

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学位論文

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—

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻（歯周病分子病態学）

栗田 敏仁

（指導教官：村上 伸也教授）

本論文の要旨は、第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会（2012 年 11 月 22 日、広島）、
第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会（2013 年 10 月 18 日、秋田）において発表した。

緒言

歯根膜は、歯と歯槽骨という二つの硬組織の間に存在し、コラーゲンをはじめとする細胞外基質に富んだ非石灰化の結合組織である。そして、その形態的、機能的な特徴を維持するために、同部の細胞外基質が重要な役割を果たしている。細胞外基質は組織の構造を形づくり、その強度を担うのみならず、様々なサイトカインや増殖因子を捕らえ必要に応じて放出することで、細胞の増殖や分化を制御し、多様な生命現象に深く関わっていることが近年、注目されている^{1,2)}。歯根膜においては、これまでに I 型および III 型コラーゲンを主成分とするコラーゲン性タンパク、フィブロネクチン、ラミニン等の非コラーゲン性タンパク、さらにプロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの細胞外基質が、歯根膜細胞と相互作用することでその細胞接着・増殖・分化や恒常性維持に関与していることが報告されてきた³⁻⁵⁾。

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細胞外基質であるPLAP-1は、歯根膜に高頻度かつ特異的な発現を示す分子量約40 kDaのプロテオグリカン様分子である⁶⁾。PLAP-1はN末端領域に4つ、C末端領域に2つのシステイン残基を含むコンセンサスマチーフを有し、中央部には10個のleucine-rich repeat (LRR) ドメインを持つことから、small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family class I に属している。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⁷⁻⁹⁾。このことから、PLAP-1は歯根膜に恒常的に発現することで様々なサイトカインの機能を制御し、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、BMP-2、TGF- β 以外のサイトカインに対するPLAP-1の機能制御について、また*in vivo*における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。

一方、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) は胎生期から成体を通じて様々な組織で幅広い発現を示し、強力な間葉系細胞の増殖誘導作用および血管新生作用を持つほか、組織の創傷治癒、骨・軟骨の形成や、中枢神経系の発生・恒常性維持に関与するなど多彩な作用を有している¹⁰⁻¹⁴⁾。歯周組織においても、歯根膜、歯肉結合組織、および歯肉上皮細胞間隙など広範囲に内在性FGF-2の発現が確認される。また、歯周組織の創傷治癒過程において内在性FGF-2の発現が誘導されることから、FGF-2が歯周組織の恒常性維持ならびに創傷治癒で重要な役割を担っていると考えられる。さらに、当研究室においては、FGF-2を歯周外科治療時に歯槽骨欠損部へ局所投与することにより、歯周組織の再生が誘導されることを明らかにしている¹⁵⁻¹⁹⁾。

以上のことから、歯根膜において、BMP-2およびTGF- β の機能を制御していると考えられるPLAP-1が、FGF-2の機能制御にも関与している可能性が考えられる。PLAP-1とFGF-2との相互作用について解析することは、歯周組織の恒常性維持ならびに創傷治癒・組織再生についての理解を深め、次世代の歯周治療を開発する上でも重要な知見を得られるものと考えられる。

そこで本研究では、まず、*in vivo*におけるPLAP-1の生理的機能について明らかとするために、*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、歯胚の組織学的解析、8週齢の*PLAP-1*^{-/-}マウスの歯および歯周組織における表現型の解析を行った。さらに、PLAP-1によるBMP-2およびFGF-2の機能制御に関する解析を行うため、野生型 (WT) マウスの胎生期において全身の硬組織とその周囲に*PLAP-1*の発現を認めること²⁰、歯根膜細胞と比較してマウス胎仔線維芽細胞 (以下MEFsと略す) の樹立が容易であること、またMEFsは骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞等への分化能を有し²¹⁻²⁴、様々な遺伝子改変マウスの細胞学的特性の解析に用いられていることなどから²⁵⁻²⁷、WTおよび*PLAP-1*^{-/-}マウス由来のMEFsを用いて、BMP-2およびFGF-2に対する反応性を検討した。その結果、*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唆された。また、マウス歯根膜細胞株を用いて、歯根膜細胞におけるPLAP-1によるFGF-2の機能制御に関する解析を行った結果、歯根膜細胞においても、PLAP-1によりFGF-2の機能が促進的に制御されていることが示された。さらに、PLAP-1とFGF-2関連分子との分子間相互作用についても検討した。その結果、PLAP-1はFGF-2と直接結合し、FGF-2のFGF受容体1 (以下FGFR1と略す) に対する結合能が増強されることが明らかとなった。

材料および方法

1. *PLAP-1*⁺ マウスの作製

本研究におけるすべての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号：動歯 22-001-0）。マウス *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（*PLAP-1-neo vector*）を構築し、C57BL/6 由来の胚性幹細胞（ES 細胞）へエレクトロポレーションにてトランスフェクションし、遺伝子導入を行った。ネオマイシン薬剤選択により、*PLAP-1-neo vector* 遺伝子陽性の ES 細胞を単離した。樹立した ES 細胞株のゲノム DNA を精製し、第 2、3 エクソン部位に対するゲノム PCR およびサザンブロット法にて遺伝子の相同組み換えがなされた ES 細胞株を同定した。同クローンを BALB/c マウス胚盤胞へマイクロインジェクション後に偽妊娠 ICR マウスの子宮に移植し、産生仔の毛色により、キメラマウスを選別した。キメラ率 80 % のキメラオスマウスをメスの C57BL/6 と交配し、germ line transmission を経た *PLAP-1* ヘテロ (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。マウスジェノタイピングは、後肢より採取した足指を proteinase K (AMRESCO、Solon、OH、USA) にて処理し、抽出したゲノム DNA を鋳型として、表 1 に示す *PLAP-1* 対立遺伝子とネオマイシン耐性カセットを含む変異型 *PLAP-1* 対立遺伝子とを識別するプライマーを用いたゲノム PCR にて行った。PCR 反応は 95 °C・10 分間の熱処理後、94 °C・30 秒間の熱変性、60 °C・1 分間のアニーリング、72 °C・1 分間の伸長反応を 1 サイクルとし、Peltier Thermal Cycler PTC-200 (Amersham Pharmacia Biotech、Milwaukee、WI、USA) を用いて 33 サイクルにて PCR 反応を行った。PCR 産物は、1.5 % アガロースゲル（ニッポンジーン、東京、日本）にて電気泳動後、エチジウムブロマイド（ニッポンジーン）により DNA を蛍光染色した。また、*PLAP-1*⁺ マウスの表現型については、同腹仔である WT および *PLAP-1*⁺ マウスを用いて解析を行った。

表1 本研究で使用した Genotyping PCR 用プライマー

	プライマー	Tm値
プライマー-1 F	5'-CTCAATGTCTACTGAATGTCAG-3'	53.9
プライマー-2 R	5'-CTAGATCAGAGCAGTGAACAACTC-3'	57.9
プライマー-3 R	5'-GCGAATTCGGTACCAATAAAAGAGC -3'	57.9

2. マウス各組織における *PLAP-1* 遺伝子発現解析

8 週齢オス WT および *PLAP-1*⁺ マウスより採取した各組織（心臓、肺、脾臓、

肝臓、精巣、上顎骨、下顎骨、大腿骨)からの全 RNA 抽出には、核酸抽出試薬 RNA-Bee (TEL-TEST、Friendswood、TX、USA) を用いた。すなわち各組織を RNA-Bee に浸漬した状態で TissueLyser II (Retch、Haan D、Germany) を用いて破碎し、1/5 容量のクロロホルムを添加し、遠心分離 (12,000 g、4 °C、15 分) した。分離された水層から RNA をイソプロパノールの添加によって沈殿させた。なお骨組織由来の RNA 精製の際には、イソプロパノール沈殿操作時に High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (タカラバイオ、滋賀、日本) を添加して回収を行った。75 %エタノールによる洗浄の後、得られた全 RNA 沈殿を 20 µl のジエチルピロカルボン酸処理水に溶解し、全 RNA 量を波長 260 nm における吸光度から算出し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems、Carlsbad、CA、USA) を用いて逆転写反応を行って、相補鎖 DNA (以下 cDNA と略す) を作製した。得られた cDNA を鋳型として、表 2 に示す *PLAP-1* 遺伝子特異的 Real-Time PCR 用プライマー (タカラバイオ) を用いて Real-Time PCR 解析を行った。PCR 反応は Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) にて行った。なお、発現量はハウスキーピング遺伝子である *Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)* 遺伝子を内在性コントロールとして用いた相対量として算出した。

3. 歯胚の組織学的解析

上顎第一臼歯歯胚がそれぞれ帽状期、鐘状期に相当する胎生 15.5 日、および 17.5 日における WT および *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リン酸緩衝液 (和光純薬工業、大阪、日本、以下 PFA と略す) に 4 °C にて一晩浸漬固定し、20 %ショ糖 (和光純薬工業) / リン酸緩衝生理食塩水に浸漬後、O.C.T. コンパウンド (サクラファインテック、東京、日本) に凍結包埋し、クライオスタット Leica CM3050 S (Leica Microsystems、Wetzlar、Germany) を用いて厚さ 8 µm で凍結薄切標本を作製した。薄切標本は、マイヤー・ヘマトキシリン (武藤化学、東京、日本) および 1 %エオシン Y 液 (和光純薬工業) を用いてヘマトキシリン・エオシン (以下 H&E と略す) 染色を行い、光学顕微鏡にて観察および写真撮影を行って、歯胚を形態学的に評価した。

4. 歯および歯周組織の組織学的解析

8 週齢オス WT および *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、組織をパラフィンワックスに埋没し、厚さ 4 µm で薄切標本を作製した。作製した薄切標本は H&E 染色を行い、光学顕微鏡にて観察および写真撮

影を行って、歯および歯周組織を形態学的に評価した。

5. micro Computed Tomography (以下 μ CT と略す) による歯根膜腔の定量解析

8~9週齢のオス WT および *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 PFA を用いて灌流固定後、下顎組織を摘出し、PFA に浸漬した。そして、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2 (リガク、東京、日本) を用いて断層撮影を行った。歯根膜腔の定量解析は、 μ CT により得られた画像データを 3 次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング、東京、日本) で処理することにより行った。

6. MEFs の分離

PLAP-1^{-/-} マウス同士を交配させた妊娠後 13.5 日目の *PLAP-1*^{-/-} マウスを屠殺して開腹し、胎仔を取り出してリン酸緩衝生理食塩水 (日研生物医学研究所、京都、日本、以下 PBS と略す) にて洗浄した。同胎仔の頭部、内臓、手足の先端部を取り除き、体幹部のみを細切後、0.05 %Trypsin・0.02 %EDTA (Life Technologies、Carlsbad、CA、USA) を加えた PBS で反応させ (37 °C、15 分)、0.05 %Trypsin・0.02 %EDTA を加えた PBS と等量の 10 %ウシ胎仔血清 (Life Technologies、以下 FCS と略す) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Life Technologies、以下 D-MEM と略す) を加えて Trypsin の活性を止めた。セルストレーナー (BD Biosciences、San jose、CA、USA) を用いて同液を濾過し、遠心 (270 g、4 °C、5 分) および上清吸引後、10 %FCS および 60 μ g/ml カナマイシン (和光純薬工業) 含有 D-MEM にて培養を行い、同細胞を *PLAP-1*^{-/-} MEFs とした。またコントロールとして、WT マウス同士を交配させることにより、WT MEFs を同様に分離し、ともに継代数 3-5 を実験に供した。

7. 細胞培養

MEFs の培養には 10 %FCS および 60 μ g/ml カナマイシン含有 D-MEM を使用した。マウス歯根膜細胞株は当教室においてクローン化した MPDL22 を実験に用いた⁷⁾。すなわち、2.5 週齢 BALB/c マウスの下顎臼歯の歯根面より歯根膜を採取し、24 穴培養プレート (Corning、Corning、NY、USA) 上で 10 %FCS および 60 μ g/ml カナマイシン含有 α -Modification of Eagle's Medium (和光純薬工業、以下 α -MEM と略す) にて 5 % CO₂、37 °C、湿度 95 % の条件下で培養し、組織片より増殖してきた細胞を 0.05 %Trypsin・0.02 %EDTA を加えた PBS を用いて処理し、付着細胞を遊離させ継代した。12 代継代培養後、1 μ g/ml

リコンビナントヒト FGF-2 タンパク（科研製薬、京都、日本より供与）含有 α -MEM にて限界希釈法を 2 度行うことによりクローニングした。得られた細胞株のうち最も高い石灰化物形成能を持つ MPDL22 を本実験に用いた。

8. Real-Time PCR 解析

各培養細胞より PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies) を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA 量を波長 260 nm における吸光度から算出し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit にて逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として、表 2 に示す各遺伝子特異的な Real-Time PCR 用プライマーを用いて Real-Time PCR 解析を行った。PCR 反応は Fast SYBR Green Master Mix を用いて StepOnePlus Real-Time PCR System にて行った。なお、各遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子である *HPRT* 遺伝子を内在性コントロールとして用いた相対量として算出した。

表2 本研究で使用したReal-Time PCR用プライマー

GenBank Acc.	遺伝子	プライマー	Tm値
NM_025711	<i>mouse PLAP-1</i>	5'-ATGATGACGATAACGATGATGACGA-3'	64.7
		5'-TGTTGTTTGAACCGATGTCAGA-3'	64.8
NM_007542	<i>mouse Biglycan</i>	5'-GATGATTGAGAATGGGAGCCTGA-3'	64.7
		5'-TCCGAAGCCCATAGGACAGAAG-3'	64.8
NM_001190451	<i>mouse Decorin</i>	5'-CTGGGCTGGCACAGCATAAGTA-3'	64.6
		5'-CGGACAGGGTTGCCGTAAG-3'	64.9
NM_015784	<i>mouse Periostin</i>	5'-AAATATAACCAGGATTTCCACAGGAG-3'	60.8
		5'-CAATGAACCTTTGTGACCTTGGAG-3'	60.9
NM_007742	<i>mouse collagen, type I, alpha 1 (Coll1a1)</i>	5'-CAGGGTATTGCTGGACAACGTG-3'	64.8
		5'-GGACCTTGTGGCCAGGTTCA-3'	64.5
NM_031163	<i>mouse collagen, type II, alpha 1 (Coll1a1)</i>	5'-ATGGAGACCGGCGAGACTTG-3'	64.9
		5'-CATCTGGACGTTAGCGGTGTTG-3'	65.0
NM_007424	<i>mouse Aggrecan</i>	5'-CGCCACTTTCATGACCCGAGA-3'	64.6
		5'-TCATTGACCCGATCCACTGGTAG-3'	64.6
NM_007431	<i>mouse Osterix</i>	5'-CGCATCTGAAAGCCCACTTG-3'	64.1
		5'-CAGCTCGTCAGAGCGAGTGAA-3'	64.3
NM_009820	<i>mouse Runx2</i>	5'-CACTGGCGGTGCAACAAGA-3'	64.5
		5'-TTTCATAACAGCGGAGGCATTTTC-3'	64.5
NM_010495	<i>mouse Id-1</i>	5'-CCTGAACGGCGAGATCAGT-3'	60.4
		5'-GCCTCAGCGACACAAGATG-3'	60.6
NM_007431	<i>mouse Alkaline phosphatase (ALPase)</i>	5'-ACACCTTGACTGTGGTTACTGCTGA-3'	64.3
		5'-CCTTGTAGCCAGGCCCGTTA-3'	64.5
NM_009263	<i>mouse Osteopontin (OP)</i>	5'-TACGACCATGAGATTGGCAGTGA-3'	65.0
		5'-TATAGGATCTGGGTGCAGGCTGTAA-3'	65.0
NM_007541	<i>mouse Osteocalcin (OC)</i>	5'-AGCAGCTTGGCCAGACCTA-3'	64.5
		5'-AGCGCCGAGTCTGTTCACCTA-3'	64.5
NM_011897	<i>mouse Sprouty 2 (Spry2)</i>	5'-ACCGATTGCTTGGAAAGTTGGA-3'	64.0
		5'-CCATCAGGTCTTGGCAGTGTG-3'	64.0
NM_011897	<i>mouse Hyaluronan synthase 2 (Has2)</i>	5'-GTCATGTACACAGCCTTCCAGAGCA-3'	63.9
		5'-AACACCTCCAACCATAGGGTCTTC-3'	63.7
NM_008006	<i>mouse FGF-2</i>	5'-AAGCGGCTCTACTGCAAGAA-3'	60.3
		5'-TACCGGTTGGCACACACTC-3'	60.6
NM_001079909	<i>mouse FGF receptor 1 (FGFR1)</i>	5'-GGAGTAAGATCGGGCCAGACA-3'	63.7
		5'-GGAGACATTCCGTAGATGAAGCA-3'	62.7
NM_201601	<i>mouse FGFR2</i>	5'-GAATACGGGTCCATCAACCACAC-3'	64.7
		5'-TCGCTGTAAACCTTGCAGACAAAC-3'	64.7
NM_001163215	<i>mouse FGFR3</i>	5'-AGTGGCTGAAGCACGTGGAA-3'	64.3
		5'-TCAAAGGTGACATTGTGCAAGGA-3'	65.0
NM_008011	<i>mouse FGFR4</i>	5'-CGAGGCATGCAGTATCTGG-3'	60.4
		5'-CGAGGCATGCAGTATCTGG-3'	62.6
NM_008215	<i>mouse Has1</i>	5'-AAGTTCCTGGGCACCCACTG-3'	64.7
		5'-AGCATTGTATAGCCACTCTCGGAAG-3'	64.0
NM_013556	<i>mouse HPRT</i>	5'-TTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTA-3'	63.7
		5'-AGGCAGATGGCCACAGGACTA-3'	64.3

9. 骨芽細胞分化誘導培地を用いた細胞分化誘導

以下の方法を用いて MEFs の細胞分化誘導を行った。すなわち、24 時間前に播種しコンフルエント状態に達した MEFs を、10 mM β グリセロリン酸（和光純薬工業）および 50 μ g/ml アスコルビン酸（和光純薬工業）、100 ng/ml リコンビナントヒト BMP-2 タンパク（R&D Systems、Minneapolis、MN、USA）を添加した 10 %FCS および 60 μ g/ml カナマイシン含有 D-MEM（以下骨芽細胞

分化誘導培地と略す)にて培養した。3日おきに骨芽細胞分化誘導培地の交換を行い、その後アリザリンレッド染色および全RNAの回収を行った。

10. アリザリンレッド染色

MEFsによる石灰化物形成はDahlの方法²⁸⁾に準じて検出した。すなわち細胞を100%エタノール(和光純薬工業)にて10分間固定し、アリザリンレッドS(和光純薬工業)にて5分間染色した後、蒸留水で洗浄し、アリザリンレッドSにより染色された部位を位相差顕微鏡にて観察した。さらに石灰化物による染色量を定量的に評価するために、デンストメトリック解析を行った。すなわち、観察された染色像を画像解析ソフトウェアwinroof(三谷商事、福井、日本)に取り込み、染色量を数値化した。

11. 細胞増殖測定

MEFsおよびMPDL22の細胞増殖測定は、5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)の細胞内取り込みを指標として、細胞増殖ELISA、BrdU化学発光キット(Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA)を用いて行った。すなわち、96穴培養プレート(PerkinElmer、Waltham、MA、USA)にMEFsは10%FCS含有D-MEMを用いて 1×10^4 個/wellで播種し、MPDL22は10%FCS含有 α -MEMを用いて 2.5×10^4 個/wellで播種し定着させた。細胞周期を可及的に静止期に同調させるため、それぞれFCSを含まない培地に交換し、24時間培養を行った。その後、0~100 ng/mlのリコンビナントヒトFGF-2タンパク(R&D Systems)にて刺激を行い、22時間後にBrdUを添加し、2時間のパルスラベルを行った。パルスラベル終了後、培地を除去し、付属のプロトコールに従って、取り込まれたBrdU量をGloMax-96 Microplate Luminometer(Promega Corporation、Madison、WI、USA)にて化学発光を測定することにより検出した。

12. ウェスタンブロットティングによる Extracellular signal-regulated protein kinase (Erk) 1/2 のリン酸化の検出

Protease Inhibitor Cocktail(Roche Diagnostics)を加えたRIPA Lysis Buffer(Millipore、Billerica、MA、USA)を用いて全細胞画分を回収し、Bradford法²⁹⁾にてタンパク量を算出した後、濃度を同値に調整した。次に2-Mercaptoethanol(BIO RAD Laboratories、Hercules、CA、USA)含有Laemmli³⁰⁾の5×サンプルバッファーにてサンプルを調整し、10%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに展開した。そしてPVDFトランスファーメンブレン(GE Healthcare、Buckinghamshire、England)ブロットティング装置(BIO

RAD Laboratories) を用いて 4 時間、50 V にて転写した。メンブレンは 5 % ウシ血清アルブミン (SIGMA, St. Louis, MO, USA)、0.1 % Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween20) (和光純薬工業) を含むトリス緩衝生理食塩水 (50 mM トリス-塩酸緩衝液 (Tris-HCl) pH7.5、150 mM NaCl (和光純薬工業)、以下 TBS と略す) に 4 °C にて一晩浸してブロッキングを行った。一次抗体には、ウサギ抗マウスリン酸化 Erk1/2 抗体 (1:1,000、Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA)、ウサギ抗マウス Erk1/2 抗体 (1:1,000、Cell signaling Technology) を用いて 4 °C にて一晩反応させた。二次抗体には、Horseradish Peroxidase (HRP) 標識したロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:10,000、GE Healthcare) を室温で 2 時間反応させた。メンブレンを 0.1 % Tween-TBS で洗浄後に基質である SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて発光シグナルを増幅し、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) にて特異的バンドを検出した。

13. PLAP-1 発現アデノウイルスの作製

アデノウイルスの構築はアデノウイルス作製キット (タカラバイオ) を用いて行った。マウス *PLAP-1* を組み込んだコスミドベクターをアデノウイルスパッケージング細胞 HEK293 にトランスフェクションした。トランスフェクションの 7~14 日後、HEK293 細胞で相同組み換えにより得られたアデノウイルスクローンを回収し、陽性クローンを選別した。得られたクローンを順次、感染を繰り返し、第 5 次ウイルスを作製して、MEFs への感染実験に使用した。また、コントロールウイルスとして LacZ 発現アデノウイルスを使用した。アデノウイルスの力価は、50 % Tissue Culture Infectious Dose 法を用いて測定し、アデノウイルスの感染は 30 Multiplicity of infection にて行った。

14. PLAP-1 siRNA の導入

内在性 *PLAP-1* 遺伝子の発現を抑制した MPDL22 株を以下の方法により、作製した。すなわち、抗菌剤を除いた 10 % FCS 含有 α -MEM を用いて、MPDL22 に *PLAP-1* 遺伝子上の異なる 3 カ所の配列をターゲットとした siRNA (Life Technologies)、720i (5'-GGGUCUUGGAAACAACAGAtt-3')、721i (5'-CCAACUAAGUGAAAUUCAtt-3')、722i (5'-GAUGUUGAAGGAUAUGGAAtt-3')、またコントロールとして Silencer Select Negative Control siRNA (Life Technologies) (共に 5 nM) を Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) 存在下にて reverse transfection 法にて導入し、96 穴培養プレートあるいは 6 穴培養プレート (Corning) に播種した。その後 6 時間後に 1

0 %FCS 含有 α -MEM と培地交換し、細胞をサブコンフルエントまで培養し、さらに 24 時間 FCS 非存在下で培養後、リコンビナントヒト FGF-2 タンパク (R & D Systems) にて刺激した。

15. PLAP-1 と FGF-2 の免疫共沈とウェスタンブロッティング

histidine 標識リコンビナントマウス PLAP-1 タンパクは、*Escherichia coli* とバキュロウイルスを感染させたカイコより作製したものをを用いた⁷⁾。3.0 μ g の histidine 標識リコンビナントマウス PLAP-1 タンパクと 0~1.0 μ g のリコンビナントヒト FGF-2 タンパク (R&D Systems) を 500 μ l の Binding buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、1 % Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether (和光純薬工業)、Protease Inhibitor Cocktail) と共に 4 $^{\circ}$ C にて 2 時間混和後、7.5 μ l の Agarose 結合 His-probe (H-3) (Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA、USA) を添加し、さらに 4 $^{\circ}$ C にて 1 時間混和した。遠心分離 (10,000 g、10 秒) により、免疫共沈複合体を回収し、Binding buffer で 3 回洗浄後、2- Mercaptoethanol 含有 Laemmli³⁰⁾ の 5 \times サンプルバッファーを用いてサンプルを調整した。同サンプルを 2 等分し、10 % アクリルアミドゲル (PLAP-1 検出用) と 15 % アクリルアミドゲル (FGF-2 検出用) を用いた SDS-PAGE に展開し、PVDF トランスファーメンブレンに 2 時間、100 V にて転写した。メンブレンは 5 % スキムミルク (雪印、東京、日本)、0.1 % Tween-TBS に 4 $^{\circ}$ C にて一晩浸してブロッキングを行った。一次抗体にはヤギ抗 PLAP-1 抗体 (1:500、Abcam、Cambridge、MA、USA) およびマウス抗 FGF-2 抗体 (1:1,000、Millipore) を用いて、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。二次抗体は、それぞれ HRP を付与したウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (1:5,000、Chemicon International、Temecula、CA、USA) およびヒツジ抗マウス IgG 抗体 (1:5,000、GE Healthcare) を室温で 1.5 時間反応させた。その後、メンブレンを 0.1 % Tween-TBS で洗浄後に基質である SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate を用いて発光シグナルを増幅し、ImageQuant LAS 4000 にて特異的バンドを検出した。

16. FGF-2 の FGFR1 への結合に PLAP-1 が与える影響についての免疫共沈とウェスタンブロッティング

0~3.0 μ g の histidine 標識リコンビナントマウス PLAP-1 タンパクと 0.3 μ g のリコンビナントヒト FGF-2 タンパク (R&D Systems) を 500 μ l の Binding buffer と共に室温にて 1 時間混和し、さらに 0.5 μ g のリコンビナントヒト FGFR1 α /Fc chimera タンパク (R&D Systems) を加えて室温にて 1 時間混和した。同混合溶液に 10 μ l の Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz

Biotechnology) を添加し、4 °Cにて1時間混和した。遠心分離 (10,000 g、10秒) により、免疫共沈複合体を回収し、Binding buffer で3回洗浄した後、2-Mercaptoethanol 含有 Laemmli³⁰⁾の5×サンプルバッファーを用いてサンプルを調整した。得られたサンプルを3等分し、10%アクリルアミドゲル (PLAP-1検出用) と15%アクリルアミドゲル (FGF-2検出用)、6%アクリルアミドゲル (FGFR1検出用) を用いた SDS-PAGE に展開し、PVDF トランスファーメンブレンに4時間、50 V にて転写した。メンブレンは5%スキムミルク、0.1%Tween-TBS に4°Cにて一晩浸してブロッキングを行った。一次抗体にはそれぞれウサギ抗 His 抗体 (G-18) (1:200、Santa Cruz Biotechnology) (PLAP-1検出用) およびマウス抗 FGF-2 抗体 (1:1,000) (FGF-2検出用)、マウス抗 Human IgG₁ Fc region 抗体 (1:500、R&D Systems) (FGFR1検出用) を用いて、4°Cで一晩反応させた。二次抗体には、HRP 標識したロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:5,000、GE Healthcare) (PLAP-1検出用) およびヒツジ抗マウス IgG 抗体 (1:5,000) (FGF-2、FGFR1検出用) を室温で2時間反応させた。その後、メンブレンを0.1%Tween-TBS で洗浄後に基質である SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate あるいは SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いて発光シグナルを増幅し、ImageQuant LAS 4000 にて特異的バンドを検出した。

17. 統計処理

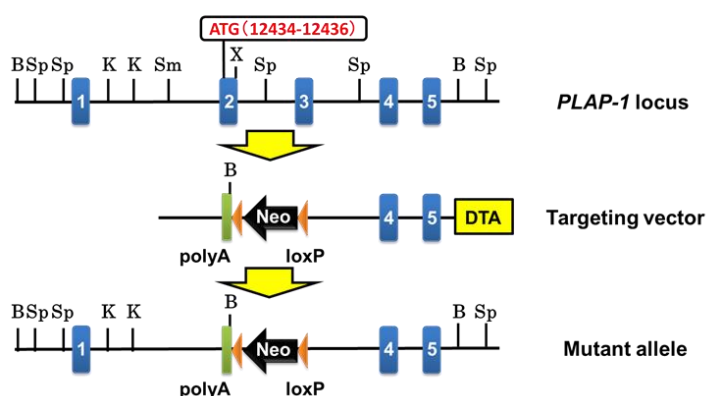
実験データは3群の平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2群比較は *t* 検定を、多群比較は Bonferroni 検定を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差があるものとした。

結果

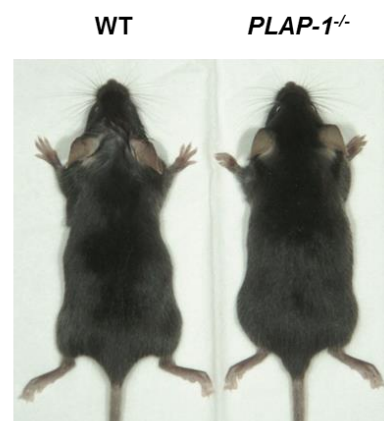
1. *PLAP-1*^{-/-} マウスの作製

マウス *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*-neo vector を構築し、C57BL/6 由来の ES 細胞へトランスフェクションし、遺伝子相同組み換えを行った (図 1A)。ネオマイシン薬剤選択により、*PLAP-1*-neo vector 遺伝子陽性の ES 細胞を単離し、ゲノム PCR およびサザンブロット法にて遺伝子の相同組み換えがなされた ES 細胞株を同定した。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 (図 1B)。*PLAP-1*^{-/-} マウスは正常に生まれ、繁殖可能かつ系統維持が可能であり、生後 8 週齢まで、外見上の異常を認めなかった。マウスジェノタイピングは、後肢より採取した足指から抽出したゲノム DNA を鋳型として、*PLAP-1* 対立遺伝子とネオマイシン耐性カセットを含む変異型 *PLAP-1* 対立遺伝子とを識別するプライマーを用いた PCR 法にて行った (図 1C)。また WT および *PLAP-1*^{-/-} マウスの、心臓、肺、脾臓、肝臓、精巣、上顎骨、下顎骨、大腿骨における *PLAP-1* mRNA の発現を Real-Time PCR にて解析した。その結果、*PLAP-1*^{-/-} マウスにおいて *PLAP-1* mRNA の発現がないことを確認した (図 1D)。

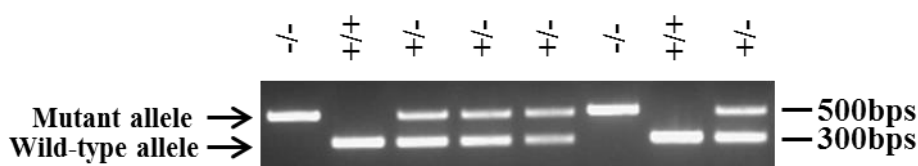
A.



B.



C.



D.

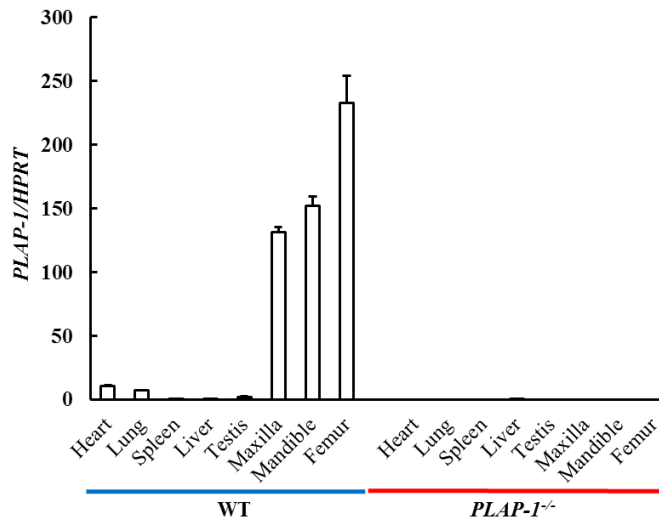


図1 *PLAP-1*^{-/-}マウスの作製

A. *PLAP-1* 遺伝子と標的ベクター、遺伝子相同組み換えの模式図 *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*-neo vector を構築し、C57BL/6 由来の ES 細胞へトランスフェクションし、遺伝子相同組み換えを行った。B : BamHI、K : KpnI、Sm : SmaI、Sp : SpeI、X : XhoI

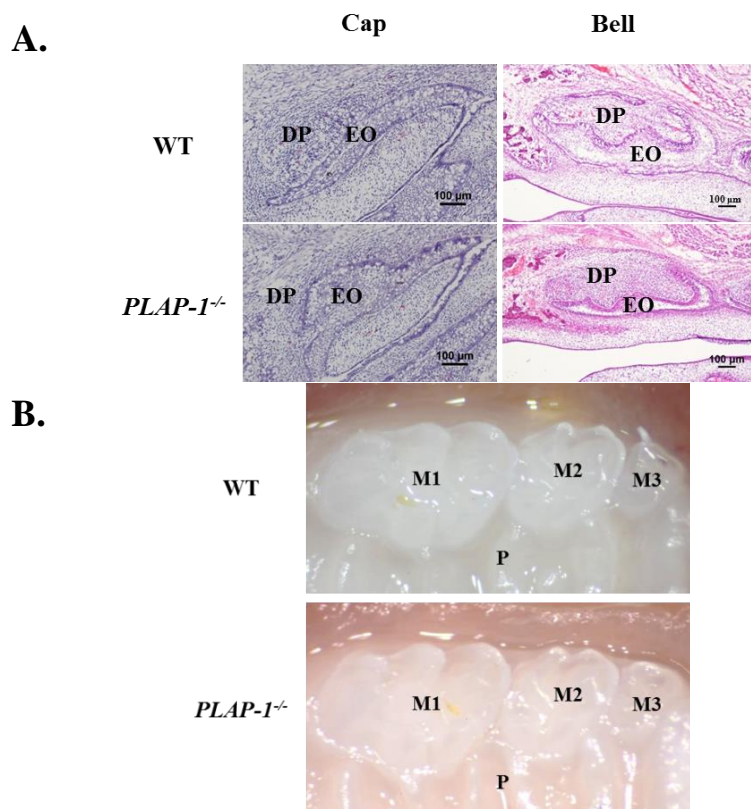
B. WT および樹立した *PLAP-1*^{-/-} マウス (6 週齢、メス) *PLAP-1*^{-/-} マウスは正常に生まれ、繁殖可能かつ系統維持が可能であり、生後 8 週齢まで、外見上の異常を認めなかった。

C. *PLAP-1* 対立遺伝子の genotyping PCR 足指から抽出したゲノム DNA を鋳型として、*PLAP-1* 対立遺伝子 (増幅塩基数 : 298 base pairs) とネオマイシン耐性カセットを含む変異型 *PLAP-1* 対立遺伝子 (増幅塩基数 : 472 base pairs) とを識別するプライマーを用いた PCR 法にて行った。

D. WT および *PLAP-1*^{-/-} マウス各組織における *PLAP-1* の遺伝子発現解析 WT および *PLAP-1*^{-/-} マウス各組織から全 RNA を抽出し、*PLAP-1* mRNA の発現をマウス *PLAP-1* 特異的プライマーを用いた Real-Time PCR にて解析した。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。Heart : 心臓、Lung : 肺、Spleen : 脾臓、Liver : 肝臓、Testis : 精巣、Maxilla : 上顎骨、Mandible : 下顎骨、Femur : 大腿骨

2. *PLAP-1*^{-/-} マウスの歯胚および歯・歯周組織における表現型の解析

これまでの当研究室での解析結果より、*PLAP-1*は歯の発生過程において、将来歯根膜へと分化していく歯小嚢に発現していることが明らかとなっている。歯胚の帽状期から歯小嚢においてわずかに *PLAP-1* の発現を認め、鐘状期、鐘状期後期、歯牙萌出後とステージがすすむに連れ、より明確に歯小嚢での発現を認めるようになる⁷⁾。そこで、樹立した *PLAP-1*^{-/-} マウスの歯の発生過程を、帽状期以降にて検討した。その結果、帽状期、鐘状期において、歯の発生に形態学的異常は認められないことが明らかとなった (図 2A)。また萌出が完了し、咬合している *PLAP-1*^{-/-} マウスの歯は、外見上では歯の大きさ、形態、歯並びなどに WT と比較して異常を認めなかった (図 2B)。 *PLAP-1*^{-/-} マウスの歯および歯周組織における表現型について組織学的に解析するために、8 週齢オス WT および *PLAP-1*^{-/-} マウスより上顎骨を採取、矢状断薄切標本を作製し、H&E 染色を行った。その結果、*PLAP-1*^{-/-} マウスの歯は、WT と比較して明らかな形態学的異常を認めなかった (図 2C)。一方、歯根膜の強拡大像において、*PLAP-1*^{-/-} マウスでは歯根膜腔の拡大傾向が認められたほか、歯根膜細胞は WT と比較してやや疎な配列を認めた (図 2D)。そこで、3 次元解析により *PLAP-1*^{-/-} マウスにおける下顎第一臼歯の歯根膜腔の定量解析を行ったところ、*PLAP-1*^{-/-} マウスにおいては統計学的有意差はないものの、WT と比較して高い値を示し、*PLAP-1*^{-/-} マウスの歯根膜腔は拡大傾向にあることが示唆された (図 2E、F)。



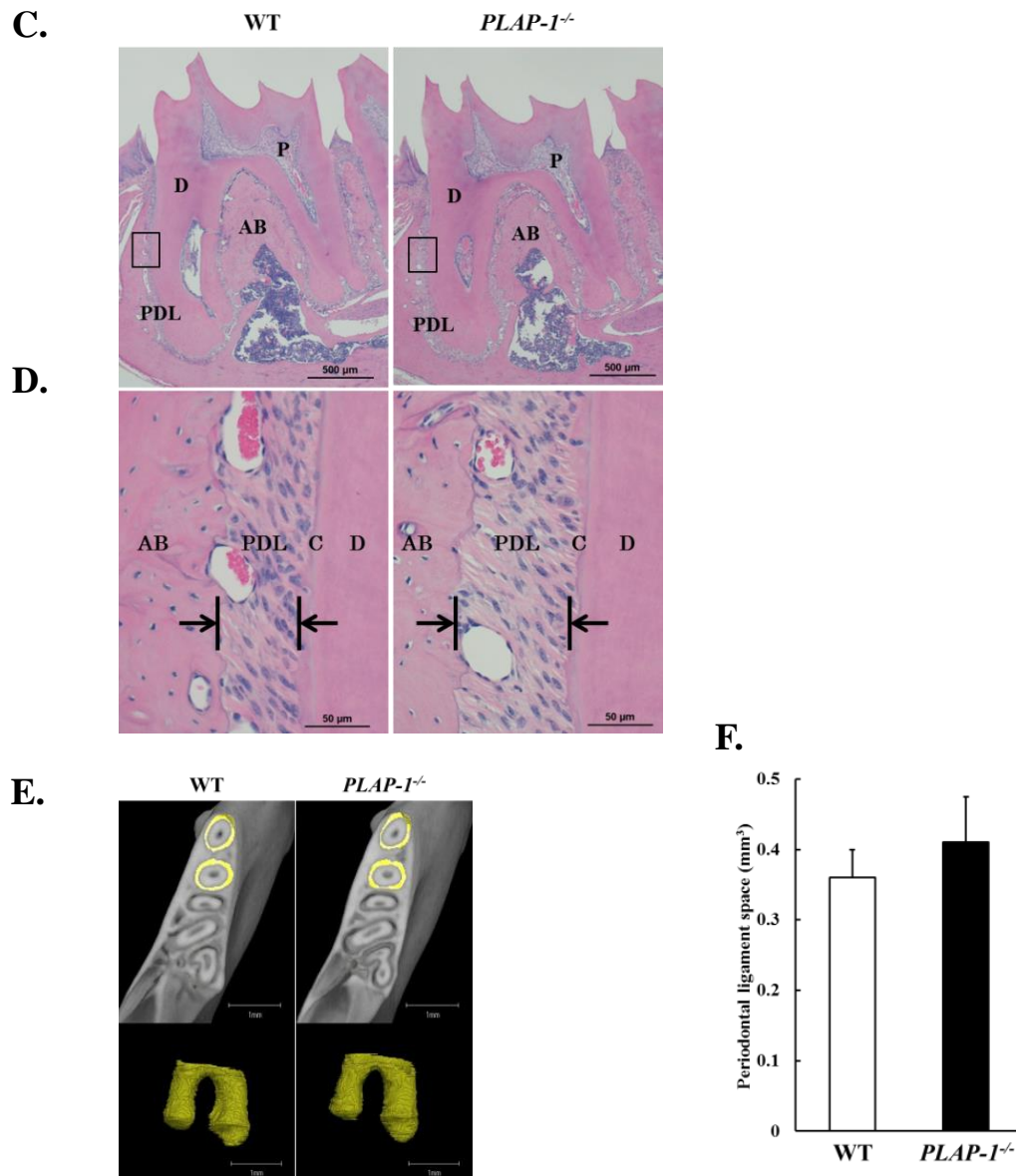


図2 *PLAP-1^{-/-}* マウスの歯胚および歯・歯周組織における表現型の解析
A. *PLAP-1^{-/-}* マウスの歯胚の組織学的解析 WT および *PLAP-1^{-/-}* マウス上顎第一臼歯歯胚の帽状期、鐘状期における組織像 DP: dental papilla、EO: enamel organ **B. *PLAP-1^{-/-}* マウスの上顎臼歯** 9週齢オス WT および *PLAP-1^{-/-}* マウスの上顎臼歯の写真 M1: first molar、M2: second molar、M3: third molar、P: palate **C. *PLAP-1^{-/-}* マウス臼歯の歯・歯周組織の組織学的解析** 8週齢オス WT および *PLAP-1^{-/-}* マウスの上顎骨より作製した矢状断薄切標本を H&E 染色した。上顎第一臼歯および歯周組織の組織像 AB: alveolar bone、D: dentin、P: pulp、PDL: periodontal ligament **D. *PLAP-1^{-/-}* マウス臼歯歯根膜の組織学的解析** C の四角枠の拡大像を示す。矢印は、セメント質と歯槽骨の間の幅を示す。AB: alveolar bone、C: cementum、D: dentin、PDL: periodontal ligament **E. μ CT による *PLAP-1^{-/-}* マウス臼歯の歯根膜腔の 3次元構築像** 8~9 週齢オス WT および *PLAP-1^{-/-}* マウスにおける下顎第一臼歯歯根膜腔の定量解析のため、 μ CT により得られた画像データから歯根膜を抽出し、3次元構築を行った。その代表的なイメージ像を示す。 **F. *PLAP-1^{-/-}* マウス臼歯の歯根膜腔の定量解析** 8~9 週齢オス WT および *PLAP-1^{-/-}* マウスにおける下顎第一臼歯の歯根膜腔を 3次元解析ソフトウェアにて定量的に解析した結果を示す。WT (n=6)、*PLAP-1^{-/-}* (n=6)。解析結果は、それぞれ 6 群の平均値 \pm 標準誤差で示した。

3. *PLAP-1*^{-/-}MEFs における細胞外基質の遺伝子発現解析

PLAP-1^{-/-} マウス由来の MEFs を用いて、*PLAP-1* によるサイトカインの機能制御に関する解析を行った。MEFs は、胎生 13.5 日目の WT および *PLAP-1*^{-/-} マウス胎仔の体幹部から Trypsin-EDTA 処理により分離し、実験に用いた。まず、*PLAP-1*^{-/-} MEFs における細胞外基質の遺伝子発現について Real-Time PCR 解析を行った(図 3)。その結果、*PLAP-1*^{-/-} MEFs では *PLAP-1* の発現を認めないのに対し、WT MEFs では *PLAP-1* が発現していることを確認した。また、これまでに *PLAP-1* と相同性の高い Biglycan や Decorin のノックアウトマウスにおいて、他の細胞外基質の発現が上昇することで相補的に機能している可能性が示唆されていることから、*PLAP-1*^{-/-} MEFs においても、その他の細胞外基質の発現に関する検討を行った。その結果、*PLAP-1*^{-/-} MEFs において *Biglycan*、*Decorin* の発現上昇を認めたほか、*Periostin* には差がなく、また骨や軟骨の主要な細胞外基質である *Collagen, type I, alpha 1 (Col 1a1)*、*Collagen, type II, alpha 1 (Col 2a1)*、*Aggrecan* の遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。

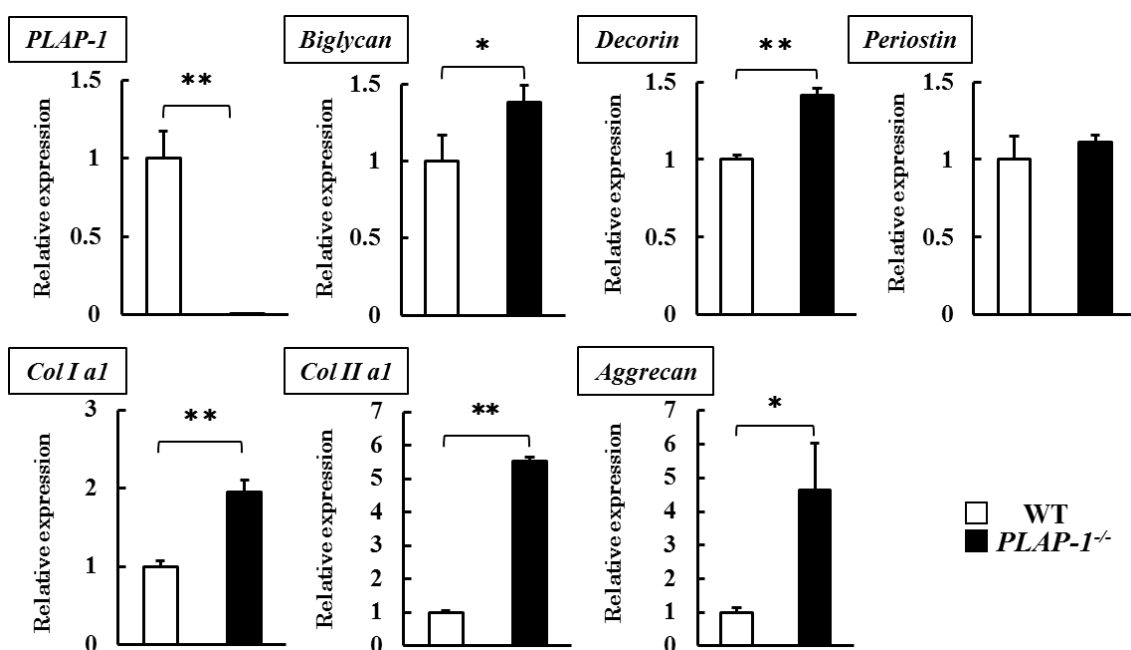


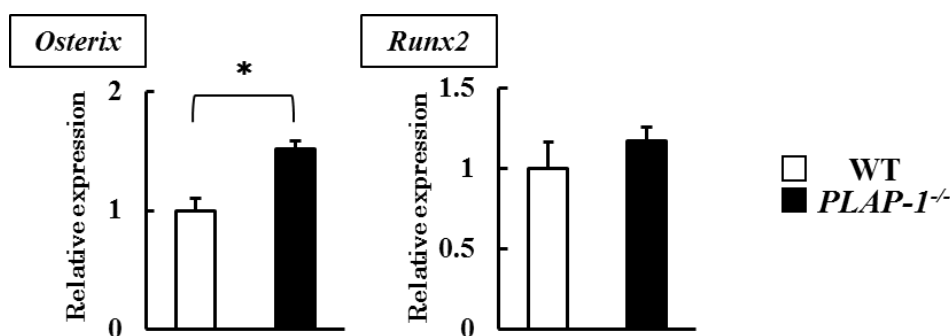
図 3 恒常状態の *PLAP-1*^{-/-}MEFs における細胞外基質の遺伝子発現解析

無刺激の WT および *PLAP-1*^{-/-} MEFs から全 RNA を抽出し、細胞外基質の遺伝子発現を内在性コントロールとして *HPRT* を用いた Real-Time PCR にて解析した。なお、*PLAP-1*^{-/-} MEFs における各遺伝子の発現量は、WT における発現量を 1 としたときの相対値として示した。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値 ± 標準誤差で示した。* : $p < 0.05$ vs WT、** : $p < 0.01$ vs WT

4. *PLAP-1*^{-/-}MEFsにおける BMP-2 誘導性細胞動態の解析

次に、*PLAP-1*^{-/-}MEFsにおける骨芽細胞分化に関連する転写因子の遺伝子発現について Real-Time PCR 解析を行った (図 4A)。その結果、*PLAP-1*^{-/-}MEFs においては *Osterix* の発現上昇を認め、同様に *Runx2* についても、統計学的有意差はないものの、やや上昇傾向にあることが明らかとなった。*PLAP-1*^{-/-}MEFs において骨芽細胞分化関連遺伝子の発現上昇を認めたこと、歯根膜細胞において *PLAP-1* が細胞外で BMP-2 と直接結合し、BMP-2 の BMP 受容体への結合を阻害することから⁷⁻⁹⁾、*PLAP-1*^{-/-}MEFs においては、BMP-2 に対する反応性の亢進が想定されたため、*PLAP-1*^{-/-}MEFs を BMP-2 で刺激し、その細胞動態を解析した。まず、BMP-2 刺激により誘導される遺伝子の発現解析を行った。BMP 刺激によって発現が上昇する初期応答遺伝子として *Id* 遺伝子が知られており³¹⁾、BMP による *Id* 遺伝子の発現制御機構の解析は、これまで *Id-1* を中心に進められてきた^{32, 33)}。そこで、MEFs を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、BMP-2 (0~10 ng/ml) で刺激し、1 時間後の BMP-2 誘導性 *Id-1* 遺伝子の発現を Real-Time PCR にて解析した。その結果、*PLAP-1*^{-/-}MEFs においては WT MEFs と比較して、有意に BMP-2 誘導性 *Id-1* 発現の亢進を認めた (図 4B)。また、MEFs をアスコルビン酸、β-グリセロリン酸、BMP-2 を添加した骨芽細胞分化誘導培地で長期に培養することで、骨芽細胞へ分化誘導可能であることが報告されている^{23, 24)}。そこで、MEFs を BMP-2 誘導性に骨芽細胞へと分化誘導した際の石灰化物形成をアリザリン染色にて、骨芽細胞分化関連遺伝子の発現動態を Real-Time PCR にて解析した。その結果、アリザリン染色において *PLAP-1*^{-/-}MEFs は WT MEFs と比較して、骨芽細胞分化における石灰化物形成の亢進を認めた (図 4C)。さらに、*PLAP-1*^{-/-}MEFs において、WT MEFs と比較して *Runx2*、*Alkaline phosphatase (ALPase)*、*Osteopontin (OP)*、*Osteocalcin (OC)* は培養後期において有意に高い遺伝子発現上昇を認めた (図 4D)。以上の結果から、*PLAP-1*^{-/-}MEFs は WT MEFs と比較して、BMP-2 に対する反応性が亢進していることが示唆された。

A.



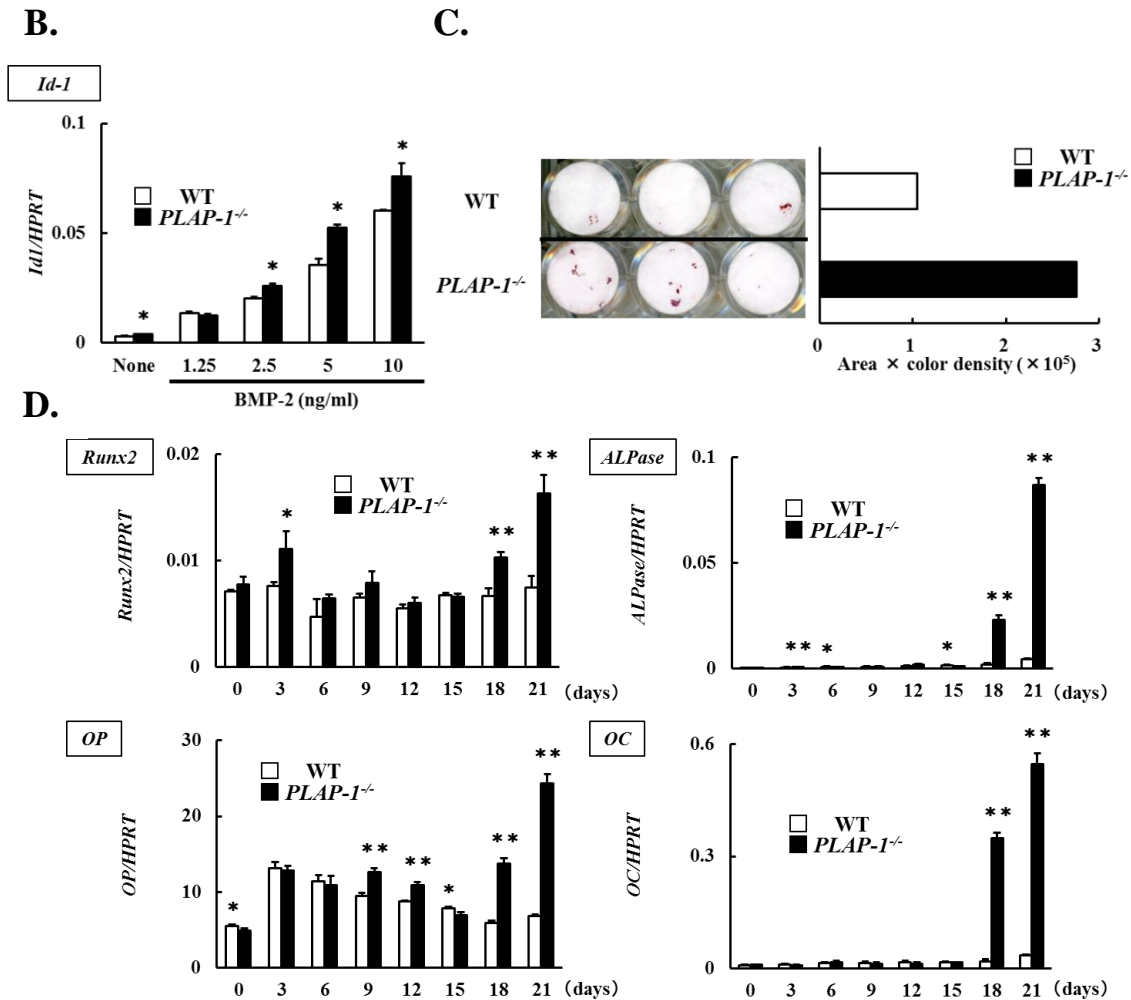


図4 *PLAP-1*^{-/-}MEFsにおけるBMP-2誘導性細胞動態の解析

A. *PLAP-1*^{-/-} MEFsにおける骨芽細胞分化関連転写因子の遺伝子発現解析 無刺激のWTおよび*PLAP-1*^{-/-}MEFsから全RNAを抽出し、骨芽細胞分化関連転写因子の遺伝子発現を内在性コントロールとして*HPRT*を用いたReal-Time PCRにて解析した。なお、*PLAP-1*^{-/-}MEFsにおける各遺伝子の発現量は、WTにおける発現量を1としたときの相対値として示した。解析結果は、それぞれ3群の平均値±標準誤差で示した。* : $p < 0.01$ vs WT

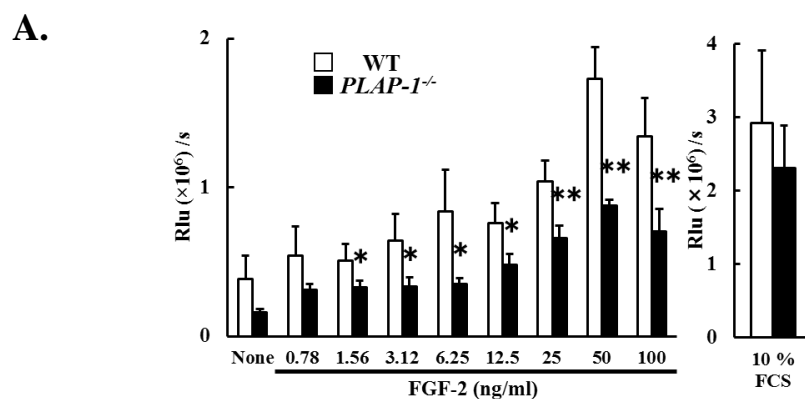
B. *PLAP-1*^{-/-} MEFsにおけるBMP-2誘導性遺伝子発現解析 WTおよび*PLAP-1*^{-/-}MEFsをBMP-2 (0~10 ng/ml)で刺激し、1時間後のBMP-2誘導性*Id-1*の発現をReal-Time PCRにて解析した。3回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。解析結果は、それぞれ3群の平均値±標準誤差で示した。* : $p < 0.05$ vs WT

C. *PLAP-1*^{-/-} MEFsのBMP-2誘導性骨芽細胞分化における石灰化物形成の解析 WTおよび*PLAP-1*^{-/-}MEFsをBMP-2誘導性に骨芽細胞へと分化誘導した際の培養21日目における石灰化物形成をアリザリン染色にて検討した。図はそれぞれの実験群の染色像を示す。右のグラフは図の染色度合いを数値化して比較したものである。3回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

D. *PLAP-1*^{-/-} MEFsのBMP-2誘導性骨芽細胞分化における骨芽細胞分化関連遺伝子発現解析 WTおよび*PLAP-1*^{-/-}MEFsをBMP-2誘導性に骨芽細胞へと分化誘導した際の骨芽細胞分化関連遺伝子の発現動態を、各遺伝子特異的プライマーを用いたReal-Time PCRにて解析した。3回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。解析結果は、それぞれ3群の平均値±標準誤差で示した。* : $p < 0.05$ vs WT, ** : $p < 0.01$ vs WT

5. *PLAP-1*^{-/-}MEFs における FGF-2 誘導性細胞動態の解析

FGF-2 が FGFR と結合すると、FGFR は二量体を形成し、分子内チロシンキナーゼが活性化して、受容体直下の FGFR substrate 2 (FRS2) 分子に複数のチロシンリン酸化がおり、Ras-Erk1/2 経路、phosphatidylinositol-3 kinase 経路を活性化する³⁴⁻³⁶。シグナルは核内に移行して FGF-2 誘導性に *Sprouty* (*Spry*) や *Hyaluronan synthase* (*Has*) などの遺伝子の転写を誘導する³⁷⁻⁴⁰。そしてその結果、様々な細胞の機能を発現させることが知られている。まず、MEFs を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、FGF-2 (0~100 ng/ml) で刺激し、24 時間後の BrdU の取り込み量を測定し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応を検討した。その結果、*PLAP-1*^{-/-} MEFs は WT MEFs と比較して、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応の有意な低下を認めた (図 5A)。次に、FGF-2 刺激により誘導される遺伝子の発現解析を行った。FCS 非存在下で一晩培養した MEFs を FGF-2 (0~20 ng/ml) で刺激し、1 時間後の FGF-2 誘導性 *Spry2*、*Has2* 遺伝子の発現を Real-Time PCR にて解析した。その結果、*PLAP-1*^{-/-} MEFs においては WT MEFs と比較して、有意に FGF-2 誘導性 *Spry2*、*Has2* 発現の低下を認めた (図 5B)。続いて、MEFs における FGF-2 の細胞内シグナル伝達解析を行った。MEFs を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、FGF-2 (10 ng/ml) で刺激し、0 分~120 分後に細胞を回収し、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。その結果、*PLAP-1*^{-/-} MEFs においては、WT MEFs と比較して、FGF-2 誘導性の Erk1/2 のリン酸化の低下が認められた (図 5C)。以上の結果から、*PLAP-1*^{-/-} MEFs は WT MEFs と比較して、FGF-2 に対する反応性が低下していることが示唆された。また、無刺激の MEFs における FGF-2 関連遺伝子の発現解析を行った (図 5D)。その結果、*PLAP-1*^{-/-} MEFs では WT MEFs と比較して、*FGF-2* およびその受容体である *FGFR1*、*2*、*4* の発現に有意な差を認めなかった。また *FGFR3* についてはその発現が高いことが明らかとなった。すなわち、*PLAP-1*^{-/-} MEFs における FGF-2 に対する反応性の低下は、FGF-2 およびその受容体の発現量の低下によるものではないことが示された。



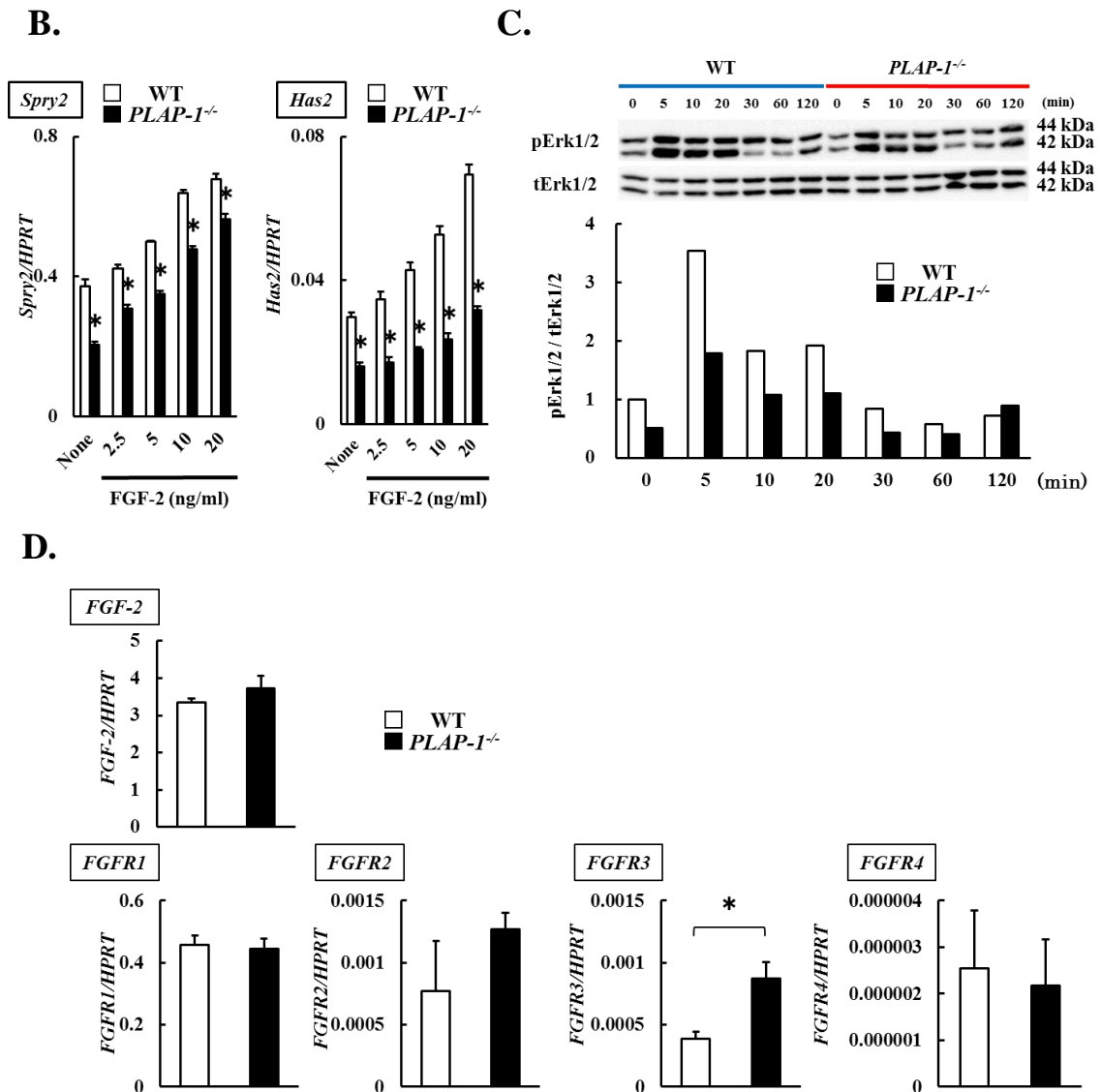


図5 *PLAP-1^{-/-}* MEFsにおける FGF-2 誘導性細胞動態の解析

A. *PLAP-1^{-/-}* MEFs における FGF-2 誘導性細胞増殖反応解析 WT および *PLAP-1^{-/-}* MEFs を FGF-2 (0~100 ng/ml) で刺激し、24 時間後の BrdU の取り込み量を測定し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応を検討した。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。Rlu/s: Relative light unit/second, *: $p < 0.05$ vs WT, **: $p < 0.01$ vs WT

B. *PLAP-1^{-/-}* MEFs における FGF-2 誘導性遺伝子発現解析 WT および *PLAP-1^{-/-}* MEFs を FGF-2 (0~20 ng/ml) で刺激し、1 時間後の FGF-2 誘導性 *Spry2*、*Has2* の発現を Real-Time PCR にて解析した。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。*: $p < 0.01$ vs WT

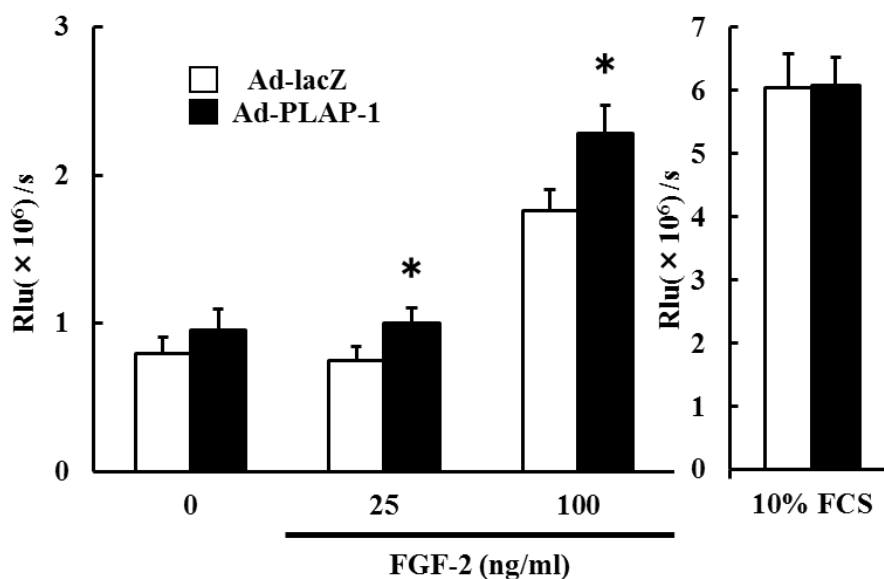
C. *PLAP-1^{-/-}* MEFs における FGF-2 誘導性 Erk1/2 のリン酸化解析 WT および *PLAP-1^{-/-}* MEFs を FGF-2 (10 ng/ml) で刺激し、誘導される Erk1/2 のリン酸화를ウェスタンブロッティングにて解析した。下のグラフはリン酸化 Erk1/2 のバンドの密度の値を、全 Erk1/2 のバンドの密度の値で除して比較したものである。pErk1/2:リン酸化 Erk1/2、tErk1/2:全 Erk1/2

D. *PLAP-1^{-/-}* MEFs における FGF-2 関連遺伝子発現解析 無刺激の WT および *PLAP-1^{-/-}* MEFs から全 RNA を抽出し、FGF-2 関連遺伝子の発現を内在性コントロールとして *HPRT* を用いた Real-Time PCR にて解析した。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$ vs WT

6. PLAP-1 発現が *PLAP-1*^{-/-}MEFs の FGF-2 誘導性細胞動態に与える影響の解析

PLAP-1^{-/-}MEFs における FGF-2 に対する反応性の低下が、PLAP-1 発現の有無によるものであることを明らかにするため、PLAP-1 発現が *PLAP-1*^{-/-}MEFs の FGF-2 誘導性細胞動態に与える影響について解析を行った。まず、FLAG 標識 PLAP-1 発現アデノウイルスを *PLAP-1*^{-/-}MEFs に感染させ、24 時間後の培養上清を回収した。同上清を SDS-PAGE に展開し、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、PLAP-1 タンパクの発現を確認した（データに示さず）。コントロールとしては Lac Z 発現アデノウイルスを使用した。同細胞を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、FGF-2 (0~100 ng/ml) で刺激し、24 時間後の BrdU の取り込み量を測定し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応を検討した。その結果、PLAP-1 発現群ではコントロールと比較して、FGF-2 誘導性細胞増殖反応の有意な亢進を認めた (図 6A)。さらに同細胞を用いて FGF-2 の細胞内シグナル伝達解析を行った。LacZ および PLAP-1 発現 *PLAP-1*^{-/-}MEFs を FGF-2 (20 ng/ml) で刺激し、0 分~120 分後に細胞を回収し、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。その結果、PLAP-1 発現群ではコントロールと比較して、FGF-2 誘導性の Erk1/2 のリン酸化の亢進が認められた (図 6B)。以上の結果から、*PLAP-1*^{-/-}MEFs に PLAP-1 を発現させることで、FGF-2 に対する反応性が亢進することが示された。

A.



B.

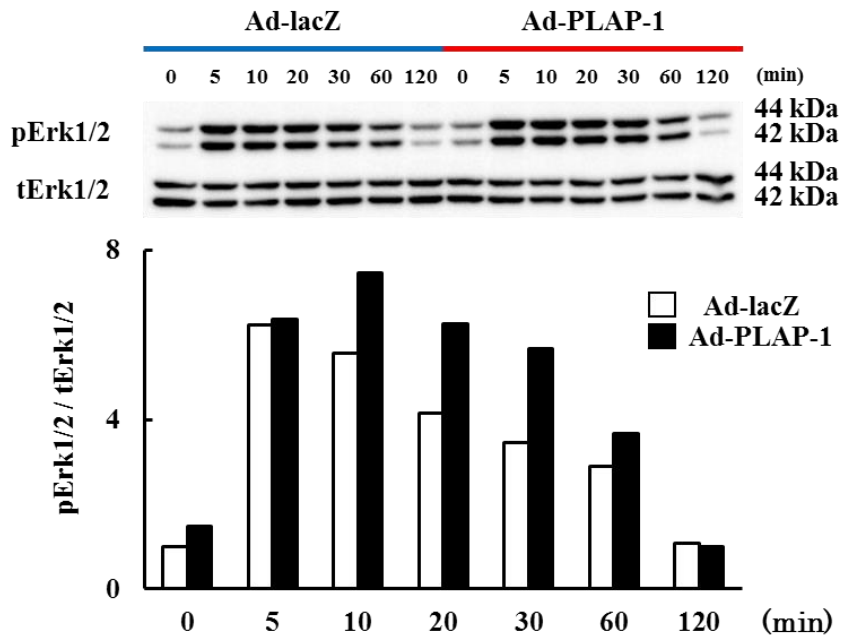


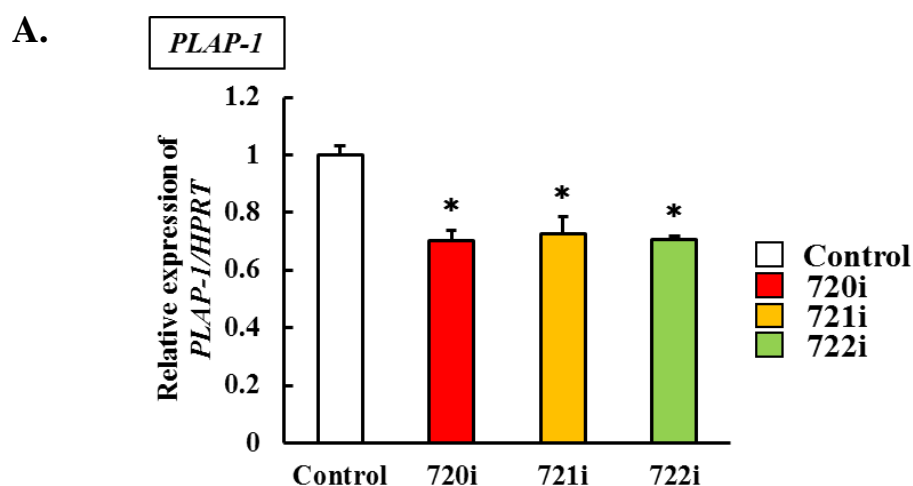
図6 PLAP-1発現が *PLAP-1*^{-/-}MEFsの FGF-2誘導性細胞動態に与える影響

A. PLAP-1発現 *PLAP-1*^{-/-}MEFsにおける FGF-2誘導性細胞増殖反応解析 LacZおよび PLAP-1発現 *PLAP-1*^{-/-}MEFsを FGF-2 (0~100 ng/ml)で刺激し、24時間後の BrdUの取り込み量を測定し、FGF-2誘導性の細胞増殖反応を検討した。解析結果は、それぞれ3群の平均値±標準誤差で示した。Ad-lacZ: LacZ発現アデノウイルス感染群、Ad-PLAP-1: FLAG標識 PLAP-1発現アデノウイルス感染群、Rlu/s: Relative light unit/second、*: $p < 0.05$ vs Ad-lacZ

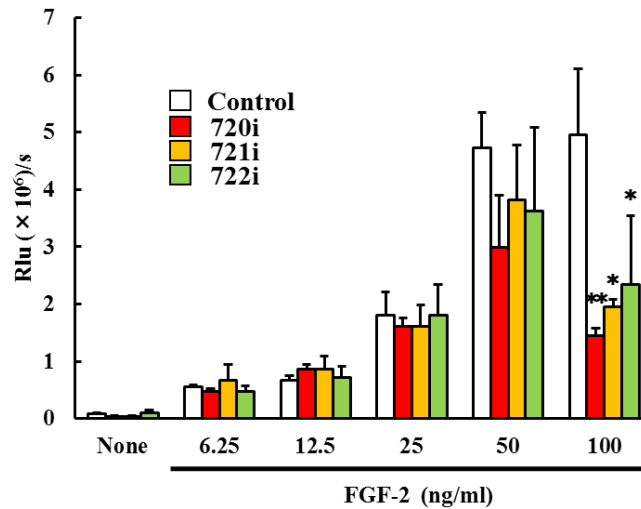
B. PLAP-1発現 *PLAP-1*^{-/-}MEFsにおける FGF-2誘導性 Erk1/2のリン酸化解析 LacZおよび PLAP-1発現 *PLAP-1*^{-/-}MEFsを FGF-2 (20 ng/ml)で刺激し、誘導される Erk1/2のリン酸化をウェスタンブロッティングにて解析した。下のグラフはリン酸化 Erk1/2のバンドの密度の値を全 Erk1/2のバンドの密度の値で除して比較したものである。Ad-lacZ: LacZ発現アデノウイルス感染群、Ad-PLAP-1: FLAG標識 PLAP-1発現アデノウイルス感染群、pErk1/2:リン酸化 Erk1/2、tErk1/2:全 Erk1/2

7. 内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現抑制が歯根膜細胞の FGF-2 誘導性細胞動態に与える影響の解析

歯根膜細胞においても、MEFs と同様に *PLAP-1* による FGF-2 の機能制御について検討するため、マウス歯根膜細胞株 MPDL22 を用いて siRNA により内在性 *PLAP-1* 遺伝子の発現を抑制した MPDL22 株 (720i、721i、722i) を作製した。まず、*PLAP-1* siRNA 導入による発現抑制を Real-Time PCR により確認した。その結果、720i、721i、722i とともにコントロールと比較して、有意な内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現の抑制を認めた (図 7A)。そこで、コントロールおよび *PLAP-1* siRNA 導入群を FGF-2 で刺激し、内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現抑制が FGF-2 誘導性の細胞増殖反応に与える影響を解析した。コントロールおよび *PLAP-1* siRNA 導入群を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、FGF-2 (0~100 ng/ml) で刺激し、24 時間後の BrdU の取り込み量を測定し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応を検討した。その結果、コントロールでは、FGF-2 の濃度依存的な細胞増殖反応を認めた。一方、内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現を抑制した 720i、721i、722i においては、FGF-2 100 ng/ml にて、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応がコントロールと比較して有意に低下していることが明らかとなった (図 7B)。さらに、コントロールおよび *PLAP-1* siRNA 導入群において、FGF-2 刺激により誘導される遺伝子の発現解析を行った。コントロールおよび *PLAP-1* siRNA 導入群を 24 時間 FCS 非存在下で培養後、FGF-2 (0~10 ng/ml) で刺激し、1 時間後の FGF-2 誘導性 *Has1* 遺伝子の発現を Real-Time PCR にて解析した。その結果、内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現を抑制した 720i、721i、722i においては、コントロールと比較して有意に FGF-2 誘導性 *Has1* 発現の低下を認めた (図 7C)。以上の結果から、歯根膜細胞においても内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現の抑制により FGF-2 に対する反応性が低下することが示唆された。



B.



C.

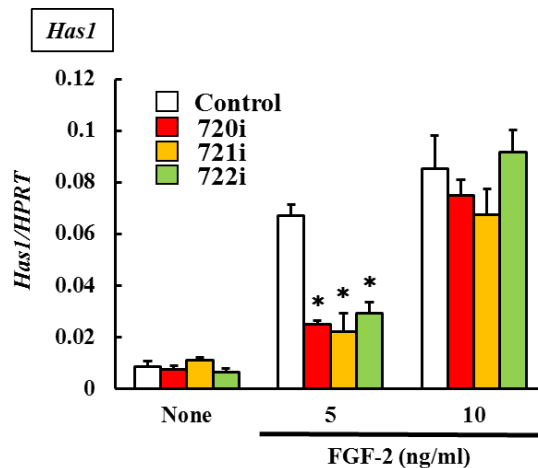


図7 マウス歯根膜細胞株において内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現抑制が FGF-2 誘導性細胞動態に与える影響

A. *PLAP-1* siRNA 導入による発現抑制率 内在性 *PLAP-1* 遺伝子の発現を抑制した MPDL22 株における *PLAP-1* 遺伝子の発現を内在性コントロールとして *HPRT* を用いた Real-Time PCR により確認した。なお、各 siRNA 導入群における *PLAP-1* の発現量は、コントロール siRNA 導入群における発現量を 1 としたときの相対値として示した。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。Control: コントロール siRNA 導入群、720i・721i・722i: それぞれ異なる配列をターゲットとした *PLAP-1* siRNA 導入群、*: $p < 0.01$ vs Control

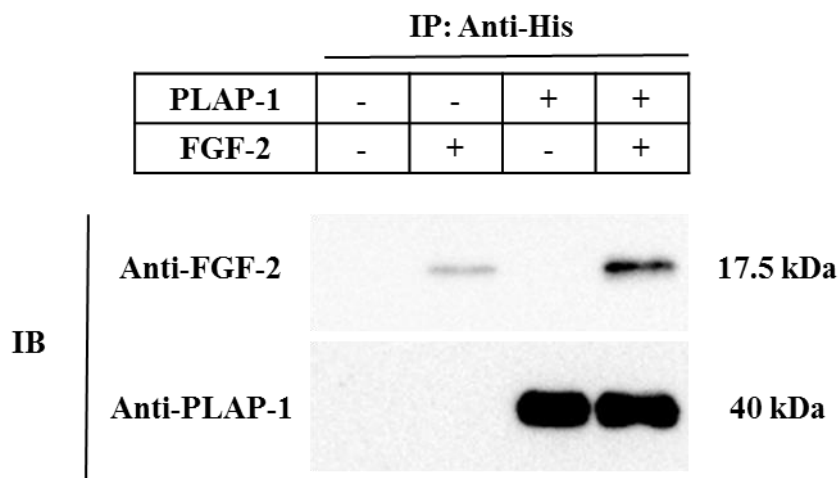
B. 内在性 *PLAP-1* 遺伝子の発現を抑制した MPDL22 株における FGF-2 誘導性細胞増殖反応解析 コントロールおよび *PLAP-1* siRNA 導入群を FGF-2 (0~100 ng/ml) で刺激し、24 時間後の BrdU の取り込み量を測定し、FGF-2 誘導性の細胞増殖反応を検討した。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。Control: コントロール siRNA 導入群、720i・721i・722i: それぞれ異なる配列をターゲットとした *PLAP-1* siRNA 導入群、Rlu/s: Relative light unit/second、*: $p < 0.05$ vs Control、** : $p < 0.01$ vs Control

C. 内在性 *PLAP-1* 遺伝子の発現を抑制した MPDL22 株における FGF-2 誘導性遺伝子発現解析 コントロールおよび *PLAP-1* siRNA 導入群を FGF-2 (0~10 ng/ml) で刺激し、1 時間後の FGF-2 誘導性 *Has1* の発現を Real-Time PCR にて解析した。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。Control: コントロール siRNA 導入群、720i・721i・722i: それぞれ異なる配列をターゲットとした *PLAP-1* siRNA 導入群、*: $p < 0.01$ vs Control

8. PLAP-1 と FGF-2 関連分子の免疫共沈解析

本研究における、MEFs および MPDL22 を用いた解析結果から、PLAP-1、FGF-2 および FGFR において何らかの分子間相互作用があることが想定される。そこで、免疫共沈法を用いて PLAP-1 と FGF-2 とが直接結合し得るか否かについて検討を行った。免疫共沈解析は、histidine 標識リコンビナントマウス PLAP-1 タンパクとリコンビナントヒト FGF-2 タンパクを 4 °C にて 2 時間混和後、Agarose 結合 His-probe を添加して 4 °C、1 時間混和し、免疫沈降を行った。続いて抗 FGF-2 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより FGF-2 の共沈の有無を解析した。その結果、FGF-2 の共沈を認め、PLAP-1 と FGF-2 の結合が明らかとなった (図 8A)。歯根膜においては、FGF-2 の受容体は主に FGFR1 であることが示されている^{41, 42)}。そこで、PLAP-1 と FGF-2 の結合が FGFR1 への結合能に与える影響について解析を行った。histidine 標識リコンビナントマウス PLAP-1 タンパクとリコンビナントヒト FGF-2 タンパクを室温にて 1 時間混和し、さらにリコンビナントヒト FGFR1 α /Fc chimera タンパクを加えて室温にて 1 時間混和した。同混合溶液に Protein A/G PLUS-Agarose を添加して Fc 部位にて 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より解析した。その結果、PLAP-1 非添加のレーンにおいて、FGF-2 の FGFR1 への結合が確認された (図 8B レーン 2)。一方、PLAP-1 を添加することにより、FGF-2 の FGFR1 に対する結合量が増加することが明らかとなった (図 8B レーン 3-6)。また、図 8B レーン 5、6 において PLAP-1 の共沈が確認されたことから、PLAP-1 と FGF-2、FGFR1 が複合体を形成することが明らかとなった。すなわち、PLAP-1 が FGF-2 と結合することで、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。

A.



B.

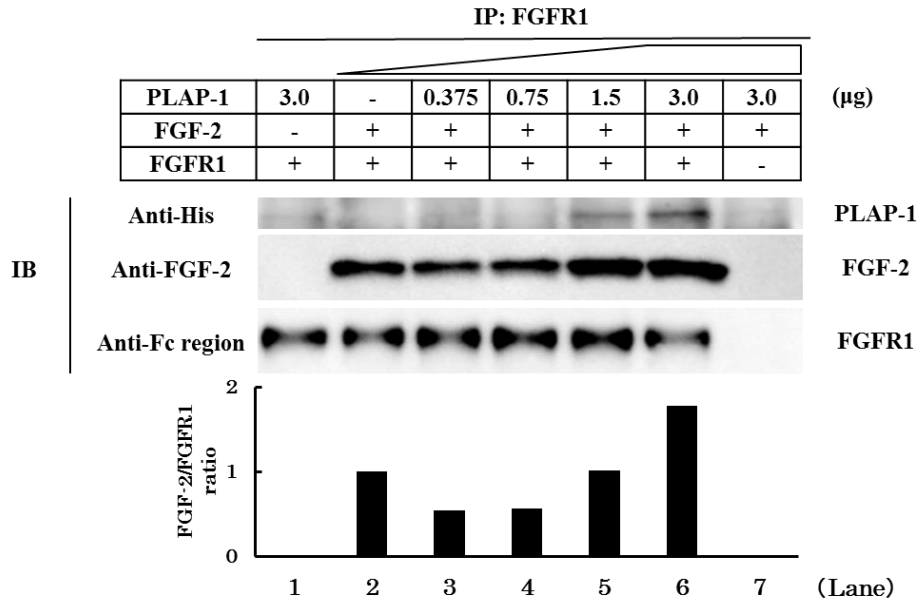


図 8 免疫共沈法を用いた PLAP-1 と FGF-2 関連分子の結合の検出

A. PLAP-1 と FGF-2 との結合解析 histidine 標識リコンビナントマウス PLAP-1 タンパクとリコンビナントヒト FGF-2 タンパクの混合溶液を Agarose 結合 His-probe にて免疫沈降し、SDS-PAGE に展開し、PVDF メンブレンに転写後、抗 FGF-2 抗体を用いて FGF-2 の共沈の有無をウェスタンブロッティングにて解析した。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。 **B. FGF-2 の FGFR1 への結合に PLAP-1 が与える影響の解析** histidine 標識リコンビナントマウス PLAP-1 タンパクとリコンビナントヒト FGF-2 タンパクを混和し、さらにリコンビナントヒト FGFR1α/Fc chimera タンパクを混和した。同混合溶液に Protein A/G PLUS-Agarose を加えて FGFR1 を免疫沈降し、SDS-PAGE に展開し、PVDF メンブレンに転写後、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解析した。下のグラフは FGF-2 のバンドの密度の値を、FGFR1 のバンドの密度の値で除して比較したものである。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

考察

本研究は、*in vivo*における PLAP-1 の機能を解析するため、*PLAP-1*^{-/-}マウスを作製して生後 8 週齢までの表現型の解析を行い、さらに *PLAP-1*^{-/-}マウス由来の MEFs を用いて、*in vitro*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。

本研究により、*PLAP-1*^{-/-}マウスの樹立に成功した。*PLAP-1*^{-/-}マウスは正常に生まれ、生後 8 週齢までの解析の結果では、全身的には著しい表現型は認められなかった。また、WT マウスの胎生期において、全身の硬組織とその周囲にも *PLAP-1* の発現を認めるとの報告があることから²⁰⁾、*PLAP-1*^{-/-}マウスの胎生期の表現型の解析を行った。*PLAP-1*^{-/-}マウスの胎生期における体の大きさ、体重の評価をはじめ、全身透明骨格標本による骨・軟骨組織の解析、メッケル軟骨の石灰化過程の解析などを行ったが、明らかな異常は認めなかった（データに示さず）。これまでの報告から、PLAP-1 と同じ SLRP family class I に属し、PLAP-1 と相同性の高い Decorin および Biglycan のノックアウトマウスは正常に生まれ、見かけ上の著しい表現型が認められないものの^{43, 44)}、Decorin と Biglycan のダブルノックアウトマウスでは、著しい皮膚の脆弱化、骨減少症など重篤な表現型を示すことから⁴⁵⁾、SLRP family は互いにある程度相補的な機能を持つことが考えられる。実際に、Decorin ノックアウトマウスにおいて Biglycan が発現上昇し、欠損した Decorin に対して相補的に機能している可能性が示唆されている⁴⁶⁾。これらのことから、PLAP-1 の欠損によっても、他の細胞外基質が PLAP-1 の機能を補完するために、著しい表現型が現れなかった可能性が考えられる。また、*PLAP-1*^{-/-}MEFs において *Biglycan*、*Decorin* をはじめ種々の細胞外基質の遺伝子発現の上昇を認めたことは、他の細胞外基質が PLAP-1 の機能を補うために発現上昇したという仮説を支持する 1 つの根拠となり得るものである。一方で、Biglycan ノックアウトマウスにおいては、Biglycan が BMP-4 の誘導する骨芽細胞分化を制御することから、生後 3 ヶ月齢以降に加齢とともに骨粗鬆症を呈することが報告されている^{44, 47)}。これらのことから、今後、*PLAP-1*^{-/-}マウスにおいても、老齢期における表現型の解析を行う必要があるものと考えられる。

PLAP-1^{-/-}マウスの歯および歯周組織における表現型については、まず、*PLAP-1* が歯の発生過程において、帽状期以降の歯小嚢に発現を認めるとの報告から⁷⁾、*PLAP-1*^{-/-}マウスの歯胚の組織学的解析を行ったが、形態学的異常を認めなかった。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。*PLAP-1* と相同性の高い Decorin のノックアウトマウスの歯根膜において、コラーゲン線維お

よび線維束の形態異常が認められることが報告されている^{48, 49)}。また、歯根膜で高い発現を示す細胞外基質 Periostin のノックアウトマウスにおいては、歯根膜での Collagen type I や Fibronectin、Tenascin C の分布が WT とは異なるという報告がある⁵⁰⁾。これらのことから、*PLAP-1*^{-/-}マウスの歯胚の発生過程および萌出した歯・歯周組織においては、他の細胞外基質が *PLAP-1* の機能を補うことで、著しい表現型が現れなかった可能性が考えられる。一方で、萌出した歯の歯根膜においては、細胞外基質の構成比・分布が変化したことで、歯根膜腔の拡大傾向や歯根膜細胞の配列がやや疎な傾向が認められたのではないかと考察している。今後、*PLAP-1*^{-/-}マウスの歯周組織における各種細胞外基質の免疫組織化学的な検討ならびに定量的な評価を行うことは、興味深い研究課題の1つである。

ノックアウトマウスにおいては、Targeting vector の設計によりトランケートされたタンパクが発現し、部分的に機能を持つ、あるいはドミナントネガティブとして作用することがある。今回作製した *PLAP-1*^{-/-}マウスにおいては、翻訳開始コドンの存在する第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換しており、mRNA の転写がネオマイシン耐性遺伝子の前の PolyA で停止するため、トランケートされたタンパクや mRNA による表現型への影響はほとんどないものと考えられる。また、マウス *PLAP-1* 遺伝子の存在する13番染色体上には *PLAP-1* 遺伝子を含む領域に *Cenpp centromere protein P* というもう1つの遺伝子が存在するが、同遺伝子のエクソンは *PLAP-1* 遺伝子の領域には存在しないため、同遺伝子による表現型への影響も否定される。

細胞外基質は組織の構造を形づくり、その強度を担うのみならず、様々なサイトカイン、増殖因子を捕らえ、状況に応じて放出することで、細胞動態を制御し、多様な生命現象に関わっている^{1, 2)}。細胞外基質の1つである *PLAP-1* は、これまでに BMP-2 や TGF- β の機能を制御することが明らかとなっている。そこで、マウスの胎生期において全身の硬組織とその周囲に *PLAP-1* の発現を認めること²⁰⁾、歯根膜細胞と比較して MEFs の樹立が容易であること、MEFs は骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞等への分化能を有し²¹⁻²⁴⁾、様々な遺伝子改変マウスの細胞学的特性の解析に用いられていることから²⁵⁻²⁷⁾、本研究においては *PLAP-1*^{-/-}マウス由来の MEFs を用いて、骨芽細胞分化に重要な役割を担っている BMP-2、および組織の恒常性維持や創傷治癒・組織再生過程で重要な役割を持つと考えられる FGF-2 と *PLAP-1* との相互作用に着目し、詳細な解析を行った。*PLAP-1*^{-/-}MEFs においては、骨芽細胞分化関連遺伝子 *Osterix* の発現上昇を認めた。我々のこれまでの研究から、*PLAP-1* は歯根膜細胞において BMP-2 の機能を制御することで、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を抑制していることが示されている⁷⁻⁹⁾。そこで *PLAP-1*^{-/-} MEFs を *Osterix* の上流のサイト

カインである BMP-2 で刺激したところ、BMP-2 誘導性の骨芽細胞分化が亢進していることが明らかとなり、PLAP-1 が骨芽細胞分化にも関与している可能性が示された。これらのことから、胎生期において、PLAP-1 が軟骨・骨原器周囲に発現し、BMP-2 の作用を抑制することで、骨芽細胞への分化を制御している可能性が考えられる。

一方、*PLAP-1*^{-/-}MEFs において、FGF-2 に対する反応性の低下が認められることが明らかとなり、PLAP-1 が FGF-2 の機能を正の方向へ制御することが示された。FGF-2 は胎生期から成体を通じて様々な組織で幅広い発現を示し、強力な間葉系細胞の増殖誘導作用および血管新生作用を持つほか、組織の創傷治癒、骨・軟骨の形成や、中枢神経系の発生・恒常性維持に関与するなど多彩な作用を有している¹⁰⁻¹⁴。したがって PLAP-1 と FGF-2 の発現局在が重なる部位では、PLAP-1 がこれら FGF-2 の作用を促進的に制御している可能性が示唆され、*PLAP-1*^{-/-}マウスにおいて、FGF-2 の機能に関連した表現型がみられる可能性が想定される。PLAP-1 は、成体においては歯根膜で高い発現を認めるほか、関節軟骨、骨膜、脂肪組織、腸管においてもその発現が認められることから、これらの組織における詳細な解析が今後必要になるものと考えられる。

本研究では、マウス歯根膜細胞株 MPDL22 においても、内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現抑制により FGF-2 に対する反応性が低下することを明らかにした。歯根膜細胞においては、FGF-2 刺激により、FGF-2 濃度依存的にヒアルロン酸の産生が促進され、培養上清中により高分子量のヒアルロン酸が認められることが報告されている⁴⁰。ヒアルロン酸の合成が創傷治癒の初期に認められることや⁵¹、外来性に高分子量のヒアルロン酸を投与することで組織の修復が促進されることなどから^{52, 53}、FGF-2 により誘導される局所でのヒアルロン酸の産生が、歯根膜細胞の遊走や初期の創傷治癒過程に重要な役割を果たし、歯周組織の再生に促進的に働くことが示唆されている¹⁹。また、FGF-2 刺激により高分子量のヒアルロン酸合成に関与する酵素である *Has1*、*Has2* の発現が誘導される⁴⁰。本研究において内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現抑制により、FGF-2 が誘導する歯根膜細胞の増殖能の低下、*Has1* 発現の低下を認めたことから、FGF-2 によるヒアルロン酸合成を介した歯周組織の再生において、PLAP-1 が FGF-2 の作用を増強することで歯周組織再生を促進する可能性が考えられる。

PLAP-1 と FGF-2 の結合能を免疫共沈法にて検討した結果、PLAP-1 は FGF-2 と直接結合し、さらに FGF-2 の FGFR1 への結合能を増強することが示唆された。PLAP-1 が FGF-2 と直接結合し、FGF-2 の FGFR1 への結合能を増強するメカニズムについては更なる解析が必要であるが、これまでの報告をもとに以下のような考察が可能である。発生期において頭部神経堤の形成に重要な役割を果たす細胞外基質である Anosmin は、嗅覚低下および性腺機能低下を伴う疾

患である Kallmann 症候群の原因遺伝子と考えられ、細胞外で FGF-8 と直接結合し、その FGFR1 への結合能を増強するという報告がある⁵⁴⁾。PLAP-1 と Anosmin との共通点は、ともに FGF と結合し、FGFR とは結合しない点である。すなわち、分子同士が結合することにより、タンパクの電荷および立体構造の変化が受容体との親和性に関与している可能性が考えられる。FGF-2 は塩基性の電荷を持ち⁵⁵⁾、また PLAP-1 の N 末端領域に存在するアスパラギン酸の連続配列は酸性の電荷をもつと考えられる⁵⁶⁾。すなわち、FGF-2 と PLAP-1 が直接結合することで、タンパク電位の変化が誘導され、FGFR との結合能が上昇するのではないかと考察している。また、PLAP-1 の属する SLRP family class I はコアタンパクの中央部の LRR 領域で、他のタンパクと分子間相互作用することが知られている。Decorin は、LRR4-5 領域で Collagen type I と、LRR12 領域で CTGF と結合することが報告されている^{57, 58)}。また、我々は PLAP-1 が BMP-2 と PLAP-1 中央部の 10 個の LRR のうち、LRR5 領域を介して結合することを明らかとしている⁸⁾。さらに、Decorin の LRR5 ペプチドが、FGF-2 の誘導する血管内皮細胞の遊走ならびに管腔形成を阻害するという生物学的活性を有することも報告されている⁵⁹⁾。そのため、PLAP-1 と FGF-2 との結合に関しても、PLAP-1 の LRR5 領域が関与している可能性が高いと考えている。今後、LRR5 の合成ペプチドを用いて、結合部位についての詳細な解析を行っていく予定である。

本研究においては、細胞外での PLAP-1 と FGF-2 の分子間相互作用について検討を行った。一方、Decorin がシグナル分子として働き、low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) 受容体に結合し、TGF- β シグナルの調節制御に関わるという報告もなされている^{60, 61)}。このことから、細胞表面上に PLAP-1 特異的な受容体が存在し、PLAP-1 がリガンドとして作用することで、FGF-2 シグナルと協調的に働いている可能性も考えられる。今後、この仮説を検証するために、PLAP-1 受容体の探索や、PLAP-1 による細胞内シグナル伝達の可能性など詳細な解析が必要となる。

最後に、歯周組織における PLAP-1 の機能について考察する。PLAP-1 は歯根膜において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 (図 9A)。また、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 (図 9B)。今後、PLAP-1 と FGF-2 のタンパクレベルでの結合部位の同定や、*PLAP-1* マウスの表現型についての更に詳細な解析を行うことで、歯根膜の特異性の解明や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と期待される。

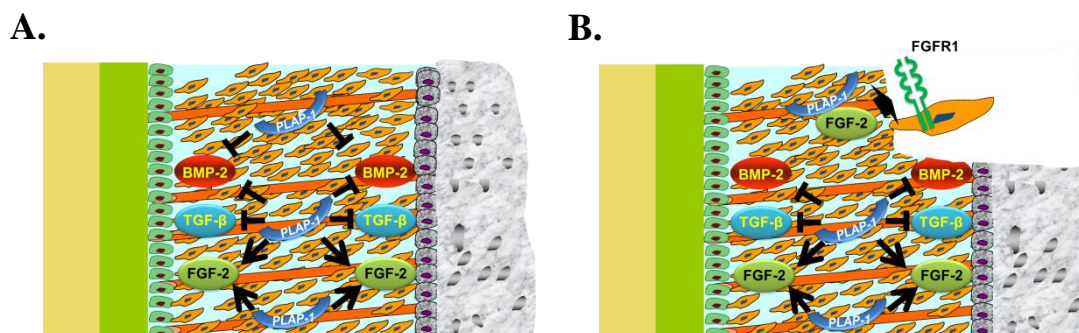


図 9. PLAP-1 の歯根膜における機能（仮説）

- A. PLAP-1 は歯根膜において恒常的に発現し、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、歯根膜の恒常性を維持している。
- B. 歯周組織再生時など、FGF-2 が強く働く局面で、PLAP-1 は FGF-2 の機能を促進し、歯根膜細胞の増殖・遊走を促して、歯周組織再生に促進的に働く。

結論

本研究結果より以下の結論を得た。

1. *PLAP-1*^{-/-}マウスの樹立に成功した。*PLAP-1*^{-/-}マウスは胎生期において歯胚の発生過程に異常を認めず、正常に生まれた。生後 8 週齢の *PLAP-1*^{-/-}マウスの歯は形態学的異常を認めず、一方、歯周組織においては歯根膜腔の拡大傾向を認めた。
2. *PLAP-1*^{-/-}MEFs において、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を認めた。
3. *PLAP-1*^{-/-}MEFs に PLAP-1 を発現させることで、FGF-2 に対する反応性の亢進を認めた。
4. 内在性 *PLAP-1* 遺伝子の発現を抑制した MPDL22 株において、FGF-2 に対する反応性の低下を認めた。
5. PLAP-1 は FGF-2 と直接結合し、FGF-2 の FGFR1 への結合能を増強した。

すなわち、PLAP-1 が FGF-2 の機能を促進的に制御していることが示唆された。

将来的には、歯周外科治療時に PLAP-1 を FGF-2 とともに歯槽骨欠損部へ局所投与することにより、FGF-2 による歯周組織再生誘導効果を促進するなど、再生医療分野への応用が期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の進行にあたり直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座、山田 聡講師に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Hynes RO: The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, **326**, 1216-1219 (2009).
- 2) Lu P, Weaver VM, Werb Z: The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, **196**, 395-406 (2012).
- 3) Lallier TE, Yukna R, Moses RL: Extracellular matrix molecules improve periodontal ligament cell adhesion to anorganic bone matrix. *J Dent Res*, **80**, 1748-1752 (2001).
- 4) Dangaria SJ, Ito Y, Walker C, Druzinsky R, Luan X, Diekwisch TG: Extracellular matrix-mediated differentiation of periodontal progenitor cells. *Differentiation*, **78**, 79-90 (2009).
- 5) Trombetta JM, Bradshaw AD: SPARC/osteonectin functions to maintain homeostasis of the collagenous extracellular matrix in the periodontal ligament. *J Histochem Cytochem*, **58**, 871-879 (2010).
- 6) Yamada S, Murakami S, Matoba R, Ozawa Y, Yokokoji T, Nakahira Y, Ikezawa K, Takayama S, Matsubara K, Okada H: Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene*, **275**, 279-286 (2001).
- 7) Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa K, Ikegawa S, Saito M, Toyosawa S, Murakami S: PLAP-1/asporin, a novel

- negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem*, **282**, 23070-23080 (2007).
- 8) Tomoeda M, Yamada S, Shirai H, Ozawa Y, Yanagita M, Murakami S: PLAP-1/asporin inhibits activation of BMP receptor via its leucine-rich repeat motif. *Biochem Biophys Res Commun*, **371**, 191-196 (2008).
 - 9) Yamada S, Kitamura M, Murakami S: PLAP-1: A novel molecule regulating homeostasis of periodontal tissues. *Japanese Dental Science Review*, **44**, 137-144 (2008).
 - 10) Broadley KN, Aquino AM, Woodward SC, Buckley-Sturrock A, Sato Y, Rifkin DB, Davidson JM: Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest*, **61**, 571-575 (1989).
 - 11) Tsuboi R, Rifkin DB: Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *J Exp Med*, **172**, 245-251 (1990).
 - 12) Coffin JD, Florkiewicz RZ, Neumann J, Mort-Hopkins T, Dorn GW, 2nd, Lightfoot P, German R, Howles PN, Kier A, O'Toole BA, et al.: Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol Biol Cell*, **6**, 1861-1873 (1995).
 - 13) Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y: Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med*, **9**, 604-613 (2003).
 - 14) Zechel S, Werner S, Unsicker K, von Bohlen und Halbach O: Expression and functions of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in hippocampal formation. *Neuroscientist*, **16**, 357-373 (2010).
 - 15) Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T, Okada H: Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res*, **34**, 425-430 (1999).
 - 16) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H: Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res*, **38**, 97-103 (2003).

- 17) Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, Fujii T, Shimauchi H, Sasano T, Furuuchi T, Fukuda M, Noguchi T, Shibutani T, Iwayama Y, Takashiba S, Kurihara H, Ninomiya M, Kido J, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Hara Y, Izumi Y, Hirofuji T, Imai E, Omae M, Watanuki M, Murakami S: Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS One*, **3**, e2611 (2008).
- 18) Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Kido J, Nagata T, Kurihara H, Takashiba S, Sibutani T, Fukuda M, Noguchi T, Yamazaki K, Yoshie H, Ioroi K, Arai T, Nakagawa T, Ito K, Oda S, Izumi Y, Ogata Y, Yamada S, Shimauchi H, Kunimatsu K, Kawanami M, Fujii T, Furuichi Y, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Omae M, Yamada S, Watanuki M, Murakami S: FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res*, **90**, 35-40 (2011).
- 19) Murakami S: Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol 2000*, **56**, 188-208 (2011).
- 20) Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrughe B, Hook M, Mayne R: 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).
- 21) Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ: Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell*, **2**, 331-341 (2002).
- 22) Lengner CJ, Lepper C, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB: Primary mouse embryonic fibroblasts: a model of mesenchymal cartilage formation. *J Cell Physiol*, **200**, 327-333 (2004).
- 23) Kishimoto K, Kato A, Osada S, Nishizuka M, Imagawa M: Fad104, a positive regulator of adipogenesis, negatively regulates osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **397**, 187-191 (2010).
- 24) Saeed H, Taipaleenmaki H, Aldahmash AM, Abdallah BM, Kassem M: Mouse embryonic fibroblasts (MEF) exhibit a similar but not identical phenotype to bone marrow stromal stem cells (BMSC). *Stem Cell Rev*, **8**, 318-328 (2012).

- 25) Kesavan K, Lobel-Rice K, Sun W, Lapadat R, Webb S, Johnson GL, Garrington TP: MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts. *J Cell Physiol*, **199**, 140-148 (2004).
- 26) Tang LY, Yamashita M, Coussens NP, Tang Y, Wang X, Li C, Deng CX, Cheng SY, Zhang YE: Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF-beta signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. *Emboj*, **30**, 4777-4789 (2011).
- 27) Aoyama M, Sun-Wada GH, Yamamoto A, Yamamoto M, Hamada H, Wada Y: Spatial restriction of bone morphogenetic protein signaling in mouse gastrula through the mVam2-dependent endocytic pathway. *Dev Cell*, **22**, 1163-1175 (2012).
- 28) Dahl LK: A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc Soc Exp Biol Med*, **80**, 474-479 (1952).
- 29) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254 (1976).
- 30) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 31) Miyazono K, Miyazawa K: Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE*, **2002**, pe40 (2002).
- 32) Katagiri T, Imada M, Yanai T, Suda T, Takahashi N, Kamijo R: Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells*, **7**, 949-960 (2002).
- 33) Korchynskyi O, ten Dijke P: Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem*, **277**, 4883-4891 (2002).
- 34) Schlessinger J: Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*, **306**, 1506-1507 (2004).
- 35) Bottcher RT, Niehrs C: Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev*, **26**, 63-77 (2005).
- 36) Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C: Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**, 233-247 (2005).
- 37) Cabrita MA, Christofori G: Sprouty proteins: antagonists of endothelial

- cell signaling and more. *Thromb Haemost*, **90**, 586-590 (2003).
- 38) Kim HJ, Bar-Sagi D: Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 441-450 (2004).
 - 39) Tsang M, Dawid IB: Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE*, **2004**, pe17 (2004).
 - 40) Shimabukuro Y, Ichikawa T, Takayama S, Yamada S, Takedachi M, Terakura M, Hashikawa T, Murakami S: Fibroblast growth factor-2 regulates the synthesis of hyaluronan by human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*, **203**, 557-563 (2005).
 - 41) Okamoto T, Yatsuzuka N, Tanaka Y, Kan M, Yamanaka T, Sakamoto A, Takata T, Akagawa Y, Sato GH, Sato JD, Takada K: Growth and differentiation of periodontal ligament-derived cells in serum-free defined culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **33**, 302-309 (1997).
 - 42) Takayama S, Murakami S, Nozaki T, Ikezawa K, Miki Y, Asano T, Terashima A, Okada H: Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, **33**, 315-322 (1998).
 - 43) Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV: Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*, **136**, 729-743 (1997).
 - 44) Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG, Young MF: Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet*, **20**, 78-82 (1998).
 - 45) Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P, Young MF: Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res*, **17**, 1180-1189 (2002).
 - 46) Zhang G, Chen S, Goldoni S, Calder BW, Simpson HC, Owens RT, McQuillan DJ, Young MF, Iozzo RV, Birk DE: Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan. *J Biol Chem*, **284**, 8888-8897 (2009).
 - 47) Chen XD, Fisher LW, Robey PG, Young MF: The small leucine-rich

- proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *Faseb j*, **18**, 948-958 (2004).
- 48) Hakkinen L, Strassburger S, Kahari VM, Scott PG, Eichstetter I, Lozzo RV, Larjava H: A role for decorin in the structural organization of periodontal ligament. *Lab Invest*, **80**, 1869-1880 (2000).
 - 49) Matheson S, Larjava H, Hakkinen L: Distinctive localization and function for lumican, fibromodulin and decorin to regulate collagen fibril organization in periodontal tissues. *J Periodontal Res*, **40**, 312-324 (2005).
 - 50) Tabata C, Hongo H, Sasaki M, Hasegawa T, Luiz de Freitas PH, Yamada T, Yamamoto T, Suzuki R, Yamamoto T, Oda K, Li M, Kudo A, Iida J, Amizuka N: Altered distribution of extracellular matrix proteins in the periodontal ligament of periostin-deficient mice. *Histol Histopathol*, (2013).
 - 51) Lammi PE, Lammi MJ, Tammi RH, Helminen HJ, Espanha MM: Strong hyaluronan expression in the full-thickness rat articular cartilage repair tissue. *Histochem Cell Biol*, **115**, 301-308 (2001).
 - 52) King SR, Hickerson WL, Proctor KG: Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery*, **109**, 76-84 (1991).
 - 53) Nakamura M, Hikida M, Nakano T: Concentration and molecular weight dependency of rabbit corneal epithelial wound healing on hyaluronan. *Curr Eye Res*, **11**, 981-986 (1992).
 - 54) Endo Y, Ishiwata-Endo H, Yamada KM: Extracellular matrix protein anosmin promotes neural crest formation and regulates FGF, BMP, and WNT activities. *Dev Cell*, **23**, 305-316 (2012).
 - 55) Bohlen P, Baird A, Esch F, Ling N, Gospodarowicz D: Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5364-5368 (1984).
 - 56) Kajikawa T, Yamada S, Tauchi T, Awata T, Yamaba S, Fujihara C, Murakami S: Inhibitory Effects of PLAP-1/asporin on Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res*, (2014).
 - 57) Svensson L, Heinegard D, Oldberg A: Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5. *J Biol Chem*, **270**, 20712-20716 (1995).
 - 58) Vial C, Gutierrez J, Santander C, Cabrera D, Brandan E: Decorin interacts with connective tissue growth factor (CTGF)/CCN2 by LRR12

- inhibiting its biological activity. *J Biol Chem*, **286**, 24242-24252 (2011).
- 59) Sulochana KN, Fan H, Jois S, Subramanian V, Sun F, Kini RM, Ge R: Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis. *J Biol Chem*, **280**, 27935-27948 (2005).
- 60) Cabello-Verrugio C, Brandan E: A novel modulatory mechanism of transforming growth factor-beta signaling through decorin and LRP-1. *J Biol Chem*, **282**, 18842-18850 (2007).
- 61) Cabello-Verrugio C, Santander C, Cofre C, Acuna MJ, Melo F, Brandan E: The internal region leucine-rich repeat 6 of decorin interacts with low density lipoprotein receptor-related protein-1, modulates transforming growth factor (TGF)-beta-dependent signaling, and inhibits TGF-beta-dependent fibrotic response in skeletal muscles. *J Biol Chem*, **287**, 6773-6787 (2012).