



Title	歯根膜特異的分子PLAP-1によるFGF-2機能の制御 : PLAP-1ノックアウトマウスを用いた解析
Author(s)	栗田, 敏仁
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34377
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (栗田 敏仁)	
論文題名	歯根膜特異的分子PLAP-1によるFGF-2機能の制御 —PLAP-1ノックアウトマウスを用いた解析—
<p>【研究目的】</p> <p>歯根膜は、歯と歯槽骨という二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組織であり、その形態的、機能的な特徴を維持するために、細胞外基質が重要な役割を果たしている。当研究室にてヒト歯根膜cDNAライブラリーより同定されたPLAP-1は、歯根膜に高頻度かつ特異的な発現を示す細胞外基質である。我々はこれまでに歯根膜細胞を用いた解析から、PLAP-1がBMP-2およびTGF-βのアンタゴニストとして機能し、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を抑制することを明らかにしている。このことから、PLAP-1は様々なサイトカインの機能を制御することで、歯根膜の恒常性維持に関与していると考えられる。しかしながら、歯周組織の恒常性維持や創傷治癒過程で重要な働きをもつと考えられるFGF-2とPLAP-1との相互作用に関して、また<i>in vivo</i>でのPLAP-1の生理的機能についての詳細は、未だ十分に検討されてはいない。そこで本研究では、PLAP-1遺伝子を欠失したPLAP-1ノックアウト (PLAP-1^{-/-}) マウスを作製し、その表現型の解析を行うとともに、PLAP-1^{-/-}マウス胚から分離した初代培養マウス胎仔線維芽細胞 (MEFs) を用いて、PLAP-1によるFGF-2の機能制御に関する解析を行った。</p> <p>【材料と方法】</p> <p>1) PLAP-1^{-/-}マウスの作製と表現型の解析</p> <p>PLAP-1遺伝子の第2、3エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換したPLAP-1遺伝子組み換えベクターを構築し、C57BL/6由来のES細胞へトランスフェクションし、遺伝子相同組替えを行った。薬剤選択によりES細胞クローンを単離し、ゲノムPCRおよびサザンブロット法にて相同組替えクローンを同定した。同クローンをマウス胚盤胞へマイクロインジェクションすることでES細胞キメラマウスを作製し、同キメラからgerm line transmissionを経てF1マウスを得た。そして、F1マウス同士を交配させることで、PLAP-1^{-/-}マウスを樹立した。まず、PLAP-1^{-/-}マウスの歯胚の組織学的解析のため、胎生15.5日および17.5日におけるPLAP-1^{-/-}マウス胎仔の頭部を採取し、4 %パラホルムアルデヒドに浸漬固定し、凍結切片法にて厚さ8 μmで薄切標本を作製した。また、8週齢のPLAP-1^{-/-}マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔下にて屠殺後、上顎組織を摘出し、ホルムアルデヒド系固定液に浸漬固定し、脱灰処理後、組織をパラフィン包埋し厚さ4 μmで薄切標本を作製した。作製した薄切標本をヘマトキシリン・エオシン染色し、歯胚および歯・歯周組織の形態学的評価を行った。さらに8~9週齢のPLAP-1^{-/-}マウスより採取した下顎骨のmicro Computed Tomography (μCT) により得られた画像から3次元解析ソフトウェアを用いて下顎第一臼歯の歯根膜を抽出し、その体積を定量した。</p> <p>2) PLAP-1^{-/-}MEFsを用いた解析</p> <p>PLAP-1^{-/-}MEFsは胎生13.5日のPLAP-1^{-/-}マウス胚からTrypsin-EDTA処理により分離し、10 % FCS含有D-MEM培地にて培養を行い、継代数3-5を実験に用いた。まずPLAP-1^{-/-}MEFsから全RNAを抽出し、Real-Time PCRにより種々の細胞外基質および骨芽細胞分化関連転写因子の遺伝子発現を野生型(WT)MEFsと比較することにより検討した。次にPLAP-1^{-/-}MEFsを濃度0~10 ng/mlのBMP-2で刺激し、1時間後に全RNAを抽出して、BMP-2誘導性Id-1遺伝子の発現を検討した。またPLAP-1^{-/-}MEFsを10 %FCS、10 mM β-グリセロリン酸、50 μg/ml アスコルビン酸、100 ng/ml BMP-2含有D-MEM培地にて長期に培養することで、骨芽細胞へ分化誘導した。3日ごとにアリザリン染色および全RNAの回収を行い、石灰化物形成および骨芽細胞分化関連遺伝子の発現を検討した。次に、PLAP-1^{-/-}MEFsを濃度0~100 ng/mlのFGF-2で刺激し、24時間後のBrdUの取り込み量を化学発光法を用いて</p>	

検出し、FGF-2誘導性の細胞増殖反応を検討した。つづいて、*PLAP-1*^{-/-}MEFsを濃度0～20 ng/mlのFGF-2で刺激し、1時間後のFGF-2誘導性*Sprouty2*、*Hyaluronan synthase 2 (Has2)* 遺伝子の発現を検討した。また、*PLAP-1*^{-/-}MEFsを10 ng/mlのFGF-2にて刺激し、5分～120分後に誘導されるErk1/2のリン酸化をウェスタンブロッティングにより検討した。さらに、FLAG標識PLAP-1発現アデノウイルスを感染させることでPLAP-1を発現させた*PLAP-1*^{-/-}MEFsをFGF-2で刺激し、24時間後の細胞増殖反応および5分～120分後に誘導されるErk1/2のリン酸化解析を行った。

3) マウス歯根膜細胞株を用いた解析

当研究室にて樹立したマウス歯根膜細胞株MPDL22にマウス*PLAP-1*特異的siRNAを導入し、内在性*PLAP-1*遺伝子の発現を抑制したMPDL22株を作製した。同細胞株を濃度0～100 ng/mlのFGF-2で刺激し、24時間後の細胞増殖反応を検討した。また同細胞株を濃度0～10 ng/mlのFGF-2で刺激し、1時間後のFGF-2誘導性*Has1*遺伝子の発現を検討した。

4) PLAP-1とFGF-2関連分子の免疫共沈解析

PLAP-1とFGF-2との結合解析は、histidine標識リコンビナントPLAP-1タンパクとリコンビナントFGF-2タンパクとを混和し、抗histidine抗体結合beadsで免疫沈降を行い、FGF-2の共沈の有無を抗FGF-2抗体を用いたウェスタンブロッティングにて検討した。さらにFGF-2のFGF受容体1 (FGFR1) への結合にPLAP-1が与える影響については、まずhistidine標識リコンビナントPLAP-1タンパクとリコンビナントFGF-2タンパクを混和し、さらにリコンビナントFGFR1 α /Fc chimeraを混和した。同混合溶液にProtein A/G beadsを加えてFGFR1を免疫沈降し、FGF-2およびPLAP-1の共沈の有無をそれぞれの特異抗体を用いたウェスタンブロッティングにて検討した。

【結果】

1) *PLAP-1*^{-/-}マウスの樹立に成功した。*PLAP-1*^{-/-}マウスは繁殖可能かつ系統維持が可能で正常に生まれ、生後8週齢まで、全身的には著しい表現型は認められなかった。*PLAP-1*^{-/-}マウスの歯胚は形態学的異常を認めず、一方、8週齢の*PLAP-1*^{-/-}マウスの歯根膜においては、歯根膜腔の拡大傾向および歯根膜細胞の配列がやや疎な傾向が認められた。

2) *PLAP-1*^{-/-}MEFsはWT MEFsと比較して*Biglycan*、*Decorin*、*Collagen type I, alpha 1*、*Collagen type II, alpha 1*、*Aggrecan*などの細胞外基質の遺伝子発現の上昇、および骨芽細胞分化関連遺伝子*Osterix*の発現上昇を認めた。そこで*PLAP-1*^{-/-}MEFsをBMP-2で刺激すると、WT MEFsと比較してより高い*Id-1*遺伝子の発現を認め、加えて*PLAP-1*^{-/-}MEFsにおけるBMP-2誘導性の骨芽細胞への分化亢進を認めた。一方、*PLAP-1*^{-/-}MEFsをFGF-2で刺激した際の細胞増殖、FGF-2誘導性遺伝子の発現およびErk1/2のリン酸化は、WT MEFsと比較して低下していることが明らかとなった。さらに*PLAP-1*^{-/-}MEFsにPLAP-1を発現させることで、FGF-2が誘導する細胞増殖反応およびErk1/2のリン酸化の亢進が認められた。

3) MPDL22において内在性*PLAP-1*遺伝子発現抑制により、FGF-2が誘導する細胞増殖反応およびFGF-2誘導性遺伝子の発現低下が認められた。

4) PLAP-1とFGF-2関連分子の免疫共沈解析により、PLAP-1はFGF-2と直接結合することで、FGF-2のFGFR1に対する結合能が増強されることが示唆された。

【結論と考察】

本研究結果より、8週齢の*PLAP-1*^{-/-}マウスにおいては、歯根膜腔の拡大傾向および歯根膜細胞の配列がやや疎な傾向が認められた。また、*PLAP-1*^{-/-}MEFsにおいてはBMP-2に対する反応性の亢進およびFGF-2に対する反応性の低下が認められ、PLAP-1がBMP-2の機能を抑制的に、一方、FGF-2の機能を促進的に制御することが示された。歯根膜において、PLAP-1は恒常的に発現しており、BMP-2やTGF- β の機能を抑制的に、一方、FGF-2の機能を促進的に制御することで、歯根膜の恒常性維持に関与していることが示唆される。さらに、歯周組織再生時のようにFGF-2が強く機能する局面では、PLAP-1はFGF-2のFGFR1への結合能を増強することで、歯根膜細胞の増殖ならびに遊走を促し、歯周組織の再生に促進的に働くのではないかと考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (栗 田 敏 仁)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	大阪大学 教授	村上 伸也
	副 査	大阪大学 教授	西村 理行
	副 査	大阪大学 准教授	河合 伸治
	副 査	大阪大学 講師	佐伯 万騎男
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、<i>in vivo</i> における PLAP-1 の機能を解析するため、PLAP-1 ノックアウト (<i>PLAP-1</i>^{-/-}) マウスを作製してその表現型の解析を行い、さらに <i>PLAP-1</i>^{-/-} マウス由来のマウス胎仔線維芽細胞 (MEFs) を用いて、<i>in vitro</i> で PLAP-1 による FGF-2 の機能制御のメカニズムを解析したものである。</p> <p>本研究結果より、8 週齢の <i>PLAP-1</i>^{-/-} マウスにおいては、歯根膜腔の拡大傾向および歯根膜細胞の配列がやや疎な傾向が認められた。また、<i>PLAP-1</i>^{-/-} MEFs においては BMP-2 に対する反応性の亢進および FGF-2 に対する反応性の低下が認められ、PLAP-1 が BMP-2 の機能を抑制的に、一方、FGF-2 の機能を促進的に制御することが示唆された。</p> <p>以上の研究成果は、歯周組織再生の分子基盤の解明、さらには歯周病の新規治療法の開発の一助になるものである。よって、博士 (歯学) の学位を授与するのに値するものと認める。</p>			