

〔原著〕

## ヒト歯根膜由来線維芽細胞のメカニカルストレスによる fibrillin-1およびversicanの発現と局在の変化

鳥谷奈保子<sup>1)</sup>, 永坂 萌<sup>1)</sup>, 敦賀 英知<sup>3)</sup>, 坂倉 康則<sup>2)</sup>, 溝口 到<sup>1)</sup>

1) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

2) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系解剖学分野

3) 福岡歯科大学生体構造学講座機能構造学分野

## Changes in expression and localization of fibrillin-1 and versican in human periodontal ligament fibroblast (HPLF) s induced by mechanical stimulation

Naoko TORIYA<sup>1)</sup>, Moe NAGASAKA<sup>1)</sup>, Eichi TSURUGA<sup>3)</sup>,  
Yasunori SAKAKURA<sup>2)</sup>, Itaru MIZOGUCHI<sup>1)</sup>1) Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development,  
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

2) Division of Anatomy, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

3) Section of Functional Structure, Department of Morphological Biology, Division of Biomedical Sciences, Fukuoka Dental College

### Abstract

The periodontal ligament (PDL) is a specialized fibrous connective tissue that functions as a splinting and supporting tissue for teeth and as a shock-absorber for forces exerting strain on the teeth. The purpose of the present study is to clarify the response of extracellular matrix molecules of the PDL to mechanical stress exerted by occlusal forces. Human periodontal ligament fibroblasts (HPLF) were used and mechanical stress (monoaxial stretching) was applied for 7 days, and HPLF cultured without stretching were used for controls. The mRNA expression and localization of fibrillin-1 and versican in the HPLF were examined by quantitative RT-PCR and immunohistochemically, respectively. The expression of fibrillin-1 and versican mRNA

increased 3.6 and 6.8 times, respectively in the stretch group over those of the control group. Especially, the mRNA expression of the V1 isoform, lacking the GAG- $\alpha$  domain, was considerably increased in the stretch group. Immunohistochemical staining for fibrillin-1 indicated that HPLF under stretching showed a mesh-like staining, which increased the stained area and intensity and converged perpendicular to the stretching direction. Staining of versican was observed to be very similar to fibrillin-1, and the staining was more intense than that of the control group. These results indicate that mechanical stress may be involved in remodeling and maintaining PDL via regulation of the expression and assembly of fibrillin-1 and versican.

**Key words :** 歯根膜, 線維芽細胞, fibrillin-1, versican, メカニカルストレス

### 緒 言

歯根膜は、咀嚼筋、舌筋、口腔周囲筋などが惹起する機能力に絶えず曝されており、機能力の緩衝、歯の固定・支持構造として機能している (Edwards, 1968 ; Full-

mer et al., 1974)。歯根膜は線維芽細胞、骨芽細胞や破骨細胞などの細胞成分とコラーゲン線維、弾性系線維やプロテオグリカンなどの細胞外基質成分から構成されている。歯根膜にみられる主要な線維性基質はコラーゲン線維と弾性系線維であり、弾性系線維は歯周組織、大動

受付：平成25年3月28日 受理：平成25年4月24日

脈, 肺, 皮膚などの様々な組織に広く分布し (Rosenbloom et al., 1993), それぞれの組織に弾性と柔軟性を与えている (Isogai et al., 2002). 弾性系線維はエラスチンとマイクロフィブリルの相対的含有比率により, オキシタン線維, エラウニン線維と弾性線維に分類され (Böck & Stockinger, 1984; Mecham & Davis, 1994), 歯根膜にはマイクロフィブリルのみからなるオキシタン線維が存在する (Böck & Stockinger, 1984). マイクロフィブリルにはMAGP (microfibril-associated glycoprotein) とfibrillin-1が含まれ (Sakai et al., 1986; Kumaratilake et al., 1989), fibrillin-1を主要な構成成分としている (Tsutsumi et al., 2002). Fibrillin-1は弾性系線維におけるversicanのリガンド候補としても考えられている (Zimmermann et al., 1994).

一方, 細胞外基質であるプロテオグリカンにはコアタンパク質とそれに付着する糖鎖 (glycosaminoglycan: GAG) からなり, コアタンパク質のアミノ酸配列の構造的特徴からmodular proteoglycanとsmall leucine rich proteoglycanに分類される (Iozzo and Murdoch, 1996). Modular proteoglycanの1つにversicanが知られており, 主に線維芽細胞によって産生される (Zimmermann and Ruoslahti, 1989). Versicanは, 脳, 軟骨, 大動脈, 皮膚, 腱などの様々な組織に広く分布し (Yamagata et al., 1993; Zimmermann et al., 1994), 組織の形態維持, 細胞増殖, 細胞接着, 細胞遊走などの機能に深く関与する (Wight, 2002). また, versicanにはalternative RNA splicingにより, GAG- $\alpha$  domainおよびGAG- $\beta$  domainを含むV0, GAG- $\alpha$  domainの欠如したV1, GAG- $\beta$  domainが欠如したV2, および両domainが欠如したV3の4つのisoformが存在する (Shinomura et al., 1993; Zimmermann et al., 1994; Ito et al., 1995; Zako et al., 1995).

近年, versican結合領域に関連する*FBN1* (fibrillin-1の遺伝子) の変異がMarfan症候群の重症型をもたらすことも報告されており (Putnam et al., 1996), 弾性系線維とversicanの密接な関係が注目されている. しかしながら, 矯正歯科治療や咀嚼などの機能力によって歯根膜に負荷されるメカニカルストレス (伸展刺激) に対するfibrillin-1とversicanの動態変化については不明である.

本研究では, ヒト歯根膜由来線維芽細胞に周期的伸展刺激を負荷し, マイクロフィブリルの主成分であるfibrillin-1とversicanについて免疫組織化学的手法によりタンパク質の局在を, Real-Time quantitative PCR法によるmRNA発現の変化を検討した.

## 材料と方法

### 1. ヒト歯根膜由来線維芽細胞の単離と特異的形質の同定

歯根膜組織は本学歯科・内科クリニック矯正歯科で抜歯治療が必要とされ, 実験内容に同意を得た患者より抜去した小臼歯から得られた. 歯根膜組織の小片をプラスチックシャーレ上に静置し, 10%新生仔牛血清を添加したminimum essential medium培養液 (MEM, Invitrogen: ペニシリン100units/ml, ストレプトマイシン100 $\mu$ g/ml, L-グルタミン含有) 中で37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>環境下にて培養し, ヒト歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF) を単離した. 単離したHPLFを継代培養後, 実験に用いた. なお, 本研究は北海道医療大学歯学部・歯学研究科倫理委員会の承認 (承認番号31号) を得て行った.

さらに, 歯根膜ではPLAP-1とperiostinが特異的に発現することが知られていることから (Yamada et al., 2001, 2006, 2007; Horiuchi et al., 1999), 以前の報告 (永坂ら, 2012) と同様に, 今回用いた細胞 (HPLF) がヒト歯根膜由来の線維芽細胞としての性質を保持していることをRT-PCR法により確認し使用した.

### 2. 周期的伸展培養

STB-140 STREXcell stretch system (Strex Co.) を用いてHPLFに伸展刺激を負荷した. I型コラーゲンをコーティングしたエラスティック・シリコン・チャンバー上に1  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mlの細胞密度で播種した. 7日間培養後, 80%サブコンフルエント状態を確認し, 伸展率4%, 頻度は1分間に1往復のプログラム設定で伸展刺激を負荷し, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>の培養環境下にて7日間伸展刺激を与えた.

### 3. Real-Time quantitative PCR法によるfibrillin-1, versicanおよびversican isoformのmRNA発現

培養7日後, 対照群と伸展刺激群のHPLFからRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを抽出した. 抽出したtotal RNAに対しOmniscript reverse transcriptase protocol (Qiagen) を用いてRT反応を行った. Fibrillin-1, versicanおよびversican isoformおよびinternal standardとしてのGAPDHに対するprimerとTaqMan probeを設計した (表1, 表2).

HPLFのcDNAサンプルについてGenAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて, TaqMan probeによるReal-Time quantitative PCR法によってfibrillin-1, versican, およびversican isoformの

mRNA発現の変化について検討した。得られた結果は、比較Ct (threshold cycle) 法により相対的に定量し検討した。Ct値は、それぞれ蛍光強度が0.1の時のサイクル数として算出した。① $\Delta Ct$ =ターゲット遺伝子Ct-内部標準遺伝子Ct, ② $\Delta\Delta Ct$ =各サンプル $\Delta Ct$ -キャリブレーションサンプル $\Delta Ct$ , ③未知サンプルはキャリブレーションサンプルの $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 倍により、算出定量した。統計分析には、Student's t-testを用いた。

なお、primerおよびTaqMan probeは、Primer Express software (version 2.0, Applied Biosystems) を用いて設計した。

#### 4. 免疫蛍光染色による形態学的観察

培養7日後、HPLFを2%パラホルムアルデヒドで5~10分間固定した。PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7.4) で洗浄し、一次抗体 [goat anti-human fibrillin-1 polyclonal antibody (1:100, Santa Cruz), rabbit anti-mouse versican (GAG- $\alpha$  domain) polyclonal antibody (1:100, Millipore), rabbit anti-mouse versican (GAG- $\beta$  domain) polyclonal antibody (1:100, Millipore)] でそれぞれ室温にて60分間反応させた。PBSで洗浄した後、二次抗体としてAlexa Fluor<sup>®</sup> 488 donkey anti-goat IgG (H+L), Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen) をそれぞれ室温にて40分間反応させた。PBS洗浄後、HPLFを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

表1. Fibrillin-1およびversicanのprimerおよびTaqMan probeの配列

human-fibrillin-1	forward : 5'-GCATCATGCGTCGAGG-3' reverse : 5'-GGACGCTAAAAGCACGGTAA-3' TaqMan : 5'-CGTCTGCTGGAGATCGCCCT-3'
human-versican	forward : 5'-ACGTGCAAGAAAGGAACAGTTG-3' reverse : 5'-TCCAAAGGTCTTGGCATTTTCTA-3' TaqMan : 5'-TTGCGGCCAGCCCCCTGTT-3'
human-GAPDH	forward : 5'-GCGGATCCCTCTGCTCCTCTGTTTCGAC-3' reverse : 5'-GGAATTCTGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3' TaqMan : 5'-CTCCTCCTGTTTCGACAGTCAGCCGC-3'

表2. Versican isoformのprimerおよびTaqMan probeの配列

h-V0	forward : 5'-GCACAAAATTCACCCTGACATT-3' reverse : 5'-GATGACCAATTACACTCAAATCACTCA-3' TaqMan : 5'-ATTGAGGTCAGAGAAAATAAGACAGGTCGA-3'
h-V1	forward : 5'-GGCTTCCTCCCTCCCTGATA-3' reverse : 5'-GATGACCAATTACACTCAAATCACTCA-3' TaqMan : 5'-CAGATTGATGCCTACTGCTTAAACGTCGA-3'
h-V2	forward : 5'-GCACAAAATTCACCCTGACATT-3' reverse : 5'-GGCACGGGTTTCATTTTGC-3' TaqMan : 5'-TCAGAGAAAATAAGACAGGACCTGATCGC-3'
h-V3	forward : 5'-CCTCCCCCTGATAGCAGATTT-3' reverse : 5'-GGCACGGGTTTCATTTTGC-3'

## 結 果

### 1. Real-Time quantitative PCR法によるfibrillin-1, versicanおよびversican isoformのmRNA発現

HPLFに周期的伸展刺激を負荷した時のfibrillin-1とversicanのmRNA発現は、fibrillin-1mRNAは対照群と比較して3.6倍 (n=8, p<0.005) に増加した (図1a)。一方、versican mRNAは伸展刺激により対照群に対して6.8倍 (n=8, p<0.005) に増加した (図1b)。

周期的伸展刺激によりversicanのmRNA発現量が増加することが明らかになったため、そのisoformであるV0, V1, V2, V3のmRNA発現についても検討した (図2)。周期的伸展刺激により、V0では対照群に対して17.8倍 (図2a, n=5, p<0.005) のmRNA発現増強を示した。同様に、V1は9.6倍 (図2b, n=5, p<0.01) に、V3は11.6倍 (図2c, n=5, p<0.005) に増強した。V2はコントロールでほとんど検出されず、伸展するとわずかにmRNA発現が確認されたが、微量であったため相対定量できなかった。V0, V1, V3のmRNA発現は伸展刺激で顕著に上昇した。

### 2. Fibrillin-1とversican (GAG- $\alpha$ domain, GAG- $\beta$ domain) の免疫組織化学的局在および発現の変化

伸展刺激を負荷しなかった培養2週後の対照群に蛍光免疫染色を行い、fibrillin-1とversicanのタンパク質の局在について検討した (図3)。fibrillin-1は緑色蛍光をもってHPLFの細胞シート上に明瞭に観察され、網目を呈した走行配列を示した (図3a, d)。一方、赤色蛍光で示されるversicanは、fibrillin-1の走行に沿うように認められたが、fibrillin-1に比して全体的に弱い蛍光強度の染色を示した (図3c, f)。また、これらの蛍光画像を融合して検討した結果、versicanのGAG- $\alpha$  domainとGAG- $\beta$  domainの多くはfibrillin-1に共局在したが、強蛍光を示す部位以外でも赤色蛍光を帯びたversicanの線維状の配列走行も散見された (図3b, e)。また、こうした特徴はGAG- $\alpha$  domainとGAG- $\beta$  domainとの間には差異を認めなかった。

一方、7日間伸展培養したHPLFの免疫染色像では、fibrillin-1の緑色蛍光強度は対照群のHPLFにおける染色結果と大きな差異を認めなかった (図4a, d, g, j)。しかし、伸展刺激実験群では、緑色蛍光で示されるfibrillin-1の網目状構造が大きさを増して認められ、伸展方向に直行して集束して観察された。さらに、緑色蛍光で示されるfibrillin-1の蛍光強度は増加した。また、赤色蛍光で示されるGAG- $\alpha$  domainは対照群と同様にfibrillin-

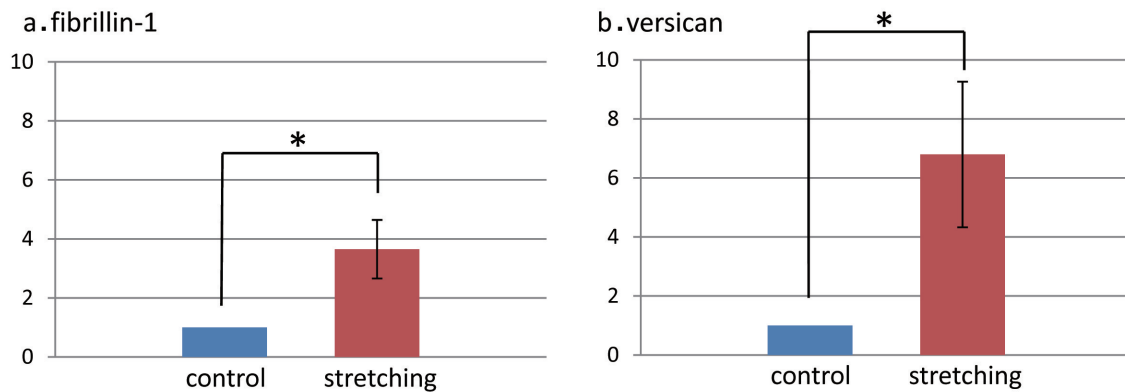


図 1. 周期的伸展刺激負荷によるHPLFのfibrillin-1およびversicanのmRNA発現の相対的变化

周期的伸展刺激により, fibrillin-1のmRNA発現は約3.6倍 ( $n = 8$ ) に増強し (a), versicanのmRNA発現は約6.8倍 ( $n = 8$ ) に増強されている (b). \* $p < 0.005$

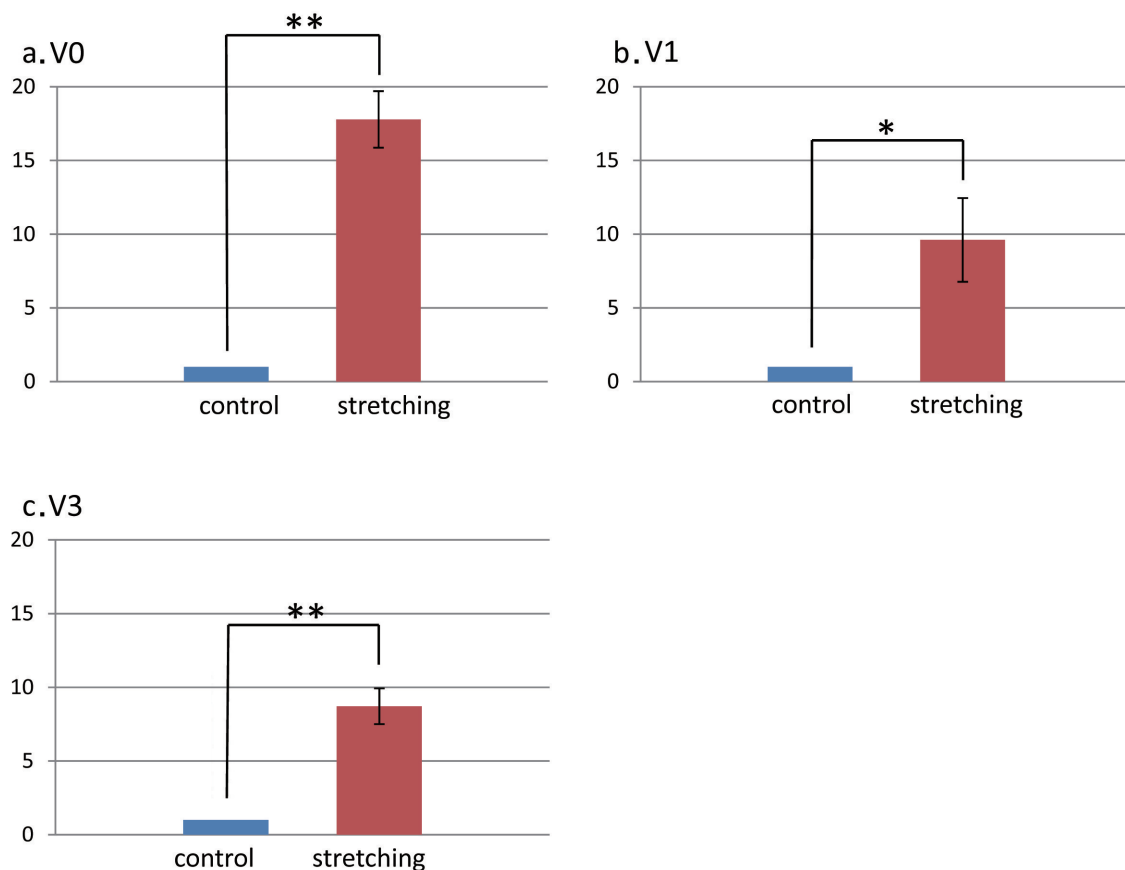


図 2. 周期的伸展刺激負荷によるHPLFのversican isoformsのmRNA発現の相対的变化

周期的伸展刺激はV0 (a), V1 (b), V3 (c) のそれぞれにおいて, 17.8倍 ( $n = 5$ ), 9.6倍 ( $n = 5$ ), 8.7倍 ( $n = 5$ ) にmRNA発現を増強する. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.005$

1に沿って配列していたが, 配列するGAG- $\alpha$  domainの蛍光強度が明らかに増加していた (図 4 c, f). これは, GAG- $\beta$  domainの蛍光強度においても同様に観察された (図 4 i, l). さらに, 融合した画像の観察では, 対照群の赤色蛍光を帯びたversicanのGAG- $\alpha$  domainおよびGAG- $\beta$  domainともに, ほぼfibrillin-1に沿って局在した線維走行がみられたが, versicanが優位に局在する黄色の線

維走行が一部に観察された (図 4 b, h). 一方, 伸展刺激実験群におけるfibrillin-1とversicanの共局在では, 観察領域のほぼ全域で黄色を呈した線維走行が観察された (図 4 e, k).

## 考 察

HPLFが産生する主要なプロテオグリカンversican,



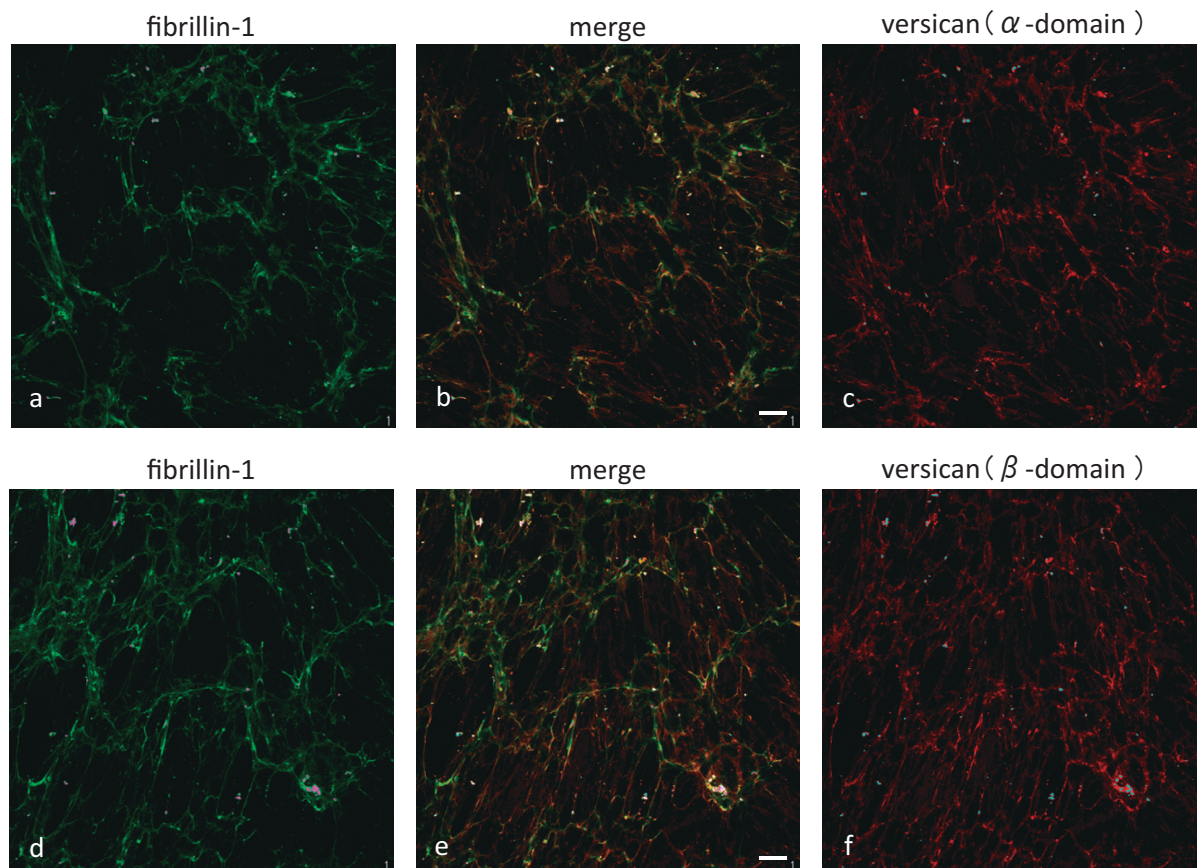


図3. 周期的伸展刺激を負荷していないHPLFにおけるfibrillin-1とversicanの免疫組織化学的局在

培養2週後のHPLFでは, fibrillin-1 (a, d) は緑色蛍光をもって細胞シート上に観察され, 網目を呈した走行配列を示している。Versicanの $\alpha$  domain (c) と $\beta$  domain (f) は画像合成の結果, fibrillin-1に共局在する (b, e)。しかし, 一部に赤色蛍光を強くする線維状の走行も観察される。Scale bars : 100 $\mu$ m.

decorin, heparan sulphate proteoglycan (HSPG) と未知の 91kDaのchondroitin sulphate proteoglycanであり, versicanはdecorinに次いで豊富に存在することが明らかにされている (Larjava et al., 1992)。さらにversicanには, 4つの isoformが存在し (Shinomura et al., 1993 ; Zimmermann et al., 1994 ; Ito et al., 1995 ; Zako et al., 1995), 各isoformの発現比率は組織によって異なる (Cattaruzza et al., 2002)。PCRによるブタ歯根膜の分析において, 歯根膜と歯肉の主要なversican isoformはV1であることが明らかにされている (Okahata et al., 2011)。本研究で用いたin vitroのHPLFの各versican isoformのmRNA発現についてみると, 比較Ct法では各isoformのmRNA発現の量比は正確には求めることができないが,  $\Delta$ Ct値で比較すると, 対照群ではV1の発現が最も高く, V0とV3の発現が低く, V2の発現はほとんど認められなかった。この結果は, 本研究で用いたHPLFがin vivoに類似したversican isoformを発現していることを示している。

伸展刺激に伴う各versican isoformの相対的な増加率はV0 isoformで17.8倍, V1で9.6倍, V3で11.6倍と, V2を除くisoformでmRNAの発現の増加率が顕著であった。な

ぜ, 伸展刺激によってV1のmRNA発現が特に高くなるのかは明らかではないが, V1と他のisoformとの構造的な違いはcore proteinに付くGAG鎖 (chondroitin sulphate) の数である。ヒトversicanでみると, V0 isoformで16, V1 isoformで12, V2 isoformで4, V3 isoformで0か所のGAG鎖結合可能部位をもつ (Zimmermann et al., 1994)。したがって, 伸展刺激によって $\beta$  domainを有するversicanのV1 isoformの発現が上がることはversicanの有するGAG鎖が歯根膜のメカニカルストレスに対する反応性において何らかの役割を有していることを示唆していると考えられる。免疫組織学的研究から, ラット歯根膜に存在する主要なGAG鎖は, chondroitin-4-sulphate, chondroitin-6-sulphateおよびdermatan sulphateである (Smalley et al., 1984 ; Matsukawa, 1994 ; Kagayama et al., 1996)。HPLFのメカニカルストレスによるGAG発現の変化に関する研究は, 我々の知る限り無いが, in vivoの実験系において, 矯正力の負荷によってchondroitin-6-sulphateが増加すること, また咬合力除去実験によって逆にchondroitin sulphateが減少することが報告されている (Kagayama et al., 1996 ; Kaneko et al., 2002)。また,



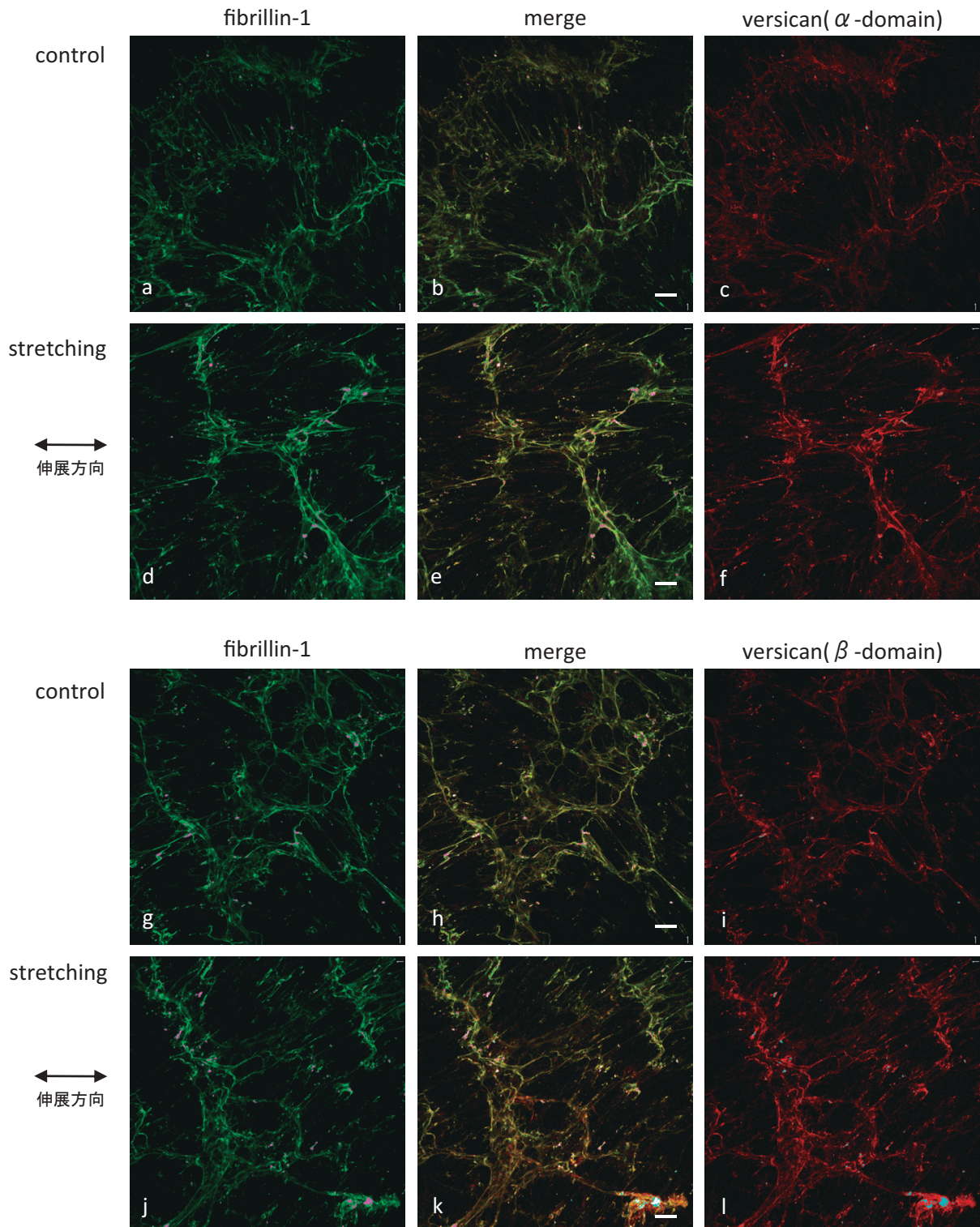


図4. 周期的伸展刺激負荷したHPLFにおけるfibrillin-1およびversicanの免疫組織化学的局在

周期的伸展刺激によるfibrillin-1の蛍光強度は対照群と差異を認められない (aとd, gとj). 一方, versicanの $\alpha$  domainと $\beta$  domain共に蛍光を増してみられる (cとf, iとl). 合成画像においては黄色を帯びた線維が明瞭にみられ, 伸展刺激がversicanを増強することを示している (bとe, hとk). Scale bars : 100 $\mu$ m.

最近の研究ではversicanと組織の機械的強度との関連性が指摘されている. Theocharisら (2001) は, ヒト動脈管でのV0 isoformの減少が血管壁の粘弾性と被圧縮性を低下させ, 動脈の変形を惹起することを報告している. また, Hinekら (2004) は, V3 isoformを過剰発現させ

ると, elastin-binding proteinの発現および弾性線維の合成が促進されることを報告し, これにはV3 isoformの増加に伴うGAG鎖の減少が関与していることを示唆した. これらの研究は, 歯根膜組織におけるversicanのisoformの発現量比がGAGの動態および弾性線維系を介し

て歯根膜細胞の機械的強度に関与している可能性を示唆している。

対照群と実験群でのfibrillin-1, GAG- $\alpha$  domainおよびGAG- $\beta$  domainの免疫染色の結果から, 伸展刺激によって3つの基質は伸展方向に直行する帯状の集積を示した。この所見は, 過去の研究でのfibrillin-1とfibrillin-2の免疫染色の結果 (Tsuruga et al., 2009) と一致しているが, 本研究ではversicanの局在についても同様の結果が得られた。線維芽細胞あるいは血管内皮細胞に一定軸方向の伸展刺激が加わると, 細胞および細胞内のアクチンストレスファイバーが伸展方向に対して垂直に整列することが知られており (Wei et al., 2008 ; Hsu et al., 2009), 本研究においても同様の細胞の整列がみられた。このことはメカニカルストレスという情報が細胞内に伝達し, それに対してアクチンストレスファイバーが伸展率を最小化するための応答をしたことを示唆しているが, versicanなどの基質の配列が細胞内のアクチンの整列を介した反応なのか, あるいは基質そのものの反応なのかは, その機序ともども不明である。

GAG- $\alpha$  domainとGAG- $\beta$  domainの免疫染色についてみると, 2つのdomainの局在には対照群, 実験群とも大きな差異は認められなかった。しかし, 両群の免疫染色の融合画像を詳細に比較すると, 伸展刺激によってfibrillin-1に比較して2つのGAG domainの染色範囲と蛍光強度が相対的に増加していた。免疫染色はあくまでもタンパク質の局在をみるものであり, タンパク質発現の定量は困難ではあるが, この結果は本研究におけるfibrillin-1とversican-totalのmRNA発現の結果 (fibrillin-1で3.6倍増, versican-totalで6.8倍増) によっても支持される。

また, 本研究で用いた2種類のversican抗体はそれぞれrabbit anti-mouse versican (GAG- $\alpha$  domain) 抗体はV0とV2のisoformを, rabbit anti-mouse versican (GAG- $\beta$  domain) 抗体はV0とV1のisoformを認識する。V0, V1, V2 isoformの局在をみてみると, 少なくともV0, V1とV2の3つのversican isoformはfibrillin-1に沿って存在することが明らかとなった。さらに, 周期的伸展刺激の負荷によりversicanのGAG- $\alpha$  domainとGAG- $\beta$  domainの蛍光強度がともに増大したことに加え, 融合画像が示すようにミクロフィブリルの網目状構造の間にも明るい蛍光反応がみられた。これは, 伸展刺激がfibrillin-1よりもversicanの発現を増強させることを示唆するものであり, 実際fibrillin-1とversicanのmRNA発現を比較すると, 伸展刺激はversicanのmRNA発現を著しく増強し, V0, V1, V3 isoformにおいても著しい増強がみられた。約3.6倍程度増強されたfibrillin-1のmRNA発現は免疫蛍光染色に

は現れなかった。本実験で利用した周期的伸展刺激がfibrillin-1よりもversicanのmRNA発現を増強したことから, HPLFは伸展刺激に対してversicanのmRNA発現を介して応答したものと考えられる。従って, fibrillin-1とversicanは歯根膜の細胞外基質, 特に弾性系線維を構成するうえで極めて密接な関係にあり, 伸展刺激のようなメカニカルストレスに対してHPLFはfibrillin-1とversicanの発現を増強し, その配列の分布が伸展方向に直行する様に変化した。このように, メカニカルストレスは弾性と柔軟性を伴う歯根膜特有の機能を維持するために重要であることが示唆された。

## 結 論

ヒト歯根膜線維芽細胞は, メカニカルストレス (伸展刺激) に対してfibrillin-1とversicanの発現を増強し, タンパク質の局在の集積を生ずることが明らかになった。このことは, メカニカルストレスに対する歯根膜組織の適応反応であることが示唆された。

## 文 献

- Böck P & Stockinger L. Light and electron microscopic identification of elastic, elaunin and oxytalan fibers in human tracheal and bronchial mucosa. *Anat Embryol* 170 : 145-153, 1984.
- Cattaruzza S, Schiappacassi M, Ljungberg-Rose A, Spesotto P, Perissinotto D, Mörgelin M, Mucignat MT, Colombatti A & Perris R. Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration, and neoangiogenesis in vitro. *J Biol Chem* 277 : 47626-47635, 2002.
- Edwards JG. A study of the periodontium during orthodontic rotation of teeth. *Am J Orthod* 54 : 441-61, 1968.
- Fujii T & Hirabayashi Y. Histochemical studies of glycosaminoglycans in developing periodontal ligaments of ICR mice. *Anat Rec* 254 : 465-73, 1999.
- Fullmer HM, Sheetz JH & Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers : a review. *J Oral Pathol* 3 : 291-316, 1974.
- Hinek A, Braun KR, Liu K, Wang Y & Wight TN. Retrovirally mediated overexpression of versican v3 reverses impaired elastogenesis and heightened proliferation exhibited by fibroblasts from Costello syndrome and Hurler disease patients. *Am J Pathol* 164 : 119-131, 2004.
- Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Kat-



- suura M, Oazwa H, Toyama Y, Bonewald LF & Kudo A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor. *J Bone Miner Res* 14 : 1239-1249, 1999.
- Hsu HJ, Lee CF & Kaunas R. A dynamic stochastic model of frequency-dependent stress fiber alignment induced by cyclic stretch. *PLoS One* 4 : e4853, 2009.
- Isogai Z, Aspberg A, Keene DR, Ono RN, Reinhardt DP & Sakai LY. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem* 277 : 4565-4572, 2002.
- Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M & Kimata K. Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 270 : 958-965, 1995.
- Kagayama M, Sasano Y, Mizoguchi I, Kamo N, Takahashi I & Mitani H. Localization of glycosaminoglycans in periodontal ligament during physiological and experimental tooth movement. *J Period Res* 31 : 229-234, 1996.
- Kaneko S, Ohashi K, Soma K & Yanagishita M. Occlusal hypofunction causes changes of proteoglycan content in the rat periodontal ligament. *J Periodontal Res* 36 : 9-17, 2001.
- Larjava H, Häkkinen L & Rahemtulla F. A biochemical analysis of human periodontal tissue proteoglycans. *Biochem J* 284 : 267-274, 1992.
- LeBaron RG, Zimmermann DR & Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem* 267 : 10003-10010, 1992.
- Mecham RP & Davis EC. Elastic fiber structure and assembly. In : Yurchenco PD, Birk DE, Mecham RP, eds. *Extracellular matrix assembly and structure*. New York : Academic Press Inc. 281-314, 1994.
- Okahata S, Yamamoto R, Yamakoshi Y & Fukae M. A large chondroitin sulfate proteoglycan, versican, in porcine predentin. *J Oral Biosci* 3 : 72-81, 2011.
- Putnam EA, Cho M, Zinn AB, Towbin JA, Byers PH & Milewicz DM. Delineation of the Marfan phenotype associated with mutations in exons 23-32 of the FBN1 gene. *Am J Med Genet* 29 : 233-42, 1996.
- Rosenbloom J, Abrams WR & Engvall E. Extracellular matrix 4 : The elastic fiber. *FASEB Journal* 7 : 1208-1218, 1993.
- Sakai LY, Keene DR & Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 103 : 2499-2509, 1986.
- Shinomura T, Nishida Y, Ito K & Kimata K. cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. *J Biol Chem* 268 : 14461-14469, 1993.
- Smalley JW, Shuttleworth CA & Grant ME. Synthesis and secretion of sulphated glycosaminoglycans by bovine periodontal ligament fibroblast cultures. *Arch Oral Biol* 29 : 107-16, 1984.
- Theocharis AD, Tsolakis I, Hjerpe A & Karamanos NK. Human abdominal aortic aneurysm is characterized by decreased versican concentration and specific downregulation of versican isoform V(0). *Atherosclerosis* 154 : 367-376, 2001.
- Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y & Yajima T. Expression of fibrillins and tropoelastin by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodontal Res* 37 : 23-28, 2002.
- Tsuruga E, Nakashima K, Ishikawa H, Yajima T & Sawa Y. Stretching modulates oxytalan fibers in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 44 : 170-4, 2009.
- Wei Z, Deshpande VS, McMeeking RM & Evans AG. Analysis and interpretation of stress fiber organization in cells subject to cyclic stretch. *J Biomech Eng* 130 : 031009, 2008.
- Wight TN, Heinegard D & Hascall V. Proteoglycans : structure and function. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Edited by Hay E. Plenum Press, New York., USA, pp39-50, 1991.
- Wight TN. Versican : a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 14 : 617-623, 2002.
- 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.
- Yamada S, Ozawa Y, Tonoeda M, Matoba R, Matsubara K & Murakami S. Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. *J Dent Res* 85 : 447-451, 2006.
- Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa K, Ikegawa S, Saito M, Toyosawa S & Mu-



rakami S. PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem* 282 : 23070-23080, 2007.

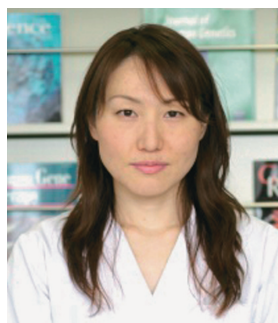
Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M & Kimata K. Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion. *J Cell Sci* 106 : 55-65, 1993.

Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K & Kimata K. Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment in region in mouse and human tissues. *J Biol Chem* 270 : 3914-3918, 1995.

Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Schubert M & Bruckner-Tuderman L. Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol* 124 : 817-825, 1994.

Zimmermann DR & Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J* 8 : 2975-2981, 1989.

永坂 萌, 鳥谷奈保子, 敦賀英知, 坂倉康則, 溝口 到. ヒト歯根膜由来線維芽細胞におけるfibrillin-1の発現抑制がversicanのmRNAとタンパク質発現およびタンパク質の局在へ及ぼす影響. *北医大誌* 31 : 81-87, 2012.



鳥谷 奈保子

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

平成12年 3月 北海道医療大学歯学部卒業

平成16年 3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程修了

平成18年 4月 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野  
助手

平成19年 4月 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野  
助教