

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792490

研究課題名（和文） ペリオスチンを用いた新たな再生療法の開発

研究課題名（英文） Development of new periodontal tissue regeneration on therapy With periostin.

研究代表者

掛川 文子（KAKEGAWA AYAKO）

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：70514280

研究成果の概要（和文）：ペリオスチンはオルタネイティブスプライシングにより 4 種類のバリエーションおよびアイソフォームを有しており、骨、骨格筋、心臓、歯周組織などに存在する細胞外マトリックスである。近年では、機能障害を起こした組織の再生を促進するとも報告されている。本研究は、再生療法にペリオスチンを利用することを目的として行った。ブタ歯根膜よりペリオスチンを抽出し、LC/MS/MS およびウェスタンブロットでの検出に成功した。そして、ヒト歯根膜細胞での遺伝子レベルでの発現を確認した。

研究成果の概要（英文）：Through alternative splicing, periostin exists in four different variants and isoforms, and is part of the extracellular matrix of bone, skeletal muscle, and periodontal tissues. In recent years, it has been reported to facilitate the revitalization of dysfunctional tissues. This research was carried out with the goal of using periostin for regenerative treatment. Periostin was extracted from the periodontal membrane of pigs and successfully detected with LC/MS/MS and western blot analysis. Next, its expression was confirmed at the genetic level in human periodontal membrane cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：ペリオスチン・アイソフォーム・歯周組織再生・歯根膜・スプライシングバリエーション

1. 研究開始当初の背景

歯周組織の再生には、歯肉→歯肉線維芽細胞、歯槽骨→骨芽細胞、セメント質→セメント芽細胞、歯根膜→歯根膜細胞が必要である。そして、これらの細胞の供給には歯根膜由来の未分化間葉系の細胞が必要である。したがって、すべてのソース源となる歯根膜の再生こそが歯周組織再生において必要不可欠で

あるといえる。そこで我々は、歯根膜の発生や恒常性の維持、創傷治癒過程に深く関与している(Rios et al. J periodontol 2009)ペリオスチンに着目し、歯周組織の発生分化や創傷治癒を模倣した新たな歯周組織再生療法を提案する。

ペリオスチンは 1999 年に歯根膜で発見された細胞外マトリックスである。近年では、胚

発生過程、創傷治癒、心筋梗塞、癌、などに関与することも判明している。(Kruzynska-Freitag A et al. Mech Dev 2001, Norris RA et al. J Cell Biochem 2007, Fukushima N et al. Mod Pathol 2008.) ヒトペリオスチンには、4つのスプライシングバリエーションおよびスプライシングバリエーション由来したアイソフォームの存在も判明している。(図1)

しかしながら、バリエーションおよびアイソフォームの機能の詳細は未だ不明である。再生療法への応用を目的とした研究では、ペリオスチンのリコンビナントタンパク質を心筋細胞に作用させることにより、心室のリモデリングと心筋機能が改善されたとの報告がされている。(Shimazaki M et al, J Ext Med 2008)

また、心筋梗塞急性期に強く発現が認められるバリエーション3由来したアイソフォーム3(リコンビナントタンパク質)を導入したところ、心筋線維細胞の増加および心破裂の発症頻度の改善が見られた。(Kuhn B et al. Nat Med 2007)

このように心筋再生の報告がされており、機能障害を起こした組織の再生に関与する事が示唆される。

2. 研究の目的

近年の細胞工学の進化により、再生医療には幹細胞、グロースファクターなどが用いられるようになった。しかしながら、これらは医療費が高額であり、多くの人々が医療の提供を受けることが困難である。また、作用機序が不明なことからも安全性が疑問視される。

歯周疾患は、日本国民の8割が罹患している生活習慣病である。歯周組織再生療法の需要は高い。このことから、歯周組織再生療法に求められるものは安全かつ効率的に行えて、安定した治療成績を持つこと、手頃なコストで多くの人々に受け入れられるものではなくてはならない。また、歯周組織は硬組織と軟組織が混在した複雑な組織であり、新世代の歯周組織の再生療法の開発には難航を示している。

過去に歯周組織再生に用いられた材料は、自家骨、PRP、エムドゲインなどの生体由来のものがほとんどである。自家骨移植は自家骨の採取、PRPでは自己血の採取を行わなければならない、患者への侵襲が大きい。

また、エムドゲインではブタ由来であることから、安全面において未知の危険性を含んでいる。しかしながら、本研究で用いるペリオスチンは、リコンビナントタンパク質として作成することから、製品の大量生産、品質の均一化を図ることが可能である。

インスリンなど数多くのリコンビナントタ

ンパク質製剤が普及していることから安全性は極めて高い。そして、ペリオスチンが歯根膜由来のタンパク質であるため、術後に副作用を起こす可能性が極めて低い。

以上のことから、このペリオスチンは新たな再生材料としての多大な可能性を有している。

本研究では、心筋と同じく伸展する性質を持ち、歯周組織の再生には必要不可欠である歯根膜の再生を期待して、ペリオスチンを用いることを発案した。

我々の研究室が確立した歯根膜細胞の分化誘導システムを利用して、各バリエーションの遺伝子発現を確認し、発現の認められたバリエーション由来のアイソフォームを作成し、歯根膜細胞への分化誘導能を検索する。

3. 研究の方法

ペリオスチンのタンパクレベルでの検出：基礎実験としてブタを用いてペリオスチンの抽出および同定を行った。ペリオスチンの検出にはLC/MS/MSを用いた。LC/MS/MSでは、タンパク質をトリプシン処理を行い、断片ペプチド化する。その後、逆相HPLCで分離・濃縮し、質量分析計で検出する。質量分析計により得られたペプチドの質量、および質量分析計内で得られたフラグメントをデータベース検索することによりタンパク質を同定する。

定量的PCR法：ヒト歯根膜細胞を硬組織形成誘導培地にて培養し、ペリオスチンの4種のバリエーションの発現をライトサイクラーを用いて定量的に測定する。

リコンビナントタンパク質の作成：大腸菌および酵母を用いて、ペリオスチンアイソフォームを作成する。

バイオアッセイ：ALP活性

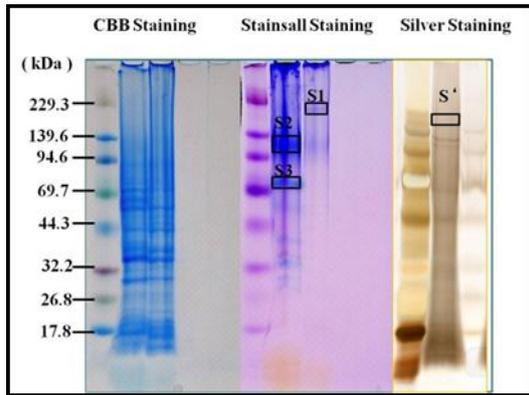
ALPは硬組織形成の代表的なマーカーである。ALPを指標として、ヒト歯根膜細胞に対する各種ペリオスチンアイソフォームの硬組織形成誘導能を比較検討する。

硬組織分化および細胞内シグナル伝達に関する遺伝子の定量的解析：硬組織分化および細胞内シグナル伝達に関する遺伝子の発現を調べるため、ヒト歯根膜細胞を合成ペリオスチンアイソフォームにより刺激した後、経時的にトータルRNAを抽出しRT-PCRおよびライトサイクラーを用いた定量的PCRを行う。

4. 研究成果

ブタ歯根膜より抽出したタンパク質をSDS-PAGEにより確認し、図1に示すタンパクバンドをLC/MS/MS分析を行った。その結果、90KDa付近のタンパク質バンドよりペリオスチンを検出した。(図1, 2)

(図1) ブタ歯根膜抽出物の SDS-PAGE
S1, S2, S3, S' : 各種タンパクバンドを
LC/MS/MSにて分析を行った。

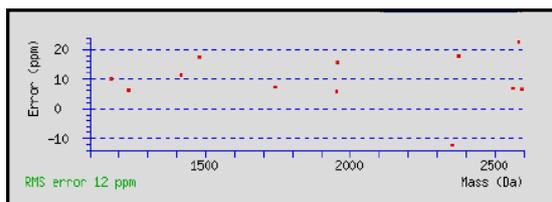
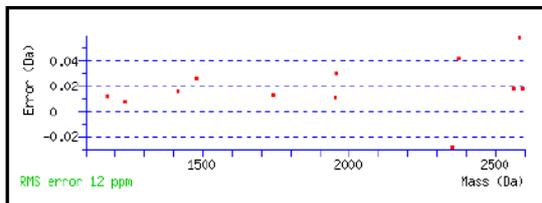


(図2) S2の LC/MS/MSの結果
ペリオスチンのアミノ酸配列に一致する断
片を検出することができた。

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta
36 - 53	652.35	1954.02	1954.01	0.01
38 - 53	871.46	1740.90	1740.88	0.01
91 - 115	866.13	2595.37	2595.35	0.02
130 - 151	854.40	2560.18	2560.16	0.02
211 - 228	489.78	1955.10	1955.07	0.03
229 - 251	862.12	2583.33	2583.27	0.06
252 - 265	708.90	1415.78	1415.76	0.02
350 - 371	792.12	2373.33	2373.29	0.04
438 - 448	617.83	1233.64	1233.64	0.01
555 - 575	589.33	2353.29	2353.32	-0.03
576 - 586	587.83	1173.65	1173.64	0.01
765 - 778	493.93	1478.77	1478.75	0.03

Miss Sequence

1	R.GRDQGNVICALQQILGTR.K	Carbamidomethyl (C)	(Ions score 45)
0	R.DQGNVICALQQILGTR.K	Carbamidomethyl (C)	(Ions score 55)
0	K.GCFVAVLPIDHVGTLGIVGATTQR.Y	Carbamidomethyl (C)	(Ions score 28)
1	K.GSFYTFAPSNQAWNLDSIDRR.G		(Ions score 31)
0	R.IHNSQIATGVVIVDIR.V		(Ions score 13)
0	R.VLTIQSTSIQDFIARDDLSFR.A		(Ions score 5)
0	R.ARAITSDLESIGR.D		(Ions score 32)
0	K.DIVTNGSVIHLIDQVLPDSAR.Q		(Ions score 24)
0	K.VGLNELYNGQK.L		(Ions score 52)
1	R.DKNALQNIILYHLTPGVFGR.G		(Ions score 7)
0	K.GFEPGVINILK.T		(Ions score 21)
1	R.ISTSGEETEELKK.L		(Ions score 3)



歯根膜のタンパク成分として、ペリオスチン

以外に以下のタンパクが検出された。

(S1 sample)

Sample No.	Protein	gene	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession
S1-1	Decorin	DCN	39,899	485	41	54	Q9XSD9
2	Serum albumin	ALB	69,692	392	21	39	P08835
3	Annexin A2	ANXA2	38,534	330	23	63	P19620
4	annexin A6	ANXA6	75,708 (horse)	329	40	44	
5	Biglycan	BGN	41,775	320	13	41	Q8MK41
6	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	41,737	253	10	34	Q6QAA1
7	nucleolin	NCL	77,806 (cow)	242	17	20	
8	Annexin A4	ANXA4	35,829	229	12	41	P08132
9	Periostin, osteoblast specific factor	POSTN	87,091	198	12	25	D3K5K1
10	Annexin A5	ANXA5	36,134	190	16	41	

(S2 sample)

Sample No.	Protein	gene	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession
S2-1	annexin A6	ANXA6	75,708 (horse)	97	15	22	
2	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	41,737	93	4	14	Q6QAA1
3	Annexin A2	ANXA2	38,534	87	10	36	P19620
4	Serum albumin	ALB	69,692	67	6	10	P08835
5	60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	34,359	59	6	24	Q29214
6	heterochromatin protein 1, binding protein 3	HP1BP3	61,033	59	4	6	
7	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	SERPINH1	46,477 (cow)	57	3	9	
8	myosin-9 [Canis lupus familiaris]	MYH9	226,328 (dog)	54	16	9	
9	Decorin	DCN	39,899	50	2	7	Q9XSD9
10	PREDICTED: similar to smooth muscle myosin heavy chain 11 isoform SM2 isoform 8 [Canis familiaris]	MYH11	222,757 (dog)	50	7	3	

(S3 sample)

Sample No.	Protein	gene	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession
S3-1	Serum albumin	ALB	69,692	460	29	48	P08835
2	annexin A6	ANXA6	75,708 (horse)	311	55	49	
3	Annexin A2	ANXA2	38,534	243	18	57	P19620
4	annexin A5	ANXA5	36,134	192	14	39	
5	heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1 [Homo sapiens]	HSPA8	70,854	174	16	30	
6	similar to lumican	LUM	38,755	104	7	25	
7	PREDICTED: similar to heat shock protein 70 [Equus caballus]	HSPA6	70,781 (horse)	91	4	7	
8	Periostin, osteoblast specific factor	POSTN	87,091	91	5	9	D3K5K1
9	Lamin-A/C	LMNA	65,171	86	15	24	Q3ZD69
10	nucleolin	NCL	75,712 (dog)	82	9	12	

(S' sample)

Sample No.	Protein	gene	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession
1'-1	PREDICTED: collagen, type XII, alpha 1		339,150	341	56	19	
2	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	41,737	60	7	17	Q6QAA1

以上のことから、歯根膜には多種多様な非コラーゲン性タンパク質が存在することが判明した。ペリオスチンが本来の分子量より

も大きなタンパクバンドに存在することから、ペリオスチンが他のタンパクに結合しているもしくはダイマー形成している可能性が示唆された。

しかしながら、期間内での各種ペリオスチンアイソフォームを検出できなかった。

遺伝子レベルでも、スプライシングバリエントに大きな違いが認められず安定した結果を得ることができなかった。

引き続き、アイソフォームの検出を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

掛川 文子 (KAKEGAWA AYAKO)
鶴見大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号：70514280

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし