様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２８　年　　６　月　２４　日現在

機関番号：　３２７１０
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2013～2015
課題番号：　２５４６３２３１

研究課題名（和文）歯根膜の初期破壊に関わる非コラーゲン性構造タンパク質について

研究課題名（英文）Non-collagenous proteins involved in an early destruction of periodontal ligament

研究代表者
深江　允（Fukae, Makoto）

鶴見大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：４００６４３７３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：歯周組織の歯根膜非コラーゲン性タンパク質（NCP）の分離精製、性質を調べることを目的とし、特に初期破壊に関連する110 kDa Stains-all色素陽性のタンパク質（SAPP)に注目した。
ブタ乳切歯歯根膜から各種溶液で歯根膜NCPを段階的に抽出して試料とした。110kDa SAPPはマス分析と免疫科学でデコリンであると同定した。ヘパリンカラムで精製したデコリンの画分には、hPDL細胞の細胞培養法とイライザ法でTGF-b1が存在することがわかった。これにより、炎症性変化で好中球エラスターゼがデコリンを分解すると、それに結合しているTGF-b１が遊離し、組織の修復に働くと考えられた。

研究成果の概要（英文）：It is shown that the early destruction feature of periodontal ligament (PDL) on periodontal disease is the degradation of the non-collagenous proteins (NCP) covered collagen bundles. The aim is the characterization of 110kDa Stains-all positive protein (SAPP) belonged to NCP, which is degraded first by the neutrophil elastase increased in the inflamed PDL.
The 110kDa SAPP was detected by Stains-all staining after SDS electrophoresis in the NCP extracted from porcine mandibles' deciduous incisor tooth PDL and identified to be decorin by MASS and immunochemical determination. The decorin purified by heparin affinity column was determined to bind the TGF-b1 by the cell culture system of hPDL cell and ELISA. On the periodontal disease, it is suggested that the degradation of decorin bound to the collagen bundles by the action of the neutrophil elastase releases the TGF-b 1 to reconstruct the injured PDL.

研究分野：　医歯薬

キーワード：　歯周病　歯根膜　好中球エラスターゼ　デコリン　トランスフォーミング成長因子ベータ　非コラーゲン性タンパク質

１．研究開始当初の背景

（１）歯周組織の破壊メカニズムを解明するために、臨床で歯周病に罹患し保存不可と診断された抜去歯の歯周組織を SEM で観察したところ、正常の歯根膜組織と比較して、炎症のある歯根膜組織ではコラーゲン線維がむき出しになっていた。これから、歯根膜の初期破壊はコラーゲン線維を被う非コラーゲン性タンパク質(NCP）の分解によって始まると考えられた。

（２）上記の試料でカゼイン、ゲラチンを基質としたザイモグラフィーで、プロテアーゼの動態を調べると、炎症組織には主にプロ MMP-9、プラスミノーゲン、好中球エラスターゼの三種類のプロテアーゼが増加していた。それらのプロテアーゼのうちブタ歯根膜 NCP を基質にしたザイモグラフィーでは、好中球エラスターゼのみの活性が検出されたので、好中球エラスターゼが歯根膜 NCP の分解に関わると判断された。市販の好中球エラスターゼによるブタ歯根膜 NCP の分解実験では、それらの中で、分子量 110 kDa の SAPP が特異的に分解されることが示された。

２．研究の目的

（１）歯周病の歯根膜の初期破壊はコラーゲン線維束を被う NCP の分解から始まるが、そのNCPに関する情報が少ないので、それらの構成成分を調べる。

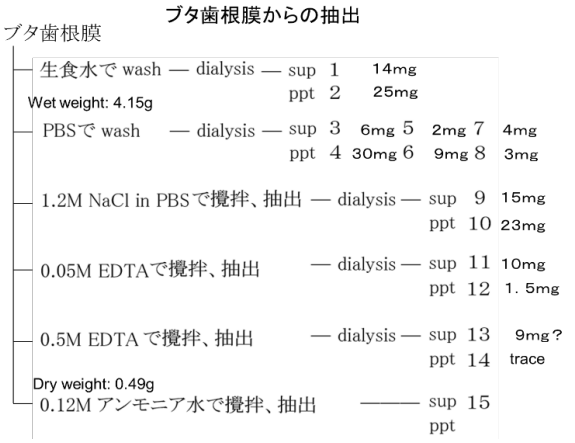
（２）ブタ歯根膜 NCP と市販の好中球エラスターゼとの分解実験で、110 kDa SAPP が特異的に分解されることがわかったので、このタンパク質の同定とその性質を調べることを目的とした。

３．研究の方法

ブタ正常歯根膜から変性剤下で NCP の抽出精製を試みたが、歯根膜 NCP は会合しやすく、抽出後の脱塩の過程で不溶化が起こり、精製はことごとく失敗した。そこで、まず、歯根膜に多量に含まれる不要な血液成分を取り除くことを考えた。

（１）健全ブタ乳切歯歯根から歯根膜を調整し、生理的食塩水で血液由来のタンパク質を緩やかに撹拌しながら洗浄除去し、その後も中性の PBS 溶液でさらに洗浄した。残った歯根膜固有の組織から高塩濃度溶液、次に EDTA 溶液、さらに pH10 のアンモニア溶液の順に段階的に抽出した。（図１）

図１



奇数の数字は抽出順序を表し、偶数はその抽出液を脱塩した際の不溶物を表す。mg の数字は湿重量 4.15g の試料から回収された乾燥重量を表している。

（２）上記の各画分を SDS 電気泳動後、CBB と Stains-all 色素での染色でモニターし、歯根膜 NCP として存在する複数の SAPP をゲルからきりだし、それらを質量分析にかけた。その結果を指標に、特異的抗体を使って免疫科学的にSAPPを同定する。

（３）目的の 110kDa SAPP はデコリンと同定されたので、さらに精製するためにヘパリンカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィで分画した。精製した画分は細胞培養法で生理活性を調べ、その生理活性の同定を行う。

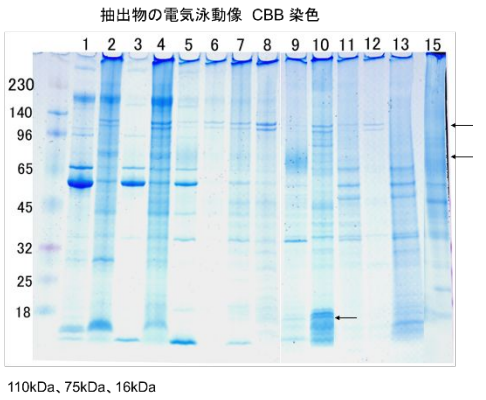
４．研究成果

（１）ブタ乳切歯の歯根膜から歯根膜組織固有の NCP の抽出で、歯根膜に多量に含まれる血液成分が歯根膜 NCP の分離を困難にしていたので、それらを生食水、さらに中性の PBS 溶液で洗浄、除去し、その後、コラーゲン線維にイオン結合していると思われる NCP を高塩濃度溶液で抽出、さらに Ca イオンを介して結合していると思われる NCP を EDTA 溶液で抽出した。目的の 110kDa SAPP はさらに弱アルカリ性溶液で pH をアルカリ性に振ることで抽出することができた。（図１）

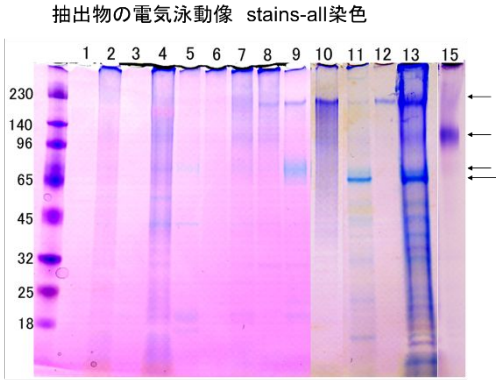
これで、目的のタンパク質を他の NCP をあまり含まない状態で抽出分離することができた。

各抽出画分は透析により脱塩、凍結乾燥し、SDS 電気泳動した後、CBB と Stains-all 染色でモニターした。（図２）CBB 染色像では生食水、PBS による洗浄画分にはアルブミンを含め、多数の血液由来成分が認められた。（図２－1～8）

図２



110kDa、75kDa、16kDa



220kDa、110kDa、75kDa、65kDa

血液成分を除去した後の試料から高塩濃度溶液、EDTA 溶液、アンモニア溶液で抽出された画分に多数の CBB で染まるタンパクバンドが認められるが、これらの画分において Stains-all 色素で青に染色されるタンパク質がコラーゲン線維に結合する NCP であると考えられた。（図２－9～15）電気泳動後のタンパクバンド(16 kDa、65kDa、75kDa、110kDa、220kD、ゲルに入らない高分子)を切り出し、質量分析を行った。（表１）

表１

マスの結果

- ゲルに入らない高分子
  :アグリカン、バーシカン、ビグリカン、ペリオスチン
- 220kDa :フィブロネクチン、ペリオスチン
- 110kDa :デコリン
- 75kDa :ルミカン
- 65kDa : オステオポンチン？
- 16kDa : ヒストン

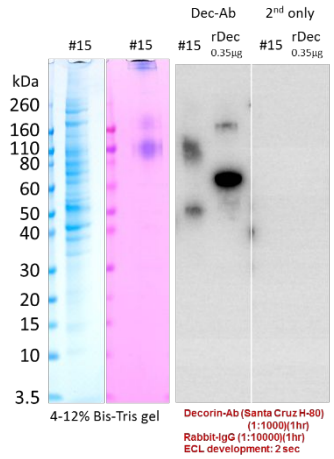
質量分析で、表のタンパク質以外に多数の血液由来タンパク質が検出されたが、それらは血液からの混入物としてデリートした。また、16 kDa の CBB では染まるが Stains-all で染まらないタンパクバンド（図２－10 画分）はヒストンであったので、その他に多数の細胞成分由来のタンパク質が混入していると考えられた。

歯根膜組織から NCP を抽出するのに、血液由来タンパク質ばかりでなく、多数の細胞成分が混入し、それがより一層 NCP の分離精製を困難にしていることが分かった。

（２）質量分析からアンモニア溶液で抽出した画分(図２の 15)に検出される 110kDa SAPP はデコリンである可能性が高いので、デコリン特異的抗体を調達して免疫科学的に調べた。（図３）

図３

デコリンの確認



110kDa SAPP を含む画分には、Stains-all 染色で分子量 110kDa の位置に青色に染まるタンパクバンドがデコリン抗体で染まるバンドと一致していることから、110kDa SAPP はデコリンであるとわかる。

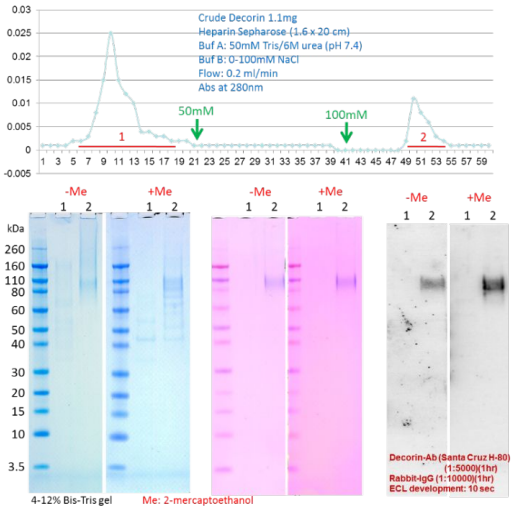
110kDa SAPP のデコリンのコラーゲン線維に対する結合の仕方は、図 1 に示す段階的抽出法によりイオン結合していると考えられるが、弱アルカリ性溶液による最終の段階で抽出されてくるので、他の NCP より強固に結合していると示唆された。

（３）歯根膜から抽出したデコリン画分には、コラーゲン由来と思われる分解産物が依然として含まれるので、さらに精製が必要であるが、コラーゲンとの分離にゲル濾過法は不適当と思われ、ヘパリンカラムを使ったアフィニティクロマトグラフで分画精製した。（図４）

歯根膜 PDL から抽出されたデコリン画分をヘパリンカラムにかけると、CBB に染色されるタンパク画分はカラムを素通りする（図３　画分 1）。目的の 110kDa SAPP はカラムに吸着し、塩濃度を 100mM に上げると溶出されてくる（図３　画分 2）。

ヘパリンカラムで精製した 110kDa SAPP は SDS 電気泳動後の CBB 染色で

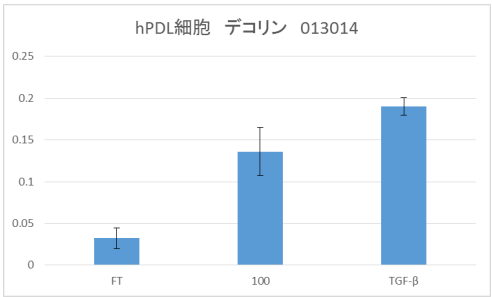
図４



わずかに混入物があるものの、Stains-all 染色では単一である。そのタンパクバンドはデコリン抗体に反応しているので、110kDa SAPP はデコリンであることが確かめられた。（図４）

（４）ヘパリンカラムで精製したデコリン画分は、細胞培養法でヒト歯根膜由来培養細胞(hPDL 細胞)を使って生理活性を調べると、アルカリホスファターゼ（ALP）活性を上昇させることがわかった。（図５）この結果により、デコリンの画分には生理活性物質が含まれると考えられる。

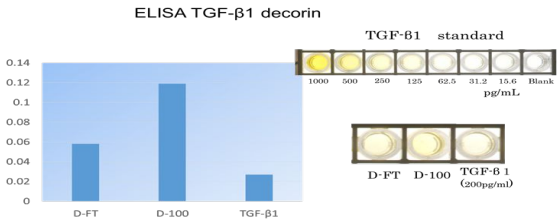
図５



FT は図４のカラムを素通りした画分１を、100 は画分２を表す。縦軸は ALP 活性の吸光度を示している。

生理活性物質の TGF-ｂは hPDL 細胞の細胞培養 ALP 活性を上昇させることがわかっていて（図５）、デコリン画分の場合と挙動が似ているので、この画分には TGF-ｂが含まれると考え、それを確かめるために TGF-ｂ1、2、3 の抗体を使って ELISA 法で同定した。（図６）

図６



D-FT は図３のヘパリンカラムを素通りした画分 1 を表す。D-100 は画分２を表し、溶出したデコリンの画分である。グラフは右下図の反応ウェルを数値化したものである。素通りの画分 D-FT にも TGF-b1 が存在するが、細胞培養（図５）で ALP 活性が低いのは、今のところ理由は不明である。

デコリン画分に存在する生理活性物質は TGF-b1 であることが判明し、それがデコリンの精製過程から、これらが複合体を形成していることが示唆され、TGF-b1 はデコリンに結合したまま生理活性を表すと考えられた。

（５）歯周病の初期段階の歯根膜では 3 種類のプロテアーゼが増加し、コラーゲン線維が分解されるのではなく非コラーゲン性タンパク（NCP）が始めに壊れる（文献 1）。その分解に関わるのが好中球から遊離される好中球エラスターゼで、NCP の一つである分子量 110 kDa のデコリンを特異的に分解する。

重要なことはこのデコリンの歯根膜における存在状態で、一般的にデコリンはコラーゲン線維と複合体を形成していることが知られている（文献 2）が、歯根膜からの NCP の溶出挙動からデコリンがコラーゲン線維に直接イオン結合している結果がえられたので、歯根膜でもデコリンはコラーゲンと複合体を形成していると考えられる。歯根膜ではこの複合体にさらに他の NCP が結合して歯根膜全体の強度を保っていると考えられ、その割合は約二割ほどである（文献３）。デコリンはコラーゲン線維と NCP を繋ぐキイプロテインとしての役割がある。そのキイプロテインのデコリンを好中球エラスターゼが最初に分解するとすれば、コラーゲン線維と結合して歯根膜の支持に関わる NCP が容易に破壊され、NCP が関与する歯根膜の支持が急激に失われる。歯根膜 NCP によって、組織内に不動化されていた水は流動化し、細菌の侵入を容易にさせ、さらにむき出しになっているコラーゲン線維をプロテアーゼが直接分解できるようになり、症状が重傷化すると考えられる。

デコリンには、hPDL 細胞をつかった細胞培養法で ALP 活性を上昇させる活性があり、それが TGF-b1 であることがイライザ法で証明された。この生理活性はデコリンに結合していることが示唆され、既に発表されていることを支持するものであるが、歯根膜組織においては、炎症性変化により好中球エラスターゼがコラーゲン線維に結合しているデコリンを分解すると、それに結合している TGF-b が遊離し、それらが生理活性を働かせると考えられた。

歯根膜の NCP が破壊されると、TGF-b が遊離し、組織の修復に働くと考えられた。

＜引用文献＞

① Ujiie Y, Oida S, Gomi K, Arai T, Fukae M, Neutrophil elastase is involved in

the initial destruction of human periodontal ligament, J Periodont Res 42, 2007, 325-330
② Shonherr E, Broszat M, Brandan E, Bruckner P, Kresse H, Decorin core protein fragment Leu155-Val260 interacts with TGF-beta but does not compete for decorin binding type 1 collagen, Archives of Biochenistry and Biophysics 355(2), 1998, 241-248
③ Ujiie Y, Shimada A, Komatsu K, Gomi K, Arai T, Fukae M, Degradation of noncollagenous components by neutrophil elastase reduces the mechanical strength of rat periodontal ligament, J Periodont Res 43, 2008, 22-31

５．主な発表論文等

無し

６．研究組織

(1)研究代表者

深江　允（FUKAE, Makoto）
鶴見大学・歯学部・名誉教授
研究者番号：４００６４３７３

(3)連携研究者

山越　康雄（YAMAKOSHI, Yasuo）
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号：２０１８２４７０

唐木田　丈夫　(KARAKIDA, Takeo)
鶴見大学・歯学部・学内講師
研究者番号：４０３６７３０５

(4)研究協力者

木下　冴子（KINOSHITA, Saeko）