

3. Results

3.1. ES cells can be derived from CD9 knockout embryos

To understand the function of CD9 in ES cells, we investigated the effects of the complete loss of CD9 function by gene targeting the *CD9* gene in mouse ES cells. The crucial role of CD9 in sperm-egg fusion was demonstrated by the inability of *CD9* knockout mouse oocytes to fuse with sperm (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000, 2008) and by the ability of anti-CD9 antibodies to inhibit fusion (Chen et al., 1999; Le Naour et al., 2000; Miller et al., 2000). Therefore, *CD9*^{-/-} fertilized eggs cannot

be obtained by a cross of *CD9*^{-/-} female and male mice. To address this issue, we used ICSI to insert *CD9*^{-/-} sperm directly into the cytoplasm of *CD9*^{-/-} eggs and so bypass the fusion step (Miyado et al., 2000). Each *CD9*^{-/-} egg injected with *CD9*^{-/-} sperm was activated and *CD9*^{-/-} ES cells were successfully isolated from the blastocyst of the *CD9*^{-/-} fertilized egg, as described above. This procedure yielded several independent clones of viable *CD9*^{-/-} ES cells. These *CD9*^{-/-} ES cell lines were characterized in detail by immunostaining and RT-PCR analyses, showing high expression of ES cell markers at the same levels as wild-type ES cells, as well as the loss of *CD9* gene products (Fig. 1A and B). To further characterize *CD9*^{-/-} ES cells, we evaluated ALP activity, which is

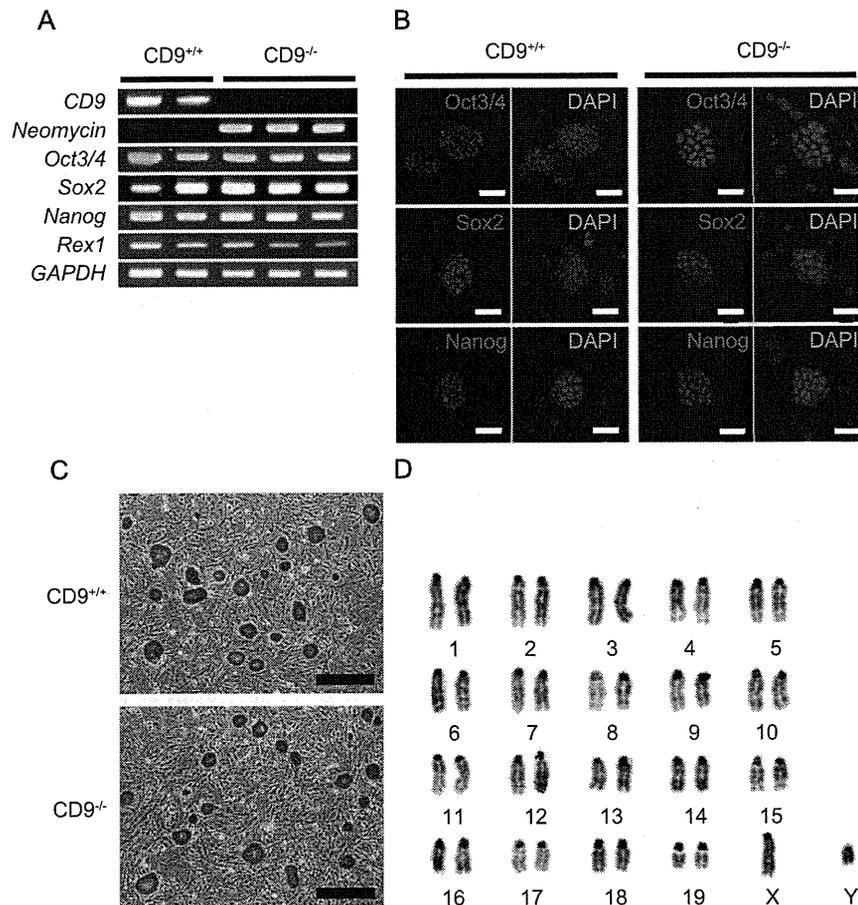


Fig. 1. Expression of ES cell-markers and karyotype analysis in *CD9* knockout ES cells. (A) RT-PCR analysis of ES cell-marker genes. Transcripts of *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* and *Rex1* were detected in both *CD9*^{-/-} and *CD9*^{+/+} ES cells without feeder cells. A neomycin-resistance gene was targeted to delete a part of the third exon and all of the fourth exon of *CD9*. Therefore, neomycin gene was detected in *CD9*^{-/-} ES cell lines. (B) *CD9*^{-/-} and *CD9*^{+/+} ES cells were fixed and stained with antibodies against Oct3/4, Nanog and Sox2. Nuclei were counterstained with DAPI. Bars = 50 μm. (C) Alkaline phosphatase staining shows undifferentiated *CD9*^{-/-} ES cells as well as *CD9*^{+/+} ES cells. Bars = 500 μm. (D) *CD9*^{-/-} ES cells maintained a normal karyotype of 40XY.

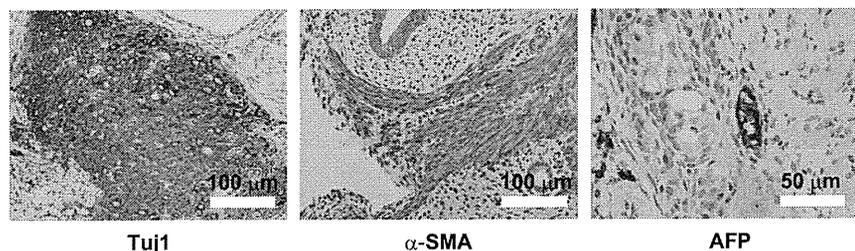


Fig. 2. Teratomas of *CD9* knockout ES cells containing all three germ layers. *CD9*^{-/-} ES cells were inoculated subcutaneously into nude mice. After 4 weeks, teratomas were stained with antibodies of Tuj1 (ectoderm), α-SMA (mesoderm) and AFP (endoderm). Scale bars were shown on each panel.

an indicator of a pluripotent and undifferentiated state. Despite the absence of CD9, $CD9^{-/-}$ ES cells stained positive for ALP activity and retained the morphological features of undifferentiated ES cells (Fig. 1C and Supplementary Fig. S1). These results suggest that CD9 is not essential for the self-renewal of ES cells in an undifferentiated state. In addition to the ability to maintain the undifferentiated state, ES cells retain a normal diploid karyotype. Thus, we next karyotyped all $CD9^{-/-}$ ES cell lines at passage 4–5 by standard G-banding. As a result, chromosomal appearance was normal in all analyzed nuclei (Fig. 1D). These results indicate that $CD9^{-/-}$ ES cells retain similar properties to wild-type ES cells.

3.2. CD9-deficient ES cells differentiate into three germ layers

ES cells can give rise to cells of different fates *in vivo* and *ex vivo*. With appropriate culture conditions, ES cells form embryoid bodies (EBs) and are capable of differentiating into a variety of tissue types, such as tissues from extraembryonic endoderm, ectoderm and mesoderm. To further evaluate ability of $CD9^{-/-}$ ES cells to differentiate, we then examined the pluripotency of $CD9^{-/-}$ ES cells by teratoma formation. Four weeks after subcutaneous injection of $CD9^{-/-}$ ES cells into immunodeficient mice, tumors were obtained. Histological examination revealed that injected $CD9^{-/-}$ ES cells differentiated into all three germ layers, including class III beta-tubulin (Tuj1, ectoderm), alpha-fetoprotein (AFP, endoderm) and alpha-smooth muscle actin (α -SMA, mesoderm) (Fig. 2). These data demonstrate that the $CD9^{-/-}$ ES cells exhibit pluripotency *in vivo*. To further characterize the pluripotency and establish developmental normality of $CD9^{-/-}$ ES, mouse chimeras were generated using $CD9^{-/-}$ ES cells. These cells we had previously labelled with *EGFP* transgene (transfecting the cells with constitutive reporter vector CAG-EGFP). After sorting for GFP-positive $CD9^{-/-}$ ES cells, the fluorescent cells were injected into blastocysts and the embryos transplanted into uteri of pseudopregnant mice to produce chimaeric embryos. We obtained embryos with widespread fluorescent cells derived from the $CD9^{-/-}$ ES cells, indicating that these $CD9^{-/-}$ ES cells were pluripotent (Fig. 3). These data indicate that the CD9 function in ES cells might not be necessary for the maintenance of pluripotency during early embryonic development.

3.3. CD9 knockout ES cells display similar global gene-expression profiles to wild-type ES cells

As described above, $CD9^{-/-}$ ES cells exhibited the same phenotype as wild-type ES cells. Additionally we investigated how similar the $CD9$ knockout ES cells were to wild-type ES cells in terms of their global gene expression. Cluster analysis of mouse

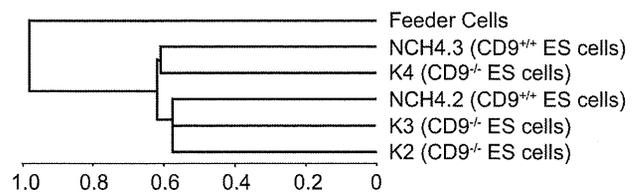


Fig. 4. Gene-expression profile in $CD9$ knockout ES cells. Global gene-expression patterns were compared between $CD9^{-/-}$ ES cell lines and $CD9^{+/+}$ ES cell lines with oligonucleotide DNA microarrays. The figure is a hierarchical cluster based on the expression values for all probe sets derived from genome-wide microarray expression data of indicated cell types using the Pearson correlation distance. Compared with feeder cells, all $CD9$ knockout ES cell lines appear highly similar to the wild-type ES cell lines.

transcriptome array (GeneChip, the Mouse Genome 430 2.0 array; Affymetrix) emphasized that the global gene-expression patterns are similar, but not identical, between three $CD9^{-/-}$ ES cell lines (K2, K3 and K4) and two wild-type ES cell line (NCH4.2 and NCH4.3), as compared with feeders (Fig. 4). Subsequently, in order to estimate the expression pattern of genes associated with CD9, we focused on the function of CD9. CD9 has been implicated in cellular motility and intercellular adhesion in several cellular types (Boucheix and Rubinstein, 2001; Feigelson et al., 2003; Hemler, 2001; Lagaudriere-Gesbert et al., 1997). Therefore, we listed the expression profile of genes associated with extracellular matrix and intercellular adhesion (Supplemental Tables S2 and S3) but there was no significant difference between $CD9^{-/-}$ and wild-type ES cells. Supplemental Table S4 summarizes the expression of tetraspanin family genes that are predicted to compensate for any function of CD9 molecule in $CD9^{-/-}$ ES cells (Boucheix and Rubinstein, 2001). However, the expression change of other tetraspanin family genes was not caused by absence or disruption of CD9 function. In addition, an example of immunostaining with CD81, which is closely related to CD9 (Supplementary Fig. S2), demonstrates that CD81 does not compensate for any function of CD9 molecules in $CD9^{-/-}$ ES cells. These findings further highlight the similarity of gene-expression level between $CD9^{-/-}$ and wild-type ES cells.

3.4. Effect of anti-CD9 monoclonal antibody on maintenance in ES cells

As described above, CD9 may be dispensable for maintenance in ES cells. However, it has been previously reported that CD9 can maintain an undifferentiated state via the regulation of LIF/STAT3 pathway in ES cells, which is critical for self-renewal of these cells. Furthermore, a blocking antibody against CD9 (KMC8) inhibited colony formation and survival of ES cells. These results suggest that CD9 plays a role in maintenance of ES cells *in vitro* (Oka et al., 2002). The discrepancies between our findings and earlier reports may be due to anti-CD9 monoclonal antibody (mAb) used in the earlier study simultaneously blocking all specific and non-specific CD9 antigens in ES cell cultures. Consequently, we tested the impact of treatment with anti-CD9 mAb. Our $CD9^{+/+}$ ES cell lines remained normally maintained after treatment with anti-CD9 mAb (Fig. 5). This result strongly supports our data of $CD9$ -knockout experiments. Taken together, these findings suggest that the differentiation of ES cells is not caused by the loss of CD9, but its expression is down-regulated as a consequence of differentiation.

4. Discussion

We established and maintained ES cells deficient for CD9, a well-known tetraspanin membrane protein. This provides

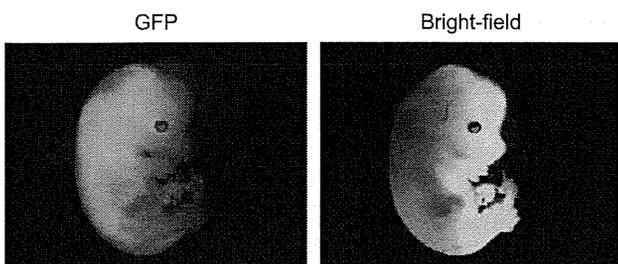


Fig. 3. Chimeric embryos derived from $CD9$ knockout ES cells. When EGFP-positive $CD9^{-/-}$ ES cells, which were homozygotes for the partially deleted $CD9$ allele and marked by the constitutively active *EGFP* transgene, were injected into blastocysts, the embryos developed to chimeras at E13.5 in which widespread contributions of GFP-positive cells were observed in fluorescent stereomicroscopic observation.

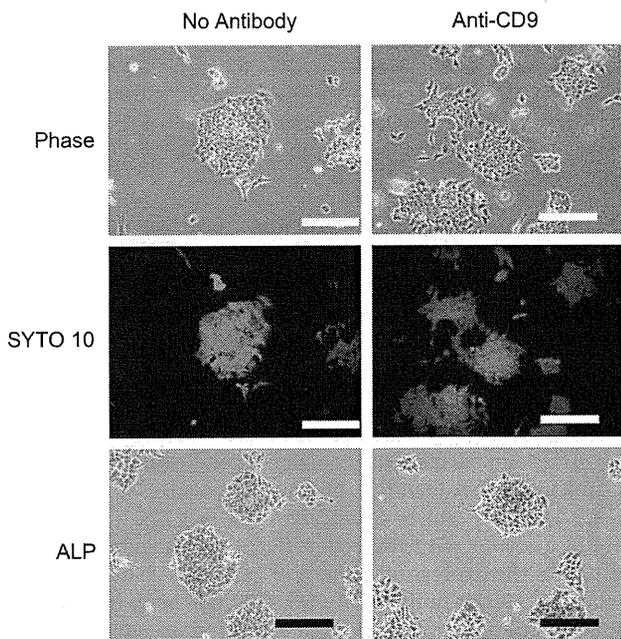


Fig. 5. Effect of anti-CD9 antibody on maintenance of undifferentiation and viability of ES cells. Phase contrast images of cells are shown in top panels. Cell viability was monitored by staining cells with SYTO10, which stains nucleic acids of live cells with green fluorescence (middle panels). Bottom panels show ALP staining to detect undifferentiated state in ES cells after treatment of anti-CD9 antibody. Bars = 200 μ m.

evidence that CD9 is dispensable for maintenance of an undifferentiated state and pluripotency. However, it has been reported that CD9 is strongly expressed in mouse and human ES cells, suggesting that CD9 may be a marker of pluripotent stem cells (Nash et al., 2007; Oka et al., 2002). Therefore, our CD9 knockout ES cell lines should help elucidate the role of CD9 in the self-renewal of stem cells and their capacity to differentiate.

The function of CD9 in ES cells may contrast the situation involving other cell types. For example, absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation and survival in small cell lung cancer cells (SCLC), in serum-deprived conditions, via the activation of PI3K/Akt signaling (Saito et al., 2006). In this event, the mechanism of which ligands contact with CD9 is not fully understood. In addition, CD9 seems to act as a suppressor of metastasis because its transfection into melanoma cells reduces the metastatic potential and there is an inverse correlation between expression of CD9 and appearance of metastasis in melanoma, colon, lung and breast cancers (Gutierrez-Lopez et al., 2003; Higashiyama et al., 1995; Miyake et al., 1995, 1996; Mori et al., 1998). Therefore, ectopic expression of CD9 may exert a negative effect on adhesion-dependent activation of some signaling pathways. Despite the striking biological differences between ES cells and cancer cells, including cancer stem cells, CD9 might be deeply involved in cellular immortality and cell migration capability in both cell types, suggesting the possibility that CD9 also contributes to stem cell-like phenotypes shown by many tumors.

Although CD9 protein was expressed in endometrium epithelial cells and preimplantation embryos, it played an inhibitory role in embryo implantation. At present, the ligands or mediators for CD9 have not been confirmed but there is evidence to suggest that a morphological or functional alteration of the CD9 molecule by anti-CD9 mAb can lead to significant biological changes in various cells, such as anti-CD9 mAb activating mouse macrophages, including cell aggregation in the mouse macrophage cell line

J774, causing hematopoietic cells to migrate (Aoyama et al., 1999; Forsyth, 1991; Jennings et al., 1990; Kaji et al., 2001). Moreover, anti-CD9 mAb plays an important role in embryo implantation by blocking the CD9 extracellular domain (Liu et al., 2006). However, when CD9^{-/-} and CD9^{+/+} two-cell embryos were transferred into wild-type pseudopregnant females, the rate of embryos developing to term was not significantly different (Miyado et al., 2000), suggesting that the deficiency of CD9 does not affect the developmental processes. During the early development period, CD9 is expressed on blastomeres of two-, four- and eight-cells and morula embryos and on the inner cell mass (ICM) and trophoblast cells of blastocysts (Supplementary Fig. S3) (Liu et al., 2006). Therefore, when ES cells are isolated from the ICM, expression of CD9 may also be maintained after a process of outgrowth behavior of the ICM *in vitro* on a monolayer of mouse embryonic fibroblasts. In our study, to verify the role of CD9 during embryo development, we investigated the contribution of CD9-knockout ES cells during the early development stage through generation of chimeric embryos, in the process indicating that CD9-knockout ES cells were pluripotent. In summary, our work demonstrates that CD9 was dispensable for both the maintenance of pluripotency in ES cells and the development of embryos.

In conclusion, our findings demonstrate that CD9 does not functionally contribute to maintenance of ES cells *in vitro*. Nevertheless, the expression of CD9 in ES cells is decreased during differentiation after withdrawal of LIF (Oka et al., 2002). Therefore, we should consider that CD9 might be one of several markers for identification of pluripotent stem cells without functional significance, similar to Oct3/4 and Nanog. Although CD9 is an important molecule for the regulation of some biological functions in cells, its true function(s) is(are) not well understood. We hope the CD9-knockout ES cells we have established here will prove useful for further studies to provide better understanding of the importance, functions and mode of actions of CD9 in various life processes.

Acknowledgments

We thank Dr. Dieter Egli (Columbia University, NY) and Dr. Mahendra S. Rao (Life Technologies (formerly Invitrogen), Carlsbad, CA) for critical review of the manuscript. We also thank Dr. Yoriko Takahashi (Mitsui Knowledge Industry, Tokyo, Japan) for DNA microarray analysis. We are grateful to Dr. Masaru Okabe (Genome Information Research Center, Osaka University, Osaka, Japan) for providing the EGFP vector (pCX-EGFP). This work was supported by Health and Labour Sciences Research Grants.

Appendix A. Supporting Information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.diff.2009.08.005.

References

- Akutsu, H., Tres, L.L., Tateno, H., Yanagimachi, R., Kierszenbaum, A.L., 2001. Offspring from normal mouse oocytes injected with sperm heads from the *azh/azh* mouse display more severe sperm tail abnormalities than the original mutant. *Biol. Reprod.* 64, 249–256.
- Aoyama, K., Oritani, K., Yokota, T., Ishikawa, J., Nishiura, T., Miyake, K., Kanakura, Y., Tomiyama, Y., Kincade, P.W., Matsuzawa, Y., 1999. Stromal cell CD9 regulates differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 93, 2586–2594.
- Barrow, K.M., Ward, C.M., Rutter, J., Ali, S., Stern, P.L., 2005. Embryonic expression of murine 5T4 oncofetal antigen is associated with morphogenetic events at implantation and in developing epithelia. *Dev. Dyn.* 233, 1535–1545.

- Boucheix, C., Rubinstein, E., 2001. Tetraspanins. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1189–1205.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., Dalton, S., 2005. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885–896.
- Chen, M.S., Tung, K.S., Coonrod, S.A., Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., Yamashita, Y., Kincade, P.W., Herr, J.C., White, J.M., 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11830–11835.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14863–14868.
- Feigelson, S.W., Grabovsky, V., Shamri, R., Levy, S., Alon, R., 2003. The CD81 tetraspanin facilitates instantaneous leukocyte VLA-4 adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) under shear flow. *J. Biol. Chem.* 278, 51203–51212.
- Forsyth, K.D., 1991. Anti-CD9 antibodies augment neutrophil adherence to endothelium. *Immunology* 72, 292–296.
- Gutierrez-Lopez, M.D., Ovalle, S., Yanez-Mo, M., Sanchez-Sanchez, N., Rubinstein, E., Olmo, N., Lizarbe, M.A., Sanchez-Madrid, F., Cabanas, C., 2003. A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated beta1 integrin. *J. Biol. Chem.* 278, 208–218.
- Hadjiargyrou, M., Patterson, P.H., 1995. An anti-CD9 monoclonal antibody promotes adhesion and induces proliferation of Schwann cells in vitro. *J. Neurosci.* 15, 574–583.
- Hemler, M.E., 2001. Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* 155, 1103–1107.
- Higashiyama, M., Taki, T., Ieki, Y., Adachi, M., Huang, C.L., Koh, T., Kodama, K., Doi, O., Miyake, M., 1995. Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 55, 6040–6044.
- Ikawa, M., Yamada, S., Nakanishi, T., Okabe, M., 1999. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 44, 1–20.
- Jennings, L.K., Fox, C.F., Kouns, W.C., McKay, C.P., Ballou, L.R., Schultz, H.E., 1990. The activation of human platelets mediated by anti-human platelet p24/CD9 monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 265, 3815–3822.
- Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S., Kudo, A., 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet.* 24, 279–282.
- Kaji, K., Takeshita, S., Miyake, K., Takai, T., Kudo, A., 2001. Functional association of CD9 with the Fc gamma receptors in macrophages. *J. Immunol.* 166, 3256–3265.
- Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., Shinohara, T., 2004. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 70, 70–75.
- Kaprielian, Z., Cho, K.O., Hadjiargyrou, M., Patterson, P.H., 1995. CD9, a major platelet cell surface glycoprotein, is a ROCA antigen and is expressed in the nervous system. *J. Neurosci.* 15, 562–573.
- Lagaudriere-Gesbert, C., Le Naour, F., Lebel-Binay, S., Billard, M., Lemichez, E., Boquet, P., Boucheix, C., Conjeaud, H., Rubinstein, E., 1997. Functional analysis of four tetraspanins, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in co-stimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell. Immunol.* 182, 105–112.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., Boucheix, C., 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287, 319–321.
- Liu, W.M., Cao, Y.J., Yang, Y.J., Li, J., Hu, Z., Duan, E.K., 2006. Tetraspanin CD9 regulates invasion during mouse embryo implantation. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 121–130.
- Miller, B.J., Georges-Labouesse, E., Primakoff, P., Myles, D.G., 2000. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *J. Cell Biol.* 149, 1289–1296.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M., Mekada, E., 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287, 321–324.
- Miyado, K., Yoshida, K., Yamagata, K., Sakakibara, K., Okabe, M., Wang, X., Miyamoto, K., Akutsu, H., Kondo, T., Takahashi, Y., Ban, T., Ito, C., Toshimori, K., Nakamura, A., Ito, M., Miyado, M., Mekada, E., Umezawa, A., 2008. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 12921–12926.
- Miyake, M., Nakano, K., Ieki, Y., Adachi, M., Huang, C.L., Itoi, S., Koh, T., Taki, T., 1995. Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res.* 55, 4127–4131.
- Miyake, M., Nakano, K., Itoi, S.L., Koh, T., Taki, T., 1996. Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 56, 1244–1249.
- Mori, M., Mimori, K., Shiraishi, T., Haraguchi, M., Ueo, H., Barnard, G.F., Akiyoshi, T., 1998. Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 4, 1507–1510.
- Nash, R., Neves, L., Faast, R., Pierce, M., Dalton, S., 2007. The lectin *Dolichos biflorus* agglutinin recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells* 25, 974–982.
- Oka, M., Tagoku, K., Russell, T.L., Nakano, Y., Hamazaki, T., Meyer, E.M., Yokota, T., Terada, N., 2002. CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 1274–1281.
- Pelton, T.A., Sharma, S., Schulz, T.C., Rathjen, J., Rathjen, P.D., 2002. Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation in vivo and in vitro pluripotent cell development. *J. Cell Sci.* 115, 329–339.
- Rathjen, J., Lake, J.A., Bettess, M.D., Washington, J.M., Chapman, G., Rathjen, P.D., 1999. Formation of a primitive ectoderm-like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. *J. Cell Sci.* 112 (Pt. 5), 601–612.
- Saito, Y., Tachibana, I., Takeda, Y., Yamane, H., He, P., Suzuki, M., Minami, S., Kijima, T., Yoshida, M., Kumagai, T., Osaki, T., Kawase, I., 2006. Absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation, survival, and matrix metalloproteinase-2 production in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 66, 9557–9565.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D., 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688–690.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N.M., 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684–687.

はじめに

Introduction



村上伸也

Shinya MURAKAMI

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

歯科における二大疾患は、う蝕と歯周病である。これらの疾患が慢性感染病巣として遠隔の組織・臓器に影響を及ぼす可能性(歯性病巣感染)については、20世紀初頭にすでに指摘されていたといわれている。しかし、十分な科学的エビデンスが得られないまま、その関連性の真偽に関しては放置されることとなった。そしていま、歯周病と全身疾患・全身状態との関連にあらたに科学のメスが入れられている。この学問領域は Periodontal Medicine (歯周医学)とよばれ、歯周病菌による感染症の観点や、歯周組織に惹起される慢性炎症巣という観点から、多くの科学者が基礎研究・疫学研究を精力的に展開している。

歯周病と全身疾患の関連がアメリカの学会などを中心に報告されるようになると、『USA Today』の紙上で、「Floss or Die(フロスをするか死を選ぶか)」とセンセーショナルな言葉でメッセージが発せられた。また、2006年9月には『Wall Street Journal』の紙上において、「Health Plans Expand Dental Benefits(生活習慣病等への医療費支出抑制を期待し、全米大手の健康保険会社が歯周病治療に対する補償範囲を拡大した)」とのニュースを伝えている。このように、一般国民に歯周病と全身疾患の関連が周知されることとなった。

一方、これらを契機として、より大規模で慎重な疫学調査やメタ解析なども行われるようになり、それまでなされてきた一部の報告に関して証拠不十分とする反論も報告されてきているのも事実である。すなわち、歯周病と全身疾患・全身状態との関連をいま一度慎重に再評価しようとしているのが、いまの世界の実情ではなからうか。このような状況を受け、NPO 法人日本歯周病学会はエビデンスとコンセンサスをベースにした“糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン”を作成し、歯周病に対する治療の指針を示している(日本歯周病学会ホームページ <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsp2/pub/index.htm> にて公開中)。

本特集では、歯周病と各種の全身疾患・全身状態との関連について継続的かつ精力的に研究を続けておられるわが国の先生方に執筆を依頼し、現時点で得られている臨床的エビデンス、基礎研究の成果を整理していただくとともに、いまこの分野で残されている課題を抽出していただいた。

今回の特集が歯周病と全身疾患・全身状態との関連についての理解を深め、その可能性について再考していただくきっかけとなれば幸いである。また、得られた研究成果をベースにした医科-歯科の連携が推進され、よりよい医療が国民に提供される素地が形成されることを念じてやまない。

総論 — 歯周病と全身疾患

The relationship between periodontal disease and systemic disease



北村正博(写真左) 村上伸也(写真右)

Masahiro KITAMURA and Shinya MURAKAMI

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

◎歯周病は歯周ポケット内の細菌バイオフィームが原因となって発症する慢性炎症性疾患であることから、その病態は歯周病原菌の持続的感染とそれに対する生体防御とのバランスにより決定される。そのため、歯周病原菌に対する生体防御機能を減弱させるような全身疾患を有する患者では、歯周病の発症や進行のリスクが高くなると以前より考えられてきた。一方、歯周病原菌と宿主の免疫・炎症反応との相互作用が解明されるに従い、歯周病が種々の全身疾患のリスク因子のひとつとなり、全身の健康を脅かす可能性が示唆されている。近年、歯周病と全身との相互関係を双方向的に解明する歯周医学(Periodontal Medicine)とよばれる新しい学問分野が創出され、今後のこの分野におけるさらなるエビデンスの集積が期待されている。

Key word 歯周病, 全身疾患, 歯周医学(Periodontal Medicine)

歯周病とは

歯周病は、歯肉と歯の境界部に形成される歯周病原菌により構成される細菌バイオフィーム¹⁾(プラーク)が原因となり、歯を支持している歯周組織が破壊される炎症性疾患で、わが国の成人の約80%が罹患している。口腔清掃不良によりプラークが付着した状態が持続すると、プラーク由来の起炎物質によりまず歯肉の発赤・腫脹が生じる。このプラークにより惹起された炎症が歯肉のみに限局し、歯肉の腫脹により歯と歯肉の間の歯肉溝が深くなり、いわゆる歯肉ポケットが形成された状態は、歯周病の初期段階として歯肉炎(gingivitis)とよばれる。この歯肉炎が未治療のまま長期間放置されると、歯と歯肉の接合部分が傷害され、歯の周囲にさらに深いポケット(歯周ポケット)が形成されて、歯根膜や歯槽骨などの深部歯周組織に炎症が波及した歯周炎(periodontitis)へと進行する。そして歯周炎がさらに進行し重症化すると、歯を支持している歯槽骨の吸収が大きくなり、歯が動揺し、最終的には歯が脱落することとなる(図1)。

歯周病の発症・進行と生体応答との関連

歯周病は細菌の集合体であるプラークが原因となって発症・進行することから、細菌感染症といえる。しかし、原因菌の多様性や感染様式などの点で、単一の病原菌が体内に侵入することにより生じる通常の感染症とは異なった様相を呈する。すなわち、歯周病では特定の細菌が単独で感染源となるのではなく、*Porphyromonas gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* など10数種類のグラム陰性嫌気性菌が、有力な病原菌(歯周病原菌)として歯周病の発症・進行に関与している。

これらの歯周病原菌は自ら産生した glycoalyx (菌体外多糖)に被覆され、多種多様な細菌が共生・集合した細菌バイオフィームを歯周ポケット内に形成している。このバイオフィームは細菌排除機構に対するバリアとして機能するだけでなく、内部の細菌の細胞壁の肥厚や代謝活性の低下をもたらし、生体の免疫機能(抗体や食細胞など)や抗菌薬に対する抵抗性の獲得による歯周病の難治化の誘因になっている。

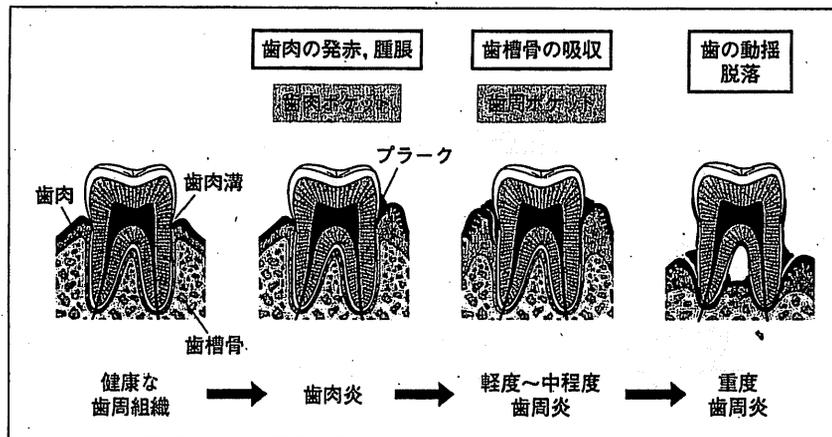


図 1. 歯周病の進行

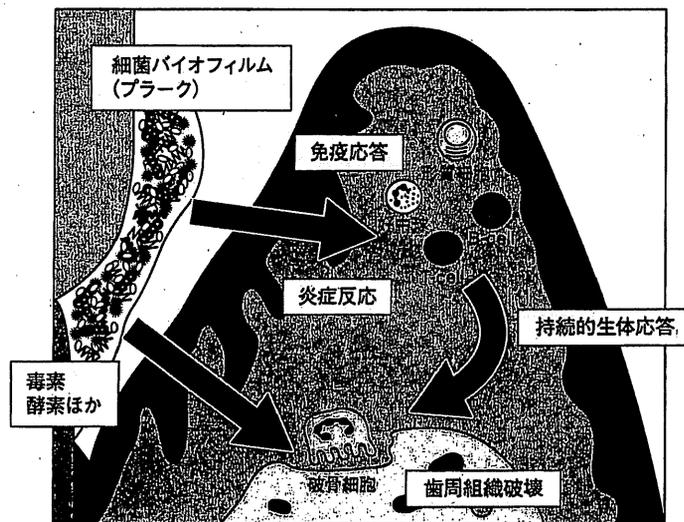


図 2 歯周病の発症・進行と生体応答との関連

歯周ポケット内に存在する歯周病原菌が十分な排除機構を受けないで慢性的に歯周組織を刺激し続けることにより、歯周組織において過剰な免疫応答・炎症反応が惹起され、歯周組織の破壊が生じる。

また、歯周病ではその感染源であるプラークが、厳密には生体外と考えられる特殊な局所環境である歯周ポケットに存在することから、原因菌が免疫系の働きによる排除機構を十分受けないで、慢性的に歯周組織を刺激しつづけることになる。その結果、宿主細胞は、歯周組織において持続的な、また時として過剰な免疫応答・炎症反応を繰り返し広げることにより、本来生体にとって防御的に働くべき生体応答が歯周組織の破壊に関与することになる(図2)。

歯周病の病態決定のメカニズム

歯周病の病態形成のメカニズムを図3に示す。歯周病の病態は、その原因因子である細菌と宿主の免疫・炎症反応のバランスによりコントロールされる。そして、この細菌と宿主との相互作用が歯周組織における結合組織、骨および上皮の代謝に影響を与え、歯周病の発症や進行をもたらすこととなる。さらに、全身疾患や喫煙などの後天的および環境リスク因子と個人がもつ遺伝的リスク因子が歯周組織における代謝と宿主反応を修飾

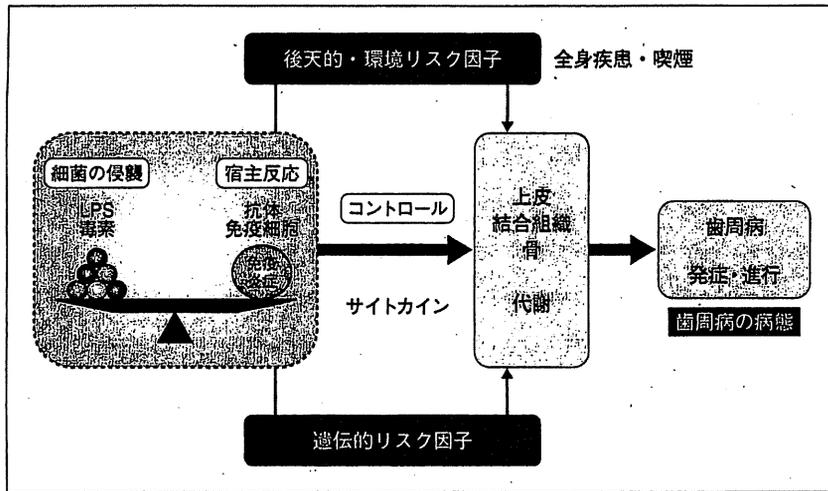


図 3 歯周病の病態決定のメカニズム

し、歯周病の病態が決定される²⁾。

全身疾患の歯周病への影響

歯周病の病態は、歯周病原菌の持続的感染と生体防御とのバランスにより決定される。すなわち、歯周病原菌の侵襲を上まわる生体防御機能を宿主が有する場合には歯周病の発症や進行は生じないが、病原性や細菌数の点で細菌の侵襲が大きくなったり、あるいは生体防御能が低下したりすると、歯周病が発症したりその疾病活動性が増加することとなる。そのため、歯周病原菌に対する生体防御機能や組織の抵抗力を減弱させるような全身疾患を有する患者では、歯周病の発症や進行のリスクが高くなると考えられる³⁾。

歯周病の発症や進行に影響を与える全身疾患は大きく2つに分類できる^{3,4)}。1つは、全身疾患に伴う宿主の免疫・炎症反応の異常が結合組織や骨代謝に影響を及ぼすことにより歯周組織破壊をもたらすもので、糖尿病⁵⁾、白血病、骨粗鬆症、AIDS、後天性好中球減少症などがその代表例として上げられる。そしてもう1つは、歯周病を疾患の一症候としている遺伝性疾患である(表1)。これらの疾患で歯周病が発症するメカニズムに関しては不明な点が多いが、その遺伝性疾患が特徴的に有する免疫・代謝異常が歯周組織に影響を与えていると考えられている。

表 1 歯周炎を随伴する遺伝性疾患⁴⁾

1. 家族性周期性好中球減少症
2. Down 症候群
3. 白血球接着能不全症候群
4. Papillon-Lefevre 症候群
5. Chediak-Higashi 症候群
6. 組織球症候群
7. 小児遺伝性無顆粒球症
8. グリコーゲン代謝疾患
9. Cohen 症候群
10. Ehlers-Danlos 症候群(Ⅲ,Ⅳ型)
11. 低アルカリフォスファターゼ血症
12. その他

全身的な慢性炎症巣や細菌感染源としての歯周病

健康な歯周組織では歯と歯肉の間に1~2mm程度の歯肉溝が存在し、歯肉溝に面する歯肉溝上皮には歯周病原菌の侵襲に対する宿主の防御機構が作動し歯周組織の恒常性を保っている。しかし、歯周病原菌が歯肉溝近傍で増殖し、歯肉に炎症が惹起されポケットが形成されると、歯周組織の細菌に対する防御機構に破綻をきたす。すなわち、歯肉上皮(ポケット上皮)のバリアが壊れた潰瘍面から歯肉結合組織を通じて、細菌そのもの、あるいは細菌の構成成分であるリポ多糖(LPS)などのさまざまな病原因子が生体内に侵入し、血行性に遠隔組織や臓器へ移行し全身に影響を与える。あるいはポケット内で増殖した歯周病原菌が気道を経て肺など深部臓器へ到達し、感染などの生体応

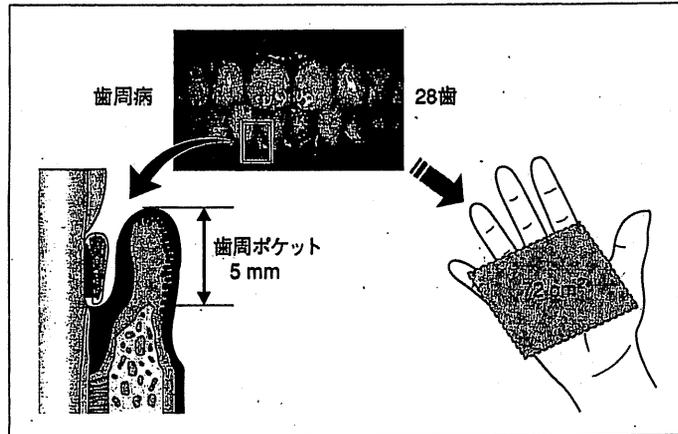


図4 慢性炎症巣や細菌感染源としての歯周病の概念
 28本の歯の全周に5mmの歯周ポケットが形成されたと仮定した場合、ポケットに面するポケット上皮の面積は大人の掌に相当する約72cm²になる。

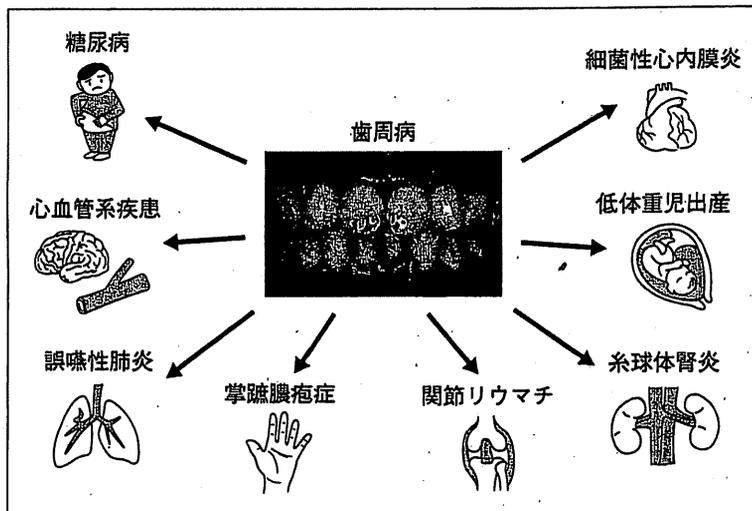


図5 全身疾患のリスク因子としての歯周病

答を惹起すると考えられている。

28本の歯が歯周病に侵され、すべての歯の全周に5mmのポケットが形成されたと仮定した場合、ポケットに面する(プラークに接する)ポケット上皮の面積は約72cm²にも及ぶ。これは大人の掌とほぼ同程度の面積で、ポケット上皮のすべてが潰瘍を形成していないとしても、歯の周囲に限局した疾患である歯周病のイメージから想像されるよりはるかに大きな炎症巣が歯周病患者には恒常的に存在している(図4)。また、ポケット内に形成されるプラーク1mg中には10⁸~10⁹個もの

細菌が存在することから、歯周病の発症に関与するポケット内の細菌は血管や気道を介して有力な全身的な感染源になりうると考えられる。

歯周病の全身への影響

近年、全身疾患が歯周病に影響を及ぼすリスク因子であることが明確になる一方で、歯周病が全身疾患などの誘因となり全身の健康を脅かしていることを示す科学的根拠が集積されつつある⁶⁾。現在までに歯周病が、糖尿病⁷⁾、心血管系疾患、誤嚥性肺炎などの呼吸器疾患、早産・低体重児出産、

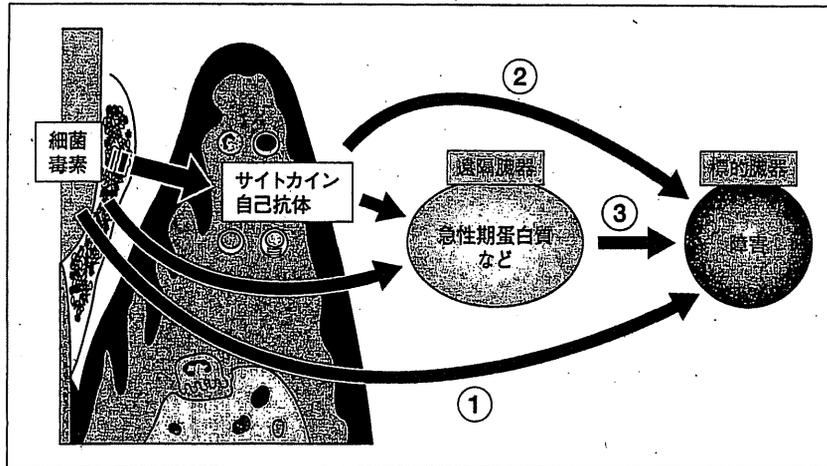


図 6 歯周病が全身に影響を与えるメカニズム (概念図)

細菌性心内膜炎や敗血症などの菌性感染症，糸球体腎炎，関節炎，掌蹠膿疱症などのリスク因子となる可能性が報告されている(図 5)。

歯周病が全身に影響を与えるメカニズムとして，以下の 3 つの経路が想定されている(図 6)。すなわち，①歯周病局所の歯周病原菌や菌体成分が，血行性あるいは経気道的に標的臓器に到達し直接作用する経路，②歯周病局所の免疫・炎症反応により産生されるサイトカインや熱ショック蛋白質に対する自己抗体などが，血行性に標的臓器に到達し作用する経路，③歯周病原菌や歯周病局所で産生されるサイトカインなどが，血行性に肝などの遠隔臓器に到達し急性期蛋白質産生を誘導して，その急性期蛋白質が標的臓器に影響を及ぼす経路，である。これまでに，歯周病原性細菌が血液中に侵入することを示唆するエビデンスは多数存在するが，歯周病がどのようなメカニズムでそれぞれの全身疾患に影響を与えているかについては各論を参考にさせていただきたい。

歯周医学(Periodontal Medicine)

20 世紀はじめに菌性病巣感染(dental focal infection)という概念が提唱され，歯科疾患が全身に影響を及ぼす可能性が示唆されたが，当時の細菌検出法などの技術水準ではその科学的根拠を十分検証することができなかった。その後，1960 年代になってようやく，歯周病の原因がプラークであることが証明され，それ以降現在まで，歯周病

原菌の同定や細菌と宿主との相互作用の解明がなされてきた。1990 年代にはそれらの研究成果を踏まえ，歯周病と全身の健康状態が密接に関連しあっていることを示唆するエビデンスが蓄積されはじめ，歯周病と全身状態あるいは全身疾患との相互関係の解明を目的とした歯周医学(Periodontal Medicine)という新しい学問領域が創出されるに至っている⁸⁾。

今後，この領域のエビデンスがさらに集積されることが期待されるが，このような時代背景を受け，全身の健康状態を考慮しつつ，歯周病の治療を通じて全身の健康に寄与することが求められている。

文献

- 1) Costerton, W.J. et al.: Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science*, 284 (5418): 1318-1322, 1999.
- 2) Page, R. C. and Korman, K. S.: The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol.* 2000, 14: 9-11, 1997.
- 3) Kinane, D. F.: Periodontitis modified by systemic factors. *Ann. Periodontol.*, 4: 54-63, 1999.
- 4) 伊藤公一・他: 歯周病の分類, 歯周病の診断と治療指針(特定非営利活動法人日本歯周病学会編), 医歯薬出版, 2007, pp.2-5.
- 5) 村上伸也・他: 糖尿病になると歯周病になりやすいか? 糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン(特定非営利活動法人日本歯周病学会編), 日本歯科医学会, 2009, pp.12-15.
- 6) 島内英俊: 歯周病と全身疾患の EBM. *Preventive Periodontology*(鴨井久一・他編), 医歯薬出版, 2007, pp.68-77.
- 7) 村上伸也・他: 歯周病の治療をすると糖尿病の状

態は改善するか？ 糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン(特定非営利活動法人日本歯周病学会編). 日本歯科医学会, 2009, pp.30-35.

8) Williams, R. C. and Offenbacher, S.: Periodontal Medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol.* 2000, 23: 9-12, 2000.

* * *

ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイルより見出された 歯根膜特異的分子 PLAP-1 の解析

山田 聡*

(平成 22 年 8 月 3 日受付)

はじめに

歯根膜は、歯周組織の恒常性維持および組織の修復・再生において中心的な役割を果たしている。正常な咬合状態にある歯根膜は、0.15mm から 0.35mm の幅を有し、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¹⁾。さらに、歯根膜は、硬組織形成の制御に関わる分子やサイトカインを自ら分泌して歯周組織の再生をもたらし得ること、また、骨芽細胞やセメント芽細胞といった歯周組織再生に関与する細胞群へと分化しうる間葉系幹細胞のリザーバーとして機能していることも明らかとなってきた^{2,3)}。このような歯根膜を特徴づける分子基盤を解明することは歯根膜の理解を深めるのみならず、歯周病の病理病態の解明、歯周組織再生の分子機構を解明する上で極めて有益な情報を提供するものと期待される。本稿では、我々がこれまでに行ってきたトランスクリプトームアプローチによる歯根膜の分子基盤解析および、その結果見いだされた歯根膜特異的分子 PLAP-1 について報告したい。

歯根膜の遺伝子発現プロファイル解析

松原らの研究グループは 3' 末端 cDNA ライブラリを用いてヒト身体各組織・細胞における特有の遺伝子発現パターンを網羅的に解析することにより、分子生物学的側面からその特徴や特有の機能を明らかにしようとするヒト組織遺伝子発現プロファイル解析を展開してきた⁴⁻⁶⁾。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 polyA から上流 MboI サイトまでの平均 250 塩基対となっており、逆転写やクローニングの効率といった様々な 2 次的影響を受けにくいことが特徴となっている。従って、このライブラリから無作為に抽出したクローンを解析することにより、もともとなった *in vivo* 組織における遺伝子構成の割合を正確に再現した遺伝子発現プロファイルが可能となる。そこで我々は、3' 末端 cDNA ライブラリを用いた歯根膜遺伝子発現プロファイル解析を試みた⁷⁾。便宜抜去された歯の歯根膜から得られた mRNA より歯根膜 3' 末端 cDNA ライブラリを構築した。次に無作為に選択した 1752 個の cDNA クローンの塩基配列を DNA シークエンサーにて解読し、歯根膜組織において発現している遺伝子の 3' 末端配列を決定した。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行い、歯根膜遺伝子発現プロファイルを作成した。

歯根膜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 型及び 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 および COLLAGEN TYPE III 遺伝子の最も高い発現を認め、歯根膜の特徴を遺伝子発現の側面からも裏付けた。次いで高い発現を認める OSTEONECTIN は、骨において豊富に見られる非コラーゲン性の基質タンパクであり、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、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

*大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学)

に局在し、骨芽細胞の前駆細胞を遊走させ、歯槽骨及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^{8,9)}。この *OSTEONECTIN* 及び *PERIOSTIN* 遺伝子の高発現は、ヒト歯根膜の硬組織形成能を裏付けるものと考えられる。ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル解析の結果、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と考えられる。

新規細胞外基質 PLAP-1 の同定と 歯根膜における特異的発現

歯根膜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。全長 cDNA クローニングの結果、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り、*PLAP-1* (*periodontal ligament associated protein-1*) と命名した⁷⁾。予想されるタンパク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、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し、small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) ファミリーの新しいメンバーあることが示された。そこで、硬組織形成を誘導した培養歯根膜細胞において *PLAP-1* の発現を調べたところ、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、各種サイトカインによる *PLAP-1* 発現への影響を検討ところ、骨形成誘導能を持つ BMP-2 および BMP-4 によって、*PLAP-1* の発現が誘導され、FGF-2 添加により *PLAP-1* の発現が抑制された。すなわち *PLAP-1* 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¹⁰⁾。

次に、生体内における *PLAP-1* の発現を解析するために、RT-PCR によりマウスの各臓器における遺伝子発現を検討した。その結果、*PLAP-1* は、歯周組織を含む上顎組織サンプルにおいて高い発現を示した。そこで、歯周組織における詳細な発現を明らかにするため、マウス上顎において *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った¹¹⁾。その結果、*PLAP-1* は、歯周組織のうちでも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。さらに、抗 *PLAP-1* 特異抗体による免疫組織染色を行ったところ、*PLAP-1* タンパクの歯根膜特異的な発現が確認されたことから、*PLAP-1* は歯根膜特異的分子であることが明らかとなった。

PLAP-1 による硬組織形成分化抑制と BMP-2 アンタゴニストとしての機能

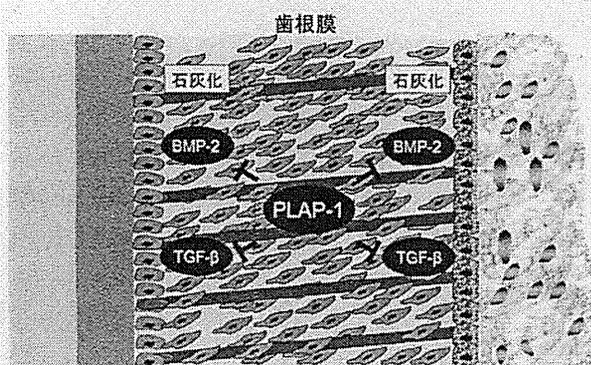
次に、*in vitro* において *PLAP-1* 遺伝子を歯根膜細胞に強発現させ、その細胞分化過程に及ぼす影響を検討することにより、*PLAP-1* 機能の解析を試みた¹¹⁾。*PLAP-1* 強発現歯根膜細胞株を用いて、石灰化誘導培地での長期培養による細胞分化誘導を行ったところ、長期培養に伴う ALPase 活性の上昇が対照株と比較して有意に低いレベルにあることが明らかとなった。さらにアリザリンレッド染色にて比較を行ったところ、*PLAP-1* 強発現歯根膜細胞株ではほとんどアリザリンレッド染色像が認められず、石灰化物形成が抑制されていることが示された。以上のことから *PLAP-1* は、歯根膜細胞の硬組織形成分化を抑制することが明らかとなった。

BMP-2 が *PLAP-1* の遺伝子発現を著明に誘導したことから、*PLAP-1* と BMP-2 との機能的関連性について検討を行った¹¹⁾。*PLAP-1* 強発現歯根膜細胞株を BMP-2 で刺激し、刺激後 24、48、72 時間後における ALPase 活性を測定したところ、対照株では BMP-2 刺激により経時的に ALPase 活性の上昇が認められたが、*PLAP-1* 強発現歯根膜細胞株では、有意に ALPase 活性が抑制されていた。さらに、内在性 *PLAP-1* の発現を *PLAP-1* 特異的 RNAi にて抑制した場合、BMP-2 誘導性の ALPase 活性が有意に向上することが示され、*PLAP-1* は、歯根膜細胞において BMP-2 の作用を抑制的に制御していることが明らかとなった。

PLAP-1 と相同性の高い Decorin や Biglycan は、TGF- β と結合しその作用を制御していることが報告されている¹²⁾。さらに、Biglycan と BMP-4 との相互作用についても報告されていることから¹³⁾、*PLAP-1* は BMP-2 と直接的に結合することによりその作用を制御している可能性が考えられた。そこで、His タグ標識のリコンビナント *PLAP-1* と BMP-2 を試験管内でインキュベシ

オンした後、抗 His タグ抗体による免疫沈降実験を行った¹¹⁾。その結果、BMP-2 は PLAP-1 と複合体を形成し、共沈したことから、PLAP-1 と BMP-2 との直接的なタンパク結合が明らかとなった。さらに、PLAP-1 は BMP-2 が BMP-2 受容体に結合するのを阻害することで細胞内 SMAD シグナルを抑制すること、その際、PLAP-1 の 5 番目のロイシンリッチリピート (LRR5) が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、PLAP-1 は BMP-2 のアンタゴニストとして機能することが示された¹⁴⁾。

歯根膜における PLAP-1 の機能について考察したい (図 1)。歯根膜はセメント質と歯槽骨に挟まれた結合組織であり、それぞれの硬組織に沿ってセメント芽細胞や骨芽細胞など、高い石灰化能を有する細胞が存在している。歯根膜の中央部に位置する線維芽細胞から分泌された PLAP-1 は、BMP-2 等による硬組織形成細胞への分化シグナルを競合的に阻害することで硬組織形成を抑制し、硬組織形成能を有しながらも生理的な条件下では軟組織として機能する歯根膜の恒常性維持を担う分子であると考察できる。現在、我々の研究室では、PLAP-1 トランスジェニックおよびノックアウトマウスを作製している。歯周組織における表現型を解析することにより、PLAP-1 の詳細な *in vivo* 機能の解明が期待される。



PLAP-1 は歯根膜に特異的に発現し、細胞外基質タンパクとして分泌される。歯根膜は、潜在的に硬組織形成能を有する細胞を保有しているが、生理的状态においては PLAP-1 が恒常的に発現し、BMP-2 や TGF- β といったサイトカインの機能を制御することにより細胞分化による硬組織形成が抑制され、一定の幅を保った軟組織として機能すると考えられる。

図 1 PLAP-1 による歯根膜の組織恒常性維持モデル

おわりに

興味深いことに、他の複数の研究グループが、我々と同時期に相次いで PLAP-1 と同一の遺伝子を心臓と膝軟骨からクローニングし、Asporin と名付けている^{15,16)}。最近、遺伝子多型解析の結果、PLAP-1/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が明らかとなっている¹⁷⁾。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を有し、歯根膜との形態的・機能的な類似性が高いことから、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¹⁸⁾。今後は、歯周病の発症機序や病理病態と PLAP-1/Asporin との関連性についても解明していきたいと考えている。

文 献

- 1) Beertsen W., McCulloch CA., Sodek J. (1997): The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000, 13: 20-40
- 2) Seo BM., Miura M., Gronthos S., Bartold PM., Batouli S., Brahimi J., Young M., Robey PG., Wang CY., Shi S. (2004): Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364: 149-155
- 3) Bartold PM., Shi S., Gronthos S. (2006): Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000, 40: 164-172
- 4) Okubo K., Hori N., Matoba R., Niiyama T., Fukushima A., Kojima Y., Matsubara K. (1992): Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet*, 2: 173-179
- 5) Izawa D., Tanaka T., Saito K., Ogihara H., Usui T., Kawamoto S., Matsubara K., Okubo K., Miyasaka M. (1999): Expression profile of active genes in mouse lymph node high endothelial cells. *International immunology*, 11: 1989-1998
- 6) Shimizu-Matsumoto A., Adachi W., Mizuno K., Inazawa J., Nishida K., Kinoshita S., Matsubara K., Okubo K. (1997): An expression profile of genes in human retina and isolation of a complementary DNA for a novel rod photoreceptor protein. *Investigative ophthalmology & visual science*, 38: 2576-2585
- 7) Yamada S., Murakami S., Matoba R., Ozawa Y., Yokokoji T., Nakahira Y., Ikezawa K., Takayama S., Matsubara K., Okada H. (2001): Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a

- novel SLRP family gene. *Gene*, 275: 279-286
- 8) Wilde J., Yokozeki M., Terai K., Kudo A., Moriyama K. (2003): The divergent expression of periostin mRNA in the periodontal ligament during experimental tooth movement. *Cell Tissue Res*, 312: 345-351
 - 9) Horiuchi K., Amizuka N., Takeshita S., Takamatsu H., Katsuura M., Ozawa H., Toyama Y., Bonewald LF., Kudo A. (1999): 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
 - 10) Yamada S., Ozawa Y., Tomoeda M., Matoba R., Matsubara K., Murakami S. (2006): Regulation of PLAP-1 Expression in Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res*, 85: 447-451
 - 11) Yamada S., Tomoeda M., Ozawa Y., Yoneda S., Terashima Y., Ikezawa K., Ikegawa S., Saito M., Toyosawa S., Murakami S. (2007): PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem*, 282: 23070-23080
 - 12) Hildebrand A., Romaris M., Rasmussen LM., Heinegard D., Twardzik DR., Border WA., Ruoslahti E. (1994): Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*, 302: 527-534
 - 13) Chen XD., Fisher LW., Robey PG., Young MF. (2004): The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *Faseb J*, 18: 948-958
 - 14) Tomoeda M., Yamada S., Shirai H., Ozawa Y., Yanagita M., Murakami S. (2008): PLAP-1/asporin inhibits activation of BMP receptor via its leucine-rich repeat motif. *Biochem Biophys Res Commun*, 371: 191-196
 - 15) Lorenzo P., Aspberg A., Onnerfjord P., Bayliss MT., Neame PJ., Heinegard D. (2001): 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
 - 16) Henry SP., Takanosu M., Boyd TC., Mayne PM., Eberspaecher H., Zhou W., de Crombrughe B., Hook M., Mayne R. (2001): Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem*, 276: 12212-12221
 - 17) Kizawa H., Kou I., Iida A., Sudo A., Miyamoto Y., Fukuda A., Mabuchi A., Kotani A., Kawakami A., Yamamoto S., Uchida A., Nakamura K., Notoya K., Nakamura Y., Ikegawa S. (2005): An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet*, 37: 138-144
 - 18) Yamada S., Kitamura M., Murakami S. (2008): PLAP-1: A novel molecule regulating homeostasis of periodontal tissues. *Japanese Dental Science Review*, 44: 137-144

Reduction of *N*-Glycolylneuraminic Acid Xenoantigen on Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells/Mesenchymal Stem Cells Leads to Safer and More Useful Cell Sources for Various Stem Cell Therapies

Hiroshi Komoda, M.D., Ph.D.,^{1,2,*} Hanayuki Okura, M.S.,^{1,3,4,*} Chun Man Lee, M.D., Ph.D.,^{1,5}
Nagako Sougawa, D.M.D., Ph.D.,¹ Tomoaki Iwayama, D.M.D.,⁶ Tomoko Hashikawa, D.M.D., Ph.D.,⁶
Ayami Saga, M.S.,¹ Aya Yamamoto-Kakuta, B.S.,¹ Akihiro Ichinose, M.D., Ph.D.,⁷
Shinya Murakami, D.M.D., Ph.D.,⁶ Yoshiki Sawa, M.D., Ph.D.,^{3,5} and Akifumi Matsuyama, M.D., Ph.D.¹

Adipose tissue is an attractive source for somatic stem cell therapy. Currently, human adipose tissue-derived stromal cells/mesenchymal stem cells (hADSCs/MSCs) are cultured with fetal bovine serum (FBS). Recently, however, not only human embryonic stem cell lines cultured on mouse feeder cells but also bone marrow-derived human MSCs cultured with FBS were reported to express *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) xenoantigen. Human serum contains high titers of natural preformed antibodies against Neu5Gc. We studied the presence of Neu5Gc on hADSCs/MSCs cultured with FBS and human immune response mediated by Neu5Gc. Our data indicated that hADSCs/MSCs cultured with FBS expressed Neu5Gc and that human natural preformed antibodies could bind to hADSCs/MSCs. However, hADSCs/MSCs express complement regulatory proteins such as CD46, CD55, and CD59 and are largely resistant to complement-mediated cytotoxicity. hADSCs/MSCs cultured with FBS could be injured by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity mechanism. Further, human monocyte-derived macrophages could phagocytose hADSCs/MSCs cultured with FBS and this phagocytic activity was increased in the presence of human serum. Culturing hADSCs/MSCs with heat-inactivated human serum for a week could markedly reduce Neu5Gc on hADSCs/MSCs and prevent immune responses mediated by Neu5Gc, such as binding of human natural preformed antibodies, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, and phagocytosis. Adipogenic and osteogenic differentiation potentials of hADSCs/MSCs cultured with heat-inactivated human serum were not less than that of those cultured with FBS. For stem cell therapies based on hADSCs/MSCs, hADSCs/MSCs that presented Neu5Gc on their cell surfaces after exposure to FBS should be cleaned up to be rescued from xenogeneic rejection.

Introduction

ADIPPOSE TISSUE is an attractive source for somatic cell therapy, because it is safe and abundant and many investigators have reported that the stromal cells derived from adipose tissue (adipose tissue-derived stromal cells [ADSCs]) could differentiate into various cell types.¹⁻⁴ ADSCs are also referred to as adipose tissue-derived mesenchymal

stem cells (MSCs). Human ADSCs (hADSCs)/MSCs are very similar to bone marrow (BM)-derived human MSCs (hMSCs) and therefore reveal differentiation potential similar to BM-derived hMSCs.⁵⁻⁷

For stem cell therapies based on hMSCs including hADSCs/MSCs, it is essential that stem cells are handled and cultured in a manner that guarantees the efficacy and safety of the cellular therapy product. One such aspect is the choice

¹Department of Somatic Stem Cell Therapy, Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe, Hyogo, Japan.

²Department of Internal Medicine, National Hospital Organization Chiba Medical Center, Chiba, Japan.

³Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan.

⁴Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan.

⁵Medical Center for Translational Research, Osaka University Hospital, Suita, Osaka, Japan.

⁶Department of Periodontology, Division of Oral Biology and Disease Control, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan.

⁷Department of Plastic Surgery, Kobe University Hospital, Kobe, Hyogo, Japan.

*These authors contributed equally to this work.

of cell culture medium and supplements. In principle, most investigators agree that all animal materials should be avoided to maximize product safety. Currently, however, hADSCs/MSCs are cultured with fetal bovine serum (FBS), and the clinical efficacy of BM-derived hMSCs in human disease has been investigated using hMSCs cultured with FBS in a number of clinical trials.^{8–12}

Recently, not only human embryonic stem cell (hESC) lines cultured on mouse feeder cells but also BM-derived hMSCs cultured with FBS were reported to express *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) xenoantigen,^{13,14} the so-called Hanganutziu–Deicher antigen.¹⁵ Humans are incapable of synthesizing the common mammalian sialic acid, Neu5Gc, because of an *Alu* transposon-mediated inactivation of the cytidine monophosphate (CMP)-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase gene.^{16,17} Despite this, both hESC lines and BM-derived hMSCs were reported to express the Neu5Gc, apparently originating from the mouse feeder layers, animal-derived components, and FBS.^{13,14} The significant levels of Neu5Gc found on the surface of hESCs and hMSCs evidently originate from a Trojan Horse pathway involving endocytosis of extracellular glycoconjugates, delivery to the lysosome, release of Neu5Gc by lysosomal sialidase, active transport to the cytoplasm through the lysosomal sialic acid transporter, activation by CMP, and addition to nascent glycoproteins and glycolipids in the secretory pathway.¹⁸ It is also possible that amphipathic molecules carrying Neu5Gc might be directly transferred into the hESC and hMSC plasma membranes.¹⁹ Human serum contains high titers of natural preformed antibodies against Neu5Gc xenoantigen.^{20–22} Thus, binding of these natural preformed antibodies may lead to immune responses such as complement-mediated cytotoxicity (CMC), antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and antibody-dependent cellular phagocytosis. However, these immune responses mediated by natural preformed antibodies against human stem cells remain in controversy.^{13,23} This study was therefore undertaken to study the presence of Neu5Gc on hADSCs/ MSCs cultured with FBS and the human immune responses mediated by Neu5Gc on hADSCs/ MSCs.

Materials and Methods

Cells

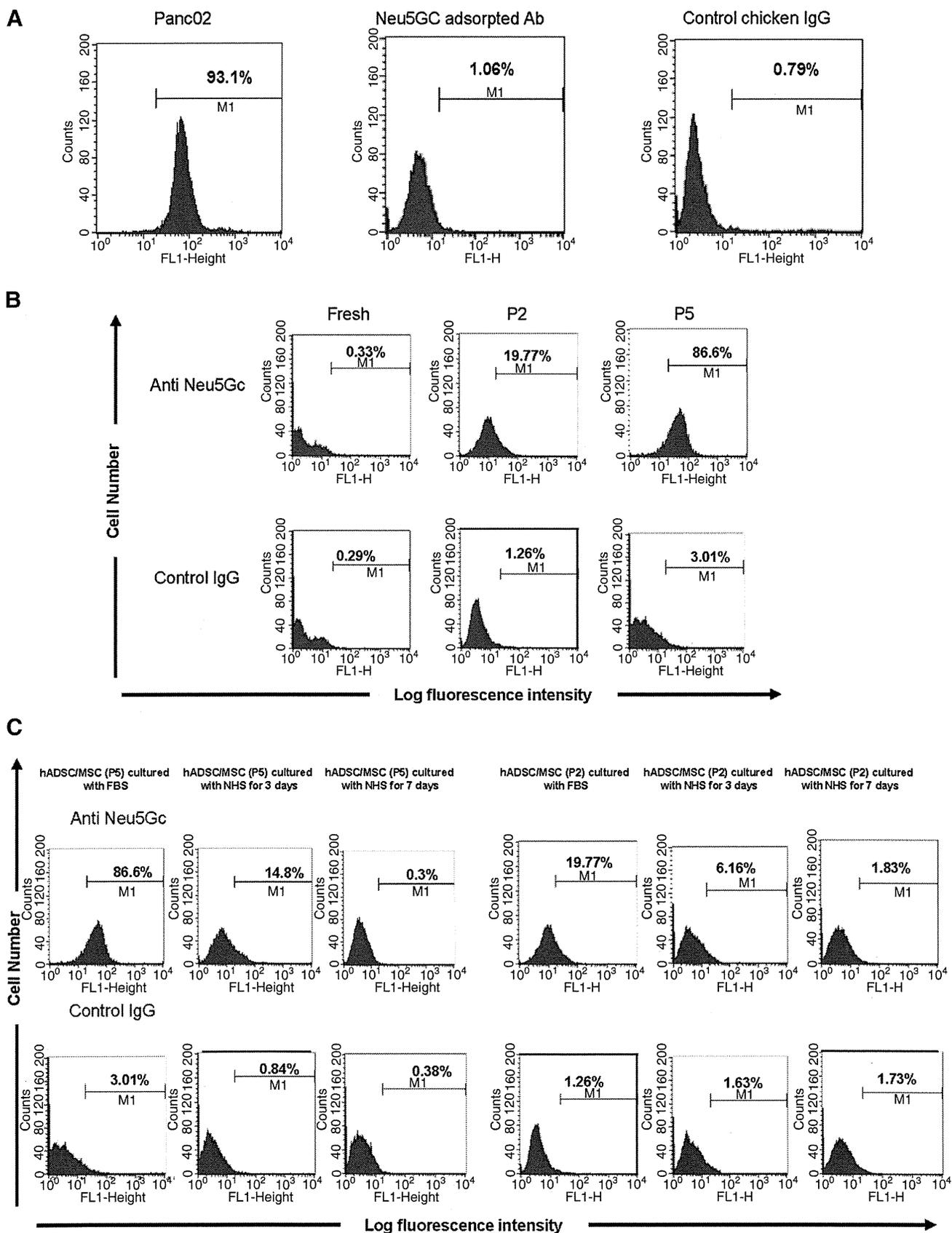
hADSCs/ MSCs were prepared as described previously^{1,2} with modifications.^{3,4} Adipose tissue was resected during plastic surgery in five human subjects (four men and one woman; age, 20–60 years) as excess discards. Ten to 50 g of

subcutaneous adipose tissue was collected from each subject. All subjects provided informed consent. The protocol was approved by the Review Board for Human Research of the Kobe University Graduate School of Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine and Foundation for Biomedical Research and Innovation. All subjects fasted for at least 10 h before surgery and none was being treated with steroids. The resected excess adipose tissue was minced and then digested in Hank's balanced salt solution (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY) containing 0.075% collagenase type II (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) at 37°C for 1 h. Digests were filtered with a cell strainer (BD Bioscience, San Jose, CA) and centrifuged at 800 g for 10 min. Erythrocytes were excluded using density gradient centrifugation with Lymphoprep ($d = 1.077$; Nycomed, Oslo, Norway). The cells were then plated using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco Invitrogen) with 10% defined FBS (Hyclone, Northumberland, United Kingdom) and incubated for 24 h at 37°C. Following incubation, the adherent cells were washed extensively and treated with 0.2 g/L ethylenediaminetetraacetate (EDTA) solution (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), and the resulting suspended cells were replated at a density of 10,000 cells/cm² on human fibronectin-coated dishes (BD BioCoat, Franklin Lakes, NJ) in a medium containing 60% DMEM-low glucose, 40% MCDB-201 medium (Sigma Aldrich), 1×insulin–transferrin–selenium (Gibco Invitrogen), 1 nM dexamethasone (Sigma Aldrich), 100 μM ascorbic acid 2-phosphate (Sigma Aldrich), 10 ng/mL epidermal growth factor (PeproTec, Rocky Hill, NJ), and 5% FBS. For analysis of the effects of human serum on Neu5Gc expression on hADSCs/ MSCs, the cells were cultured for 7 days, where FBS was replaced by 5% heat-inactivated normal human pooled serum (NHS) from type AB blood. As control cells, a murine pancreatic cell line, Panc02, was cultured with RPMI 1640 medium (Gibco Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic/antimycotic solution.

Flow cytometry

Cells were detached from culture dishes and suspended in Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS; Nacalai Tesque). Aliquots (5×10^5 cells) were incubated for 30 min at 4°C with a chicken anti-Neu5Gc polyclonal antibody (a gift from Prof. N. Wakamiya, Asahikawa Medical College, Hokkaido, Japan).²⁴ Cells incubated with D-PBS alone were used as negative control. After washing with D-PBS, cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-chicken immunoglobulin G (IgG; Cappel, Cochranville, PA) as a second antibody. After staining, the cells were washed

FIG. 1. Expression of Neu5Gc on hADSCs/ MSCs. (A) Specificity of anti-Neu5Gc antibody. Panc02, a cell line derived from murine pancreatic carcinomas, expressed Neu5Gc. Flow cytometric analysis showed that chicken anti-Neu5Gc polyclonal antibody bound to the surfaces of Panc02, but Neu5Gc-pretreated anti-Neu5Gc polyclonal antibody could not react, showing specificity of the anti-Neu5Gc antibody. The percentage of cells that stained positive is indicated in the upper right corner of each panel. (B) Expression of Neu5Gc xenoantigen on hADSCs/ MSCs. Fresh hADSCs/ MSCs did not express Neu5Gc on their cell surface. In accordance with passage numbers, the population of Neu5Gc-positive cells increased by cultivation with FBS. The percentage of cells that stained positive is indicated in the upper right corner of each panel. (C) Reduction of Neu5Gc xenoantigen by chasing cultivation with human serum. After cultivation of hADSCs/ MSCs with heat-inactivated NHS but not FBS, the percentages of Neu5Gc-positive cells have decreased in accordance with culture duration. The decrement manners of second passaged hADSCs/ MSCs and fifth passaged ones have been in a similar fashion. The percentage of cells that stained positive is indicated in the upper right corner of each panel. Data are representative of four independent experiments. Neu5Gc, *N*-glycolylneuraminic acid; hADSCs/ MSCs, human adipose tissue-stromal cells/mesenchymal stem cells; FBS, fetal bovine serum; NHS, normal human pooled serum; IgG, immunoglobulin G; M1, marked positive area 1; FL1, fluorescence1.



and resuspended in D-PBS with 150 ng/mL 7-AAD (BD Pharmingen) to eliminate dead cells. The cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest Pro software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Data shown in figures are gated for live cells by excluding cells that stained positive for 7-AAD. Percentage of positive cells was defined against a 99% negative control exclusion gate. For detection of binding of human natural preformed antibodies, the cells were exposed to 10% fresh NHS or 5 mM Neu5Gc-preadsorbed NHS in D-PBS containing 15 mM EDTA for 30 min at 4°C. After washing, the cells were stained with FITC-conjugated goat anti-human IgG or IgM antibody (Cappel), or control goat IgG, respectively. To examine the blocking effects of anti-Neu5Gc antibody onto the surface of hADSCs/MSCs, hADSCs/MSCs cultured with FBS were precoated with anti-Neu5Gc antibody, exposed to 10% fresh NHS containing 15 mM EDTA, and then applied for flow cytometric analysis. Stained cells were washed and resuspended in D-PBS with 7-AAD and analyzed by a FACSCalibur flow cytometer. For detection of human complement regulatory proteins, cells were stained with FITC-conjugated mouse monoclonal antibodies to human CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay accelerating factor), CD59, or control IgG (all from BD Pharmingen) and analyzed by a FACSCalibur flow cytometer as well.

Detection of complement deposition

The amounts of C4 and C3 fragments deposited on the cell surface were also analyzed by flow cytometry. The cells were detached by 0.25% trypsin/EDTA and subsequently incubated with 10% fresh NHS in DMEM for 30 min at 37°C. Cells incubated with DMEM alone or 10% fresh NHS in DMEM containing 15 mM EDTA was used as negative control. After washing with cold D-PBS three times, the cells were stained with FITC-conjugated rabbit anti-human C4c or C3c antibody (Dako, Cambridgeshire, United Kingdom). After staining, the cells were washed and resuspended in 500 μ L of D-PBS with 7-AAD and analyzed by a FACSCalibur flow cytometer.

CMC assay

CMC was evaluated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release in media, using MTX-LDH kit (Kyokuto

Pharm, Tokyo, Japan) in accordance with the manufacturer's instructions. Target cells (hADSCs/MSCs cultured with FBS, hADSCs/MSCs cultured with heat-inactivated NHS, or Panc02) were plated at a concentration of 1×10^4 cells/well in a 96-well culture plate. Then, DMEM with 20% or 40% fresh NHS was added. The plates were incubated for 2 h at 37°C, and LDH release was determined. All assays included maximal release controls (1% Triton X), controls with medium and target cells, with medium containing fresh NHS, and with medium alone.

Isolation of effector cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the buffy coats from healthy volunteers using density gradient centrifugation with Lymphoprep (Nycomed). Cell viability was more than 98%, as determined by trypan blue exclusion. Human monocyte-derived macrophages were isolated and cultured as reported previously.²⁵

ADCC assay

ADCC was also determined by measuring LDH release into medium. Target cells (hADSCs/MSCs cultured with FBS, hADSCs/MSCs cultured with heat-inactivated NHS, or Panc02) were plated in 96-well culture plates as described earlier. Then, 1×10^5 or 2×10^5 PBMCs in DMEM alone or with 10% heat-inactivated NHS were added. The plates were incubated for 4 h at 37°C, and LDH release was determined. All assays included maximal release controls (1% Triton X), controls with medium and target cells, with medium and effector cells, with medium containing 10% heat-inactivated NHS, and with medium alone.

Phagocytosis assay

Target cells (hADSCs/MSCs cultured with FBS, hADSCs/MSCs cultured with heat-inactivated NHS, or Panc02) were stained with PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. After labeling of target cells was terminated, the cells were washed and resuspended in RPMI medium. Then, 2×10^6 PKH67-labeled target cells were added into 24-well

FIG. 2. Binding of natural preformed antibodies to hADSCs/MSCs. (A) Binding of natural preformed antibodies to Panc02 and hADSCs/MSCs. (a) Murine pancreatic carcinoma cell line Panc02 was exposed to 10% fresh NHS containing 15 mM EDTA, then stained with secondary FITC-conjugated goat anti-human IgG or IgM antibody, and studied by flow cytometry to demonstrate the binding of IgG and IgM. The natural performed antibodies human IgG and IgM bound onto Panc02. Exposition of Neu5Gc-preadsorbed NHS could reduce the natural performed antibody binding (IgG binding: 99.95% to 85.09%; IgM binding: 92.8% to 44.49%). (b) hADSCs/MSCs were cultured with FBS, exposed to 10% fresh NHS containing 15 mM EDTA, and then stained with secondary FITC-conjugated goat anti-human IgG or IgM antibody, or control goat IgG. The natural performed antibodies human IgG and IgM bound onto hADSCs/MSCs, and exposition of Neu5Gc-preadsorbed NHS could reduce IgG binding (80.01% to 2.08%). The percentage of cells that stained positive is indicated in the upper right corner of each panel. Data are representative of four independent experiments. (B) Anti-Neu5Gc antibody pretreatment suppressed the binding of natural preformed antibodies onto hADSCs/MSCs. hADSCs/MSCs cultured with FBS were precoated with anti-Neu5Gc antibody and then exposed to 10% fresh NHS containing 15 mM EDTA. The natural performed antibody human IgG bound onto hADSCs/MSCs, and exposition of anti-Neu5Gc antibody could reduce IgG binding (70.33% to 1.74%). The percentage of cells that stained positive is indicated in the upper right corner of each panel. Data are representative of three independent experiments. (C) Decrement of binding of natural preformed antibodies onto hADSCs/MSCs by chase with NHS. After cultivation of hADSCs/MSCs with heat-inactivated NHS but not FBS, the percentages of human IgG-positive cells decreased. The percentage of cells that stained positive is indicated in the upper right corner of each panel. Data are representative of four independent experiments. hADMSCs, adipose-tissue derived mesenchymal stem cells; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; FITC, fluorescein isothiocyanate.

