



Title	PLAP-1の歯根膜における特異的発現とその遺伝子多型が歯根膜の機能に及ぼす影響
Author(s)	梶川, 哲宏
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58420
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	梶 川 哲 宏
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学 位 記 番 号	第 24501 号
学位 授 与 年 月 日	平成 23 年 3 月 25 日
学位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学 位 論 文 名	PLAP-1の歯根膜における特異的発現とその遺伝子多型が歯根膜の機能に及ぼす影響
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 村上 伸也 (副査) 教授 阪井 丘芳 講 師 松本 卓也 講 師 墓 哲郎

論文内容の要旨

【研究目的】

PLAP-1は当教室においてヒト歯根膜cDNAライブラリーより発見された歯根膜に高頻度に発現する新規分子である。我々はこれまでにPLAP-1がBMP-2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。歯根膜は歯と歯槽骨の2つの硬組織に囲まれ、Runx2やアルカリフォスファターゼ(ALPase)などの硬組織形成に関与する分子群を恒常的に発現しながらも、韌帯として軟組織の性質を維持しているユニークな組織である。これまでの研究成果より、PLAP-1は恒常的に歯根膜に強く発現することで、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を負に制御し、歯根膜の恒常性を維持する一役を担う分子であると我々は捉えている。このような性質を持つPLAP-1の発現局在について、マウスの歯胚を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析の結果、PLAP-1は歯の発生過程で帽状期以降の歯小嚢において特異的な発現を示すことが明らかとなっている。しかしながら、歯の発生過程におけるPLAP-1タンパクの発現に関する詳細は現在のところ不明なままである。一方、ヒトPLAP-1には、N末端のアスパラギン酸(D)の連続配列数が個人によって異なるという遺伝子多型が存在し、近年、同遺伝子多型が変形性関節症(OA)の発症リスクに関係するという報告がなされた。すなわち、OAの発症するオッズ比とPLAP-1のN末端のDの数には関連があり、特にDの数が14個のPLAP-1(D14型PLAP-1)を持つヒトは有意にOAを発症するリスクが高くなる。関節組織と歯根膜は、類似しており、関節軟骨の機能に影響を与えるPLAP-1の多型性が、歯根膜の機能にも影響を与える可能性は高い。そこで本研究では、歯の発生過程におけるPLAP-1の発現を明らかにするため、歯周組織及び歯胚の発生過程におけるPLAP-1タンパクの局在を解析した。さらに、PLAP-1遺伝子多型が歯根膜細胞の機能に及ぼす影響に注目し、解析を行った。

【材料および方法】

- 1) マウス歯周組織におけるPLAP-1タンパクの発現解析
6週齢のC57BL/6マウスを4%PFAにて灌流固定した後、歯および歯周組織を含む上顎骨を採取し、7.5%EDTAによる脱灰を行い、凍結切片法にて厚さ14μmの組織切片を作製した。抗PLAP-1抗体、ビオ

チン標識抗ヤギ抗体、アビジン・ビオチン複合体、DABを用いた酵素抗体反応により、切歯及び臼歯におけるPLAP-1タンパクの発現を解析した。同様に、歯胚がそれぞれ鐘状期、鐘状期後期に相当する胎生18.5日、生後1日のマウスを用いて組織切片を作製し、歯胚におけるPLAP-1タンパクの発現解析を行った。

2) D13型PLAP-1, D14型PLAP-1発現プラスミドの構築

2人の異なるドナーから単離したヒト歯根膜細胞より全RNAを採取し、cDNAを精製後、ヒトPLAP-1全長コード領域を增幅するプライマーを用いRT-PCRを行った。増幅されたPCR産物をクローニング用ベクターに挿入後、DNAシークエンス解析を行い、D13型、D14型PLAP-1のクローニングを行った。安定形質発現株作製のため、得られた各型PLAP-1のcDNAをp3xFLAG-CMV-14プラスミド（neomycin耐性、FLAGタグ付き）に挿入した。さらに、CAGプロモーター含有プラスミドpAxCAwtに各型PLAP-1のcDNAを挿入した。

3) 歯根膜細胞への遺伝子導入によるD13型、D14型PLAP-1の機能解析

当研究室にて樹立したマウス歯根膜細胞株MPDL22に各型PLAP-1発現ベクターをエレクトロポレーション法により導入し、G418含有選択培地にて培養することで、ヒトPLAP-1安定発現MPDL22株を樹立した。同細胞株を石灰化誘導培地（10%ウシ胎仔血清、10 mM β-グリセロリン酸、50 g/ml アスコルビン酸含有α-MEM）にて培養し、3日おきに培地を交換、アリザリンレッド染色により、石灰化物形成能を解析した。さらに、ヒトPLAP-1安定発現MPDL22株に対し、BMP-2刺激（100 ng/ml）を行い、48時間後、72時間後に誘導されるALPase活性を測定した。

4) D13型、D14型PLAP-1がBMP-2誘導性シグナル伝達に及ぼす影響の検討

各型PLAP-1発現ベクターをHEK293T細胞へ導入し、コンディションメディウム（CM）を作製した。同CMをMPDL22培養系に添加したのち、BMP-2刺激（100 ng/ml）を行い、誘導されるSmad1/5のリン酸化を抗Smad1/5リン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検討した。

5) D13型、D14型PLAP-1がBMP-2応答性の遺伝子発現、プロモーター活性に及ぼす影響の検討

各型PLAP-1含有CMをMPDL22培養系に添加したのち、BMP-2刺激（100 ng/ml）を行い、誘導される*Id·I*, *Bsp*の発現量をreal-time PCR法により検討した。マウス筋芽細胞C2C12に対し、BMP応答領域を組み込んだpSBEレポーターをトランسفェクションし、各型PLAP-1含有CMで前処理を行った後、BMP-2刺激（100 ng/ml）を行い、ルシフェラーゼ活性を測定した。

6) D13型、D14型PLAP-1とBMP-2との共免疫沈降解析

抗FLAG抗体結合ビーズに各型PLAP-1のCMを加え、PLAP-1-FLAGビーズ複合体を形成したのち、BMP-2を加え、免疫沈降を行った。これらをSDS-PAGEに展開し、抗BMP-2抗体を用いたウェスタンブロッティング法にてBMP-2の共沈の有無を解析した。

【結果】

1) マウス臼歯の歯周組織において、歯根膜特異的にPLAP-1タンパクの発現が認められた。歯胚の発生過程においては、鐘状期後期以降、将来歯根膜へ分化する歯小囊においてPLAP-1タンパクの発現が確認された。マウス切歯においても、歯根膜特異的にPLAP-1タンパクの発現を認め、特にその発現は切端側の成熟した歯根膜において上昇した。2) D13型と比較してD14型PLAP-1を安定発現させたMPDL22株は有意に石灰化物形成が抑制された。さらにBMP-2誘導性ALPase活性について、D13型と比較してD14型PLAP-1を安定発現させた株において、刺激後48時間で有意な抑制が認められた。3) BMP-2誘導性Smad1/5のリン酸化に与える影響は、D13型と比較してD14型PLAP-1がSmad1/5のリン酸化をより強く抑制した。4) BMP-2誘導性遺伝子*Id·I*, *Bsp*の発現およびpSBEのルシフェラーゼ活性に対する抑制作用は、D13型と比較してD14型PLAP-1がより強かった。5) 共免疫沈降解析の結果、D14型PLAP-1はD13型PLAP-1と比較してBMP-2とより強く結合することが明らかとなった。

【結論および考察】

PLAP-1タンパクは歯小囊に特異的に発現を認め、歯根膜の形成に関与することが示唆された。D14型PLAP-1はD13型PLAP-1よりも歯根膜の硬組織形成をより強く抑制することが明らかとなった。今後、さらなる解析を行うことで、PLAP-1遺伝子多型と歯周病疾患感受性の関連が明らかになると期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周組織において歯根膜特異的な発現を示すPLAP-1の歯胚の発生過程における発現パターン、さらにはPLAP-1遺伝子多型の生物学的意義について分子レベルで検討を行ったものである。

その結果、PLAP-1タンパクは歯の発生過程において歯小囊に限局して発現することが明らかとなった。またN末端のアスパラギン酸の連続数に関するPLAP-1遺伝子多型について、同連続数が14個のD14型PLAP-1は13個のD13型PLAP-1よりも、歯根膜細胞の硬組織形成をより強く抑制することが明らかとなった。

以上の知見は、歯の発生におけるPLAP-1の機能を明らかにするうえで有益な情報を提供し、またPLAP-1遺伝子多型が歯根膜の恒常性維持に影響を及ぼすという新たな知見を報告するものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。