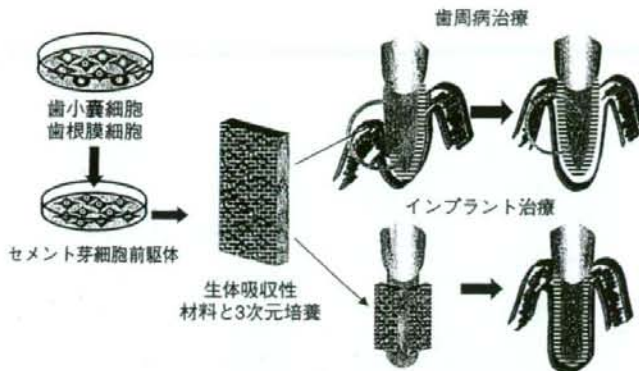


図4 組織工学を応用した新規歯周病再生医療

セメント芽細胞前駆体を分離培養し、これらを生体吸収性材料上で3次元培養を行いハイブリッド型生体材料を作製する。歯周病再生医療の場合は、この生体材料を歯周病罹患部位へ移植して結合組織性再付着を導く。インプラント治療の場合は、インプラント担体にハイブリッド型生体材料を付着させ歯根膜付着型インプラントの作製を目指す。

以上述べてきたように、セメント質形成機構に関しては不明な点が多く残されているが、セメント芽細胞前駆体を用いればセメント質形成を人為的に誘導できることが明らかとなった。第2章で述べたように成人歯根膜中にも幹細胞が存在することが明らかになったことから、幹細胞移植によるセメント質再生療法の開発も近い将来可能になるであろう。そのためには、歯および歯周組織中に存在する幹細胞あるいはセメント芽細胞前駆体のマーカーの同定、および分化の調節メカニズムの解明が今後の重要な研究分野となっていくと考えられる。このような基礎的な研究成果の蓄積が、近い将来有望なセメント質再生の実現化へ導くであろう。

(齋藤 正寛)

文 献

- 1) MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, et al : Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 33 : 1-7, 1995
- 2) Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, et al : Cell attachment activity of cementum : bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontal Res* 26 : 10-16, 1991
- 3) Slavkin HC, Bringas P Jr, Bessem C, et al : Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontal Res* 24 : 28-40, 1989
- 4) Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ : The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. *J Periodontol* 72 : 679-687, 2001
- 5) Bosshardt DD, Nanci A : Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 46 : 135-142, 1998
- 6) Fong CD, Hammarstrom L : Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90 : 218-223, 2000
- 7) Hatakeyama J, Sreenath T, Hatakeyama Y, et al : Rankl-mediated osteoclastogenic pathway is elevated in amelogenin null mice {micro}. *J Biol Chem* 8 : 8, 2003
- 8) Fukumoto S, Kiba T, Hall B, et al : Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* 167 : 973-983, 2004
- 9) Wu D, Ikezawa K, Parker T, et al : Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 11 : 686-692, 1996
- 10) Saito M, Narayana AS : Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 14 : 65-72, 1999
- 11) Saito M, Iwase M, Maslan S, et al : Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 29 : 242-248, 2001
- 12) Handa K, Saito M, Yamauchi M, et al : Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone* 31 : 606-611,

2002

- 13) Kiyono T, Foster SA, Koop JI, et al : Both Rb/p16ink4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396 : 84-88, 1998
- 14) Saito M, Handa H, Kiyono T, et al : Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and Tert. *J Bone Miner Res* 20 : 50-57, 2005 (epub 2004 Oct 18)

3

歯周組織

1. 歯根膜解析の新しいアプローチ

歯周組織は歯の周囲に存在する歯の支持組織で、セメント質、歯根膜、歯槽骨および歯肉によって構成されている。近年の研究から、歯周組織のなかでも歯根膜は、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す最も重要な組織の1つであることが明らかとなっている。

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の結合組織であり、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 μm 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行い、歯周組織の動的平衡を保っていると考えられている¹⁾。

近年の研究により歯根膜は、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が明らかとなってきた²⁾。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、硬組織形成に関与する分子の発現が高いことも明らかにされている³⁾。このように生体内において重要かつユニーク

な組織である歯根膜組織については、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、遺伝子レベルでの特徴については十分に解明されているとは言い難い。

ヒトの身体は、約60兆個のさまざまな形態や機能を有する細胞が相互に協調しながら形作られている。約60兆個のすべての細胞は、共通のゲノム30億塩基対をその核の中に含有し、そのゲノムは、約2万数千個あるといわれているすべての遺伝子を発現し機能するポテンシャルを有している。しかしながら、実際には、すべての組織・細胞において、すべての遺伝子が常に発現し機能しているわけではなく、各々の組織・細胞において、異なった遺伝子発現の組み合わせが存在し、その組み合わせのパターンこそが組織・細胞の多岐にわたる形態や機能といった特異性を導き、身体を形作っているといえる。たとえば、目の網膜には、網膜特有の遺伝子発現パターンが、髪の毛根には、毛根特有の遺伝子発現パターンが存在する。このようなヒト身体の各組織・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の試みがなされるようになっていく。

Okuboらの方法では、解析したい組織・細胞から3'末端 cDNA ライブラリーを構築する⁴⁾。この3'末端 cDNA ライブラリーは、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2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、ライブラリー中の 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。このライブラリー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

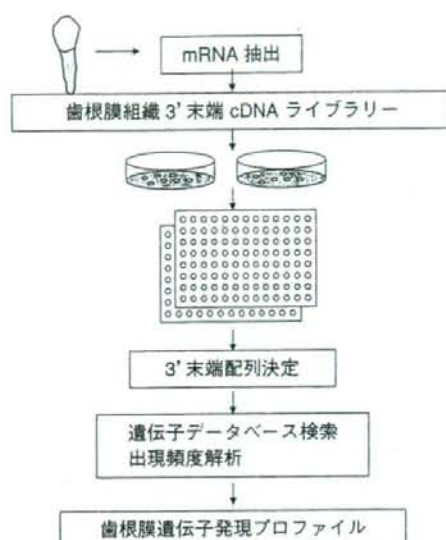


図1 ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル解析

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。

2. 歯根膜の遺伝子発現プロファイル解析

われわれは、この手法を用いて歯根膜組織における遺伝子発現プロファイ

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 α-2</i>	46
<i>collagen type I α-1</i>	45
<i>collagen type III α-1</i>	30
オステオネクチン	22
<i>collagen type I α-2 partial exon 1</i>	17
<i>collagen type III α-2</i>	17
<i>ribosomal protein L21</i>	12
ベリオスチン	8
<i>ribosomal protein S18</i>	8
<i>ribosomal protein L13a</i>	7
unknown (PLAP-1)	7
<i>ribosomal protein L30</i>	6
<i>translationally-controlled 1</i>	6
<i>28S ribosomal RNA</i>	6

ル解析(歯根膜の BodyMap)を行うことを試みた⁵⁾。図1に示すように、矯正治療中の患者より便宜抜去された歯の歯根膜組織から得られた mRNA より歯根膜組織 3'末端 cDNA ライブラリーを構築した。前述のように、このライブラリー中の cDNA クローンの存在比率は *in vivo* 歯根膜組織での恒常的な mRNA 構成を正確に再現しているものと考えられる。次に無作為に選択した 1,752 個の cDNA クローンの塩基配列を DNA シークエンサーにて解読し、コンピュータ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行い、歯根膜組織遺伝子発現プロファイルを作成した(頻度 6 以上を表1に示す)。

歯根膜組織は形態的に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。ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイル解析の結果、*collagen type I α -2*、*collagen type I α -1* および *collagen type III α -1* 遺伝子などの高発現を認め、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行われ、結合組織のリモデリングが恒常的に行われていることが推測される。次いで高い発現を認めるオステオネクチン(*osteonectin*) 遺伝子のコードする蛋白は、骨において豊富に見られる非コラーゲン性の基質蛋白であり、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/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⁶⁾。また、歯根膜細胞においては、オステオネクチン蛋白の発現上昇が matrix metalloproteinases (MMPs) の産生を亢進させる結果、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⁷⁾。これらの知見よりオステオネクチン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。

また、ペリオスチン(*periostin*) 遺伝子の高い発現も同時に認められた。ペリオスチン遺伝子は MC3T3-E1 のライブラリーより単離・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行っていると考えられている⁸⁾。このオステオネクチンおよびペリオスチン遺伝子の高発現は、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持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. 新規歯根膜特異的細胞外基質 PLAP-1

歯根膜組織遺伝子発現プロファイルの中に、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全く未知の新規 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

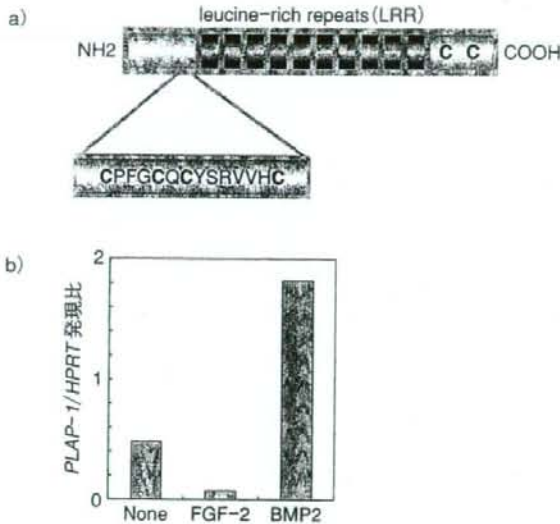


図2 歯根膜特異的細胞外基質 PLAP-1

- 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) FGF-2 および BMP2 による *PLAP-1* 遺伝子発現制御 (文献 6 より改変). 各サイトカインにてヒト歯根膜細胞を 48 時間刺激した際の *PLAP-1* 遺伝子発現を, *HPRT* 遺伝子発現を基準とした real-time PCR により解析した.

全長 2.5 kbp 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 2 a). われわれは, この遺伝子を *PLAP-1* (periodontal ligament associated protein-1) と命名し, 予想される蛋白質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, プロテオグリカンであるデコリン (decorin) およびバイグリカン (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⁹⁾. デコリンおよびバイグリ

カン、これまで骨の形成や形態維持に重要な役割を果たしていることが報告されている。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1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⁹⁾。

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行ったところ、*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、骨膜などには全くその発現が認められないことが明らかとなった。歯根膜での詳細な発現を解析してみると、*PLAP-1* 遺伝子は歯根膜中央部に強く発現しており、セメント質および歯槽骨側での発現は弱いことが明らかとなり、PLAP-1 は、歯根膜組織内でもその発現分布があることが示された。

次に、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、骨形成誘導能を持つ骨形成因子 (bone morphogenetic protein: BMP)2 および BMP4 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 (fibroblast growth factor-2: FGF-2) 添加により *PLAP-1* 遺伝子の発現が著明に抑制された (図 2b)。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⁹⁾。

次に *in vitro* において *PLAP-1* 遺伝子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アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

の上昇および石灰化ノジュール形成が抑制され、BMP2 刺激によって誘導される ALP 活性の上昇も抑制された。一方、RNAi (RNA interference : RNA 干渉) 法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、BMP2 刺激によって誘導される ALP 活性がより増強された。以上の結果から、*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 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 (投稿準備中)。

以上から、新規の細胞外基質蛋白である *PLAP-1* は、硬組織形成に対して抑制的に作用し、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組織の恒常性維持に重要な因子であることが示唆された。

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、アスポリン (asporin) と名づけている^{10,11)}。最近、アスポリン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*/アスポリンが、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1つであることが示唆される。今後は、歯周病と *PLAP-1*/アスポリンとの関連性についても解明してい

くことが必要であろう。

(山田 聡・村上 伸也)

文 献

- 1) Beertse W, McCulloch CA, Sodek J : The periodontal ligament : a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontology* 2000 13 : 20-40, 1997
- 2) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364 : 149-155, 2004
- 3) Somerman MJ, Archr SY, Imm GR, et al : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblast in vitro. *J Dent Res* 67 : 66-70, 1988
- 4) Okubo K, Hori N, Matoba R, et al : Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet* 2 : 173-179, 1992
- 5) Yamada S, Murakami S, Matoba R, 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
- 6) Kelm RJ Jr, Swords NA, Orfeo T, et al : Osteonectin in matrix remodeling, a plasminogen-osteonectin-collagen complex. *J Biol Chem* 269 : 30147-30153, 1994
- 7) Fujita T, Shiba H, Sakata M, 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
- 8) Wilde J, Yonezaki M, Terai K, et al : The divergent expression of periostin mRNA in the periodontal ligament during experimental tooth movement. *Cell Tissue Res* 312 : 345-351, 2003
- 9) Yamada S, Ozawa Y, Tomoeda M, et al : Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. *J Dent Res* 85 : 447-451, 2006
- 10) Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, et al : Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem* 276 : 12221-12221, 2001
- 11) Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, et al : Identification and characterization of asporin, a novel member of the leucine-rich