

〔原著〕

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

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

- 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

Effects of underexpression of fibrillin-1 on mRNA and protein expression and protein localization of versican in human periodontal ligament fibroblasts

Moe NAGASAKA¹⁾, Naoko TORIYA¹⁾, Eichi TSURUGA³⁾, Yasunori SAKAKURA²⁾, Itaru MIZOGUCHI¹⁾

- 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) contains a number of extracellular matrix (ECM) components, such as collagen, proteoglycans (PG)s, elastic system fibers and non-collagenous glycoproteins. These ECM components are essential for tissue integrity and for the physiological functions of the PDL. To analyze the functional relationships among ECM components in the PDL, the expression and localization of a large modular PG, versican, in human PDL fibroblasts with under-expression of fibrillin-1, a main component of elastic system fibers, by knockdown with short interfering RNA was investigated. In the suppressed fibrillin-1 condition here, the mRNA and protein expression of fibrillin-1 decreased to approximately 35% and 60%, compared with a control without fibrillin-1 suppression, while the mRNA expression of versican remained almost un-

changed. A quantitative analysis of the immunostaining indicated that the staining intensity of fibrillin-1 decreased to approximately 60% under the fibrillin-1 suppressed condition of fibrillin-1 mRNA, compared with a control, while the staining intensity of the GAG- α and GAG- β domains were almost unchanged. Also, the immunostaining with antibodies of GAG- α and GAG- β domains showed that a thick fibrous staining pattern rather than thin textiform increased under the fibrillin-1 suppressed condition. These results suggest that fibrillin-1 functions as a scaffold for the assembly of versican molecules and act as a regulator in its distribution. Also, the binding of both molecules in appropriate amounts appears important for the reticular distribution in the PDL.

Key words : 歯根膜, 線維芽細胞, fibrillin-1, versican, siRNA

緒 言

歯周組織の構成要素のひとつである歯根膜は歯の固

定, 支持および咀嚼力や咬合力に対する緩衝材として機能し, 絶えず咬合力などの機能力にさらされている. 組織学的にみると, 歯根膜は線維性結合組織に分類される

受付:平成24年9月30日 受理:平成24年11月6日

が、組織内には線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞、セメント芽細胞、Malassezの上皮遺残などの様々なcell populationが存在する。また、歯根膜の細胞外基質成分はコラーゲン、弾性系線維やプロテオグリカンなどから構成されている。

弾性系線維は歯周組織、大動脈、肺、皮膚などの様々な組織に分布し (Rosenbloom et al., 1993)、組織に弾性と柔軟性を付与し、組織の反復性復位 (伸展と収縮の繰り返し) を可能としている。絶えず機械的刺激にさらされる歯根膜において弾性系線維の性質は重要である。生化学的にみると、弾性系線維はエラスチンとマイクロフィブリルからなり (Greenlee et al., 1966; Carmichael & Fullmer, 1966; Ross & Bornstein, 1969; Cleary & Gibson, 1983; Mecham & Davis, 1994)、両者の相対的比率によってオキシタラン線維、エラウニン線維と弾性線維の3タイプに分類される (Böck & Stockinger, 1984; Mecham & Davis, 1994)。オキシタラン線維は歯根膜で初めて発見され (Fullmer & Lillie, 1958)、歯根膜の構成要素の一つとして認められている (Sims, 1973; Simmons et al., 1980; Edmunds et al., 1979; Beertsen et al., 1974; Fullmer et al., 1974)。歯根膜でのオキシタラン線維は、主線維であるコラーゲン線維に直交するように配列しており (Sims, 1973)、ブリッジの支台歯としての使用などメカニカルストレスの負荷により、また矯正力の負荷により、太くなり増加することが報告されている (Edwards, 1968; Fullmer et al., 1974)。また、オキシタラン線維は350kDaの糖タンパクであるfibrillin-1を主に含むマイクロフィブリルを主成分とする (Sakai et al., 1986; 1991; Tsuruga et al., 2002; Böck & Stockinger, 1984)。ヒト歯根膜由来線維芽細胞の培養系ではfibrillin-1が発現し、細胞・基質層でオキシタラン線維を形成することが報告されている (Tsuruga et al., 2002; 2007; 2009)。

一方、歯根膜に存在する主要なプロテオグリカンはversicanである (Larjava et al., 1992)。このプロテオグリカンは、様々な機能を有したドメインが連結した大型のmodular PGに属する (Iozzo & Murdoch, 1996)。Versicanのコアタンパク質は3つの領域に分けられ、N末端領域であるヒアルロン酸結合領域 (G1 domain, HABR)、GAG鎖が付属する2つの中心領域 (GAG- α domainとGAG- β domain) およびC末端領域 (G3 domain) から構成される。また、versicanは組織の形態維持、細胞増殖、細胞接着 (Yamagata et al., 1989; 1993; 1994; Ang et al., 1999; Yang et al., 1999)、細胞遊走 (LeBaron et al., 1992; Yamagata et al., 1993; Landolt et al., 1995; Zhang et al., 1998a; 1998b; Ang et al., 1999) などの機能

に関与している。

近年、fibrillin-1上の*FBNI*遺伝子が存在する領域にversicanの結合領域が存在することが報告されている (Isogai et al., 2002)。*FBNI*遺伝子の変異は細胞外基質の異常から結合組織を脆弱にするMarfan症候群の重症型をもたらすことが報告されている (Putnam et al., 1996)。そのため、結合組織におけるマイクロフィブリル、fibrillinとversicanとの関連性が特に注目されている (Ohno-Jinno et al., 2008)。しかし、歯根膜におけるfibrillin-1とversicanの機能的関連性に関する研究は少なく、不明な点が多い。そこで本研究では、歯根膜におけるfibrillin-1とversicanとの生物学的関連性を明らかにするために、ヒト歯根膜由来線維芽細胞のfibrillin-1のmRNA発現を抑制し、versicanの動態変化について免疫組織化学的、分子生物学的に検討した。

実験材料および方法

1. ヒト歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF) の培養系

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、研究内容に同意を得た患者の抜去した小白歯から得た。細切した歯根膜組織をプラスチックシャーレ上に静置し、10%新生仔牛血清 (Invitrogen) を添加したminimum essential medium (MEM, Invitrogen: ペニシリン100units/ml, ストレプトマイシン100 μ g/ml, L-グルタミン含有) 中で37°C, 5%CO₂環境下に培養し、3代継代してヒト歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF) として単離した。単離したHPLFは、細胞の表現型を保持するために4~6代継代のものまでを使用した。また同様に、患者の抜去歯の歯肉組織からヒト歯肉由来線維芽細胞 (HGF) を単離し、継代培養後にHPLFの同定について対照実験に供した。

さらに、*PLAP-1*と*periostin*が歯根膜に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)、単離したHPLFの*PLAP-1*および*periostin*の発現をRT-PCR法を用いて検討した。使用したprimerの配列を表1に示す。

なお、本研究は北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会にて承認を得て実施された。

2. Small interference RNA (siRNA) 設計と一過性形質転換

ヒトfibrillin-1に対するsiRNAは、Sigma Aldrich Japanによって設計・合成したものを使用した。合成したsiRNAはfibrillin-1のC末端側の非翻訳領域 (9392-9414) に対応させた。Fibrillin-1に対するsiRNA配列と

表1 PLAP-1とperiostinのprimerの配列

human-PLAP-1	forward : 5'-GCATCATGCGTCGAGG-3' reverse : 5'-GGACGCTAAAAGCACGGTAA-3'
human-periostin	forward : 5'-ACGTGCAAGAAAGGAACAGTTG-3' reverse : 5'-TCCAAAGGTCTTGGCATTCTTA-3'
human-GAPDH	forward : 5'-GCGGATCCCTCTGCTCCTCTGTTTCGAC-3' reverse : 5'-GGAATTCTGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3'

表2 Fibrillin-1 siRNAの塩基配列

siRNA	sense : 5'-CAGUACUAGGUUGUCAUUU-3' anti-sense : 5'-AUGGACAACCUAGUACUUGUA-3'
scrambled order	sense : 5'-UGUCUACCUUGUAACCAGUCA-3' anti-sense : 5'-ACUAAUUACAAGGUAGACAUC-3'

表3 Fibrillin-1とversicanのprimerおよびTaqMan probeの配列

human-fibrillin-1	forward : 5'-GCATCATGCGTCGAGG-3' reverse : 5'-GGACGCTAAAAGCACGGTAA-3' TaqMan probe : 5'-CGTCTGCTGGAGATCGCCCT-3'
human-versican	forward : 5'-ACGTGCAAGAAAGGAACAGTTG-3' reverse : 5'-TCCAAAGGTCTTGGCATTCTTA-3' TaqMan probe : 5'-TTGCGCCAGCCCTGTT-3'
human-GAPDH	forward : 5'-GCGGATCCCTCTGCTCCTCTGTTTCGAC-3' reverse : 5'-GGAATTCTGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3' TaqMan probe : 5'-CTCCTCTGTTTCGACAGTCAGCCGC-3'

ネガティブコントロール (scrambled order siRNA) の配列を表2に示す。プラスチックシャーレ ($\phi 35\text{mm}$) に 1×10^6 cells/mLの細胞密度で播種し、80%サブコンフルエント状態を0日目とした。siRNAはHiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) を使用してHPLF中に導入した。まず、Opti MEM medium (99.25 μl , Invitrogen) で150ng siRNAを希釈し、12.0 μl HiPerFect Transfection Reagentを添加した。その後、トランスフェクション・コンプレックスの形成のため、15~25°Cの室温で5~10分インキュベートした。その後、最終濃度が5 nMとなるようにfibrillin-1 siRNAとfibrillin-1 scrambled order siRNAをそれぞれ培養液に添加した。siRNAを加えずにトランスフェクション試薬のみを添加し、疑似導入したものを対照群とした。トランスフェクション・コンプレックスの添加はNakashimaらの手法 (Nakashima et al., 2009) に従い、培養の1日目と4日目に行い、それぞれ12時間インキュベートした後、培養液を通常培養液に交換した。72時間間隔で2回siRNAを導入し、HPLFを7日目に回収した。

3. Fibrillin-1とversicanのmRNA発現

siRNA処理を施したHPLFを回収し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを抽出した。なお、genomic DNAの試料への混入を防止するため、total RNAの抽出の過程でRNase-free DNase (Qiagen) 処理を施した。抽出したtotal RNAに対しOmniscrypt reverse transcriptase

protocol (Qiagen) を用いてRT反応を行い、cDNAを合成した。

各HPLFサンプルについてfibrillin-1およびversicanのmRNA発現を検討した。mRNAの検出はGeanAmp5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いてTaqMan probeによるReal-Time PCR法にて実施した。結果は比較Ct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、① ΔCt =ターゲット遺伝子Ct-内部標準遺伝子Ct、② $\Delta\Delta\text{Ct}$ =各サンプル ΔCt -キャリブレーションサンプル ΔCt 、③未知サンプルはキャリブレーションサンプルの $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 倍により、相対定量した。統計学的有意差はStudent's *t*-testを用いて検定した。

なお、fibrillin-1、versicanおよび内部標準としてのGAPDHに対するprimerとTaqMan probe (exonuclease probe) は、Primer Express software (version 2.0, Applied Biosystems) を用いて設計した。PrimerとTaqMan probeの塩基配列を表3に示す。

4. Fibrillin-1とversicanの免疫蛍光染色

7日間培養したHPLFを2%パラホルムアルデヒドで10分間固定した。Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、fibrillin-1とversicanについてそれぞれ単染色を行った。一次抗体 [goat anti-human fibrillin-1 polyclonal antibody (1:100, Santa Cruz), rabbit anti-mouse versican (GAG- α domain) polyclonal antibody (ab1032, 1:100, Millipore), rabbit anti-mouse versican (GAG- β domain) polyclonal antibody (ab1033, 1:100, Millipore)] でそれぞれ室温にて1時間反応させた。PBSで洗浄した後、二次抗体としてAlexa Fluor[®] 488 donkey anti-goat IgG (H+L) (1:100, Invitrogen), Alexa Fluor[®] 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:100, Invitrogen) をそれぞれ室温にて40分反応させた。なお、抗体の希釈には1% bovine serum albumin/PBSを用いた。PBSでの最終的な洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡を使用して観察した。

次にsiRNA処理を施したHPLFを上記の抗体を用いて二重染色した。

Fibrillin-1およびversican (GAG- α domain, GAG- β domain) の集積量は画像解析ソフト (Image J, NIH, Bethesda, ML, USA) を用いて、蛍光強度に閾値を設定し計測した。

結 果

1. HPLFの歯根膜線維芽細胞としての同定

単離したHPLFが歯根膜由来線維芽細胞であることを

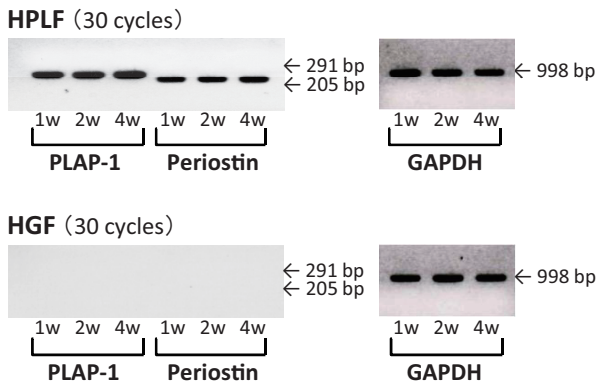


図1 ヒト歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF) とヒト歯肉由来線維芽細胞 (HGF) における *PLAP-1* と *periostin* の mRNA 発現
 歯根膜細胞で特異的に発現する *PLAP-1* (291bp) と *periostin* (205bp) は HPLF においてのみ発現しており、その発現は培養期間を通して継続している。GAPDH はほぼ同等の発現を示している。

確認するために、歯根膜に特異的に発現する *PLAP-1* と *periostin* について RT-PCR 法にて検討した (図 1)。比較対照として HGF を用いた。PCR の結果、HPLF は培養 1, 2, 4 週後において *PLAP-1* (291bp) および *periostin* (205bp) の mRNA が継続的に発現しており、歯根膜に特異的な形質発現が認められた。一方、HGF では培養期間を通して両形質の発現は全く認められなかった。内部標準として用いた GAPDH においては、発現の差異は確認されなかった。この結果より、単離した HPLF は歯根膜由来線維芽細胞の形質を保持していると考え、これ以降の実験に用いた。

2. siRNA による fibrillin-1 の発現抑制実験

1) Fibrillin-1 と versican の mRNA 発現に対する相対的变化

Versican のタンパク質発現における fibrillin-1 の関連性を検討するため、siRNA により fibrillin-1 発現抑制実験を行い、versican の mRNA 発現について検討した (図 2)。siRNA の導入は fibrillin-1 の mRNA 発現を対照群お

よび scrambled order 群に対して約 34% ($n = 5, p < 0.005$) にまで減少させた (図 2 a)。一方、versican の mRNA 発現においては、fibrillin-1 siRNA 導入は対照群と scrambled order 群とにほとんど影響を与えなかった (図 2 b)。

2) 免疫組織化学的観察と蛍光強度の解析

まず対照群の HPLF に fibrillin-1 と versican GAG- α domain, GAG- β domain に対する抗体を用いてそれぞれ単染色を行い、fibrillin-1 と versican GAG- α domain, GAG- β domain の線維状の局在を確認した (図 3 a-c)。さらに fibrillin-1 に対する一次抗体、二次抗体、versican に用いた二次抗体の順で反応させた染色像では、fibrillin-1 の緑色蛍光が線維状に発現したが、versican GAG- β domain の赤色蛍光はほぼ観察しなかった。Merge では緑色蛍光の染色像を観察した (図 3 d-f)。GAG- α domain についても同様の結果が得られた (結果は示していない)。

次に、siRNA による fibrillin-1 mRNA 発現抑制 fibrillin-1 mRNA 発現抑制時における fibrillin-1 と versican のタンパク質の局在を観察した (図 4)。Fibrillin-1 と GAG- α domain の局在を示す蛍光は対照群と scrambled order 群の間では差異は認められず、いずれも繊細な細網状の染色パターンを示した (データは示していない)。またその強度にも差は認められなかった (図 5)。一方、fibrillin-1 の mRNA 発現抑制により fibrillin-1 の局在を示す緑色蛍光の繊細な細網状の染色パターンは減少し、一部で太い線維状の染色パターンを示した (図 4 a, d)。蛍光強度は対照群の 60% に減少していた (図 5)。GAG- β domain の局在を示す赤色蛍光は fibrillin-1 に一致し、細網状のパターンが減少し、太い線維状を示すパターンとその間にびまん性の発色が観察された (図 4 c, f)。fibrillin-1 の mRNA の発現を抑制したときの GAG- α domain の局在も GAG- β domain と同様であった (データは

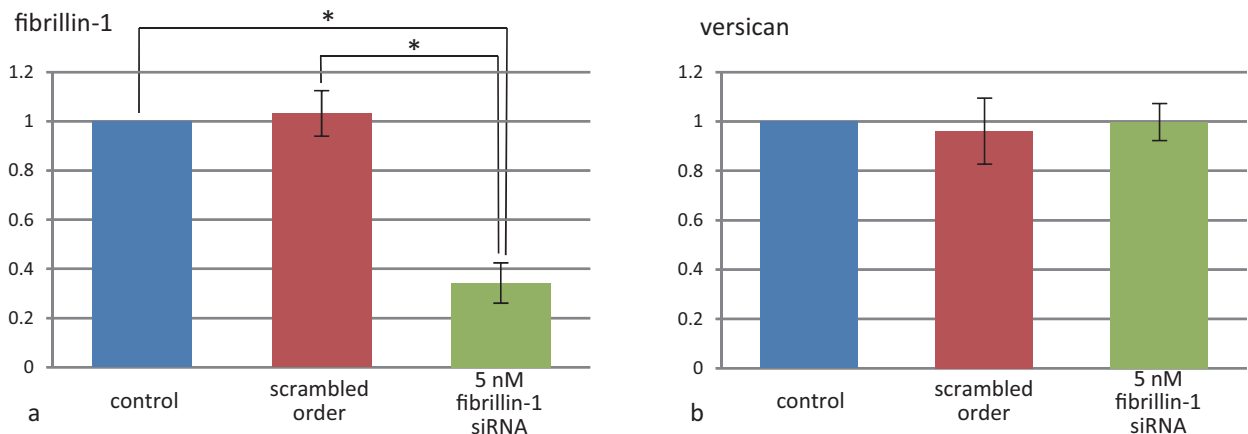


図2 Fibrillin-1 siRNA による fibrillin-1 と versican の mRNA 発現の相対的变化
 siRNA の導入の結果、fibrillin-1 mRNA 発現は対照群および scrambled order 群における mRNA 発現の約 34% まで激減する (a)。これに対して versican mRNA 発現にはほとんど影響がみられない (b)。* $p < 0.01$ ($n = 5$)

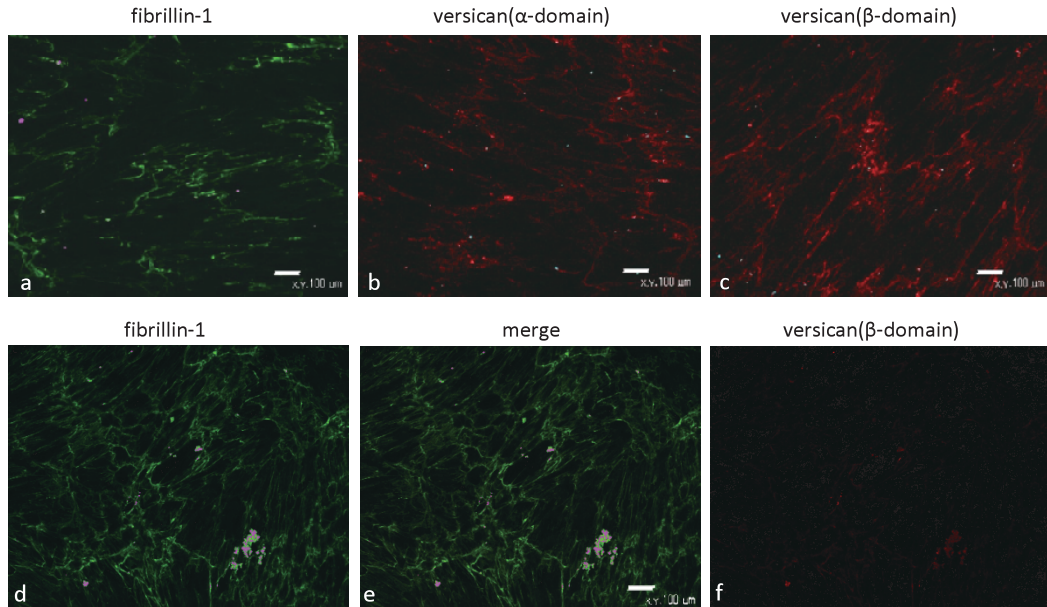


図3 HPLFにおけるfibrillin-1とversican GAG- α domain, β domainの免疫組織化学的局在
単染色ではfibrillin-1, versican GAG- α domainおよび β domainそれぞれの局在が確認できる (a, b, c). また, versicanに対する二次抗体はfibrillin-1に対する抗体に反応していない (d-f). Scale bars : 100 μ m.

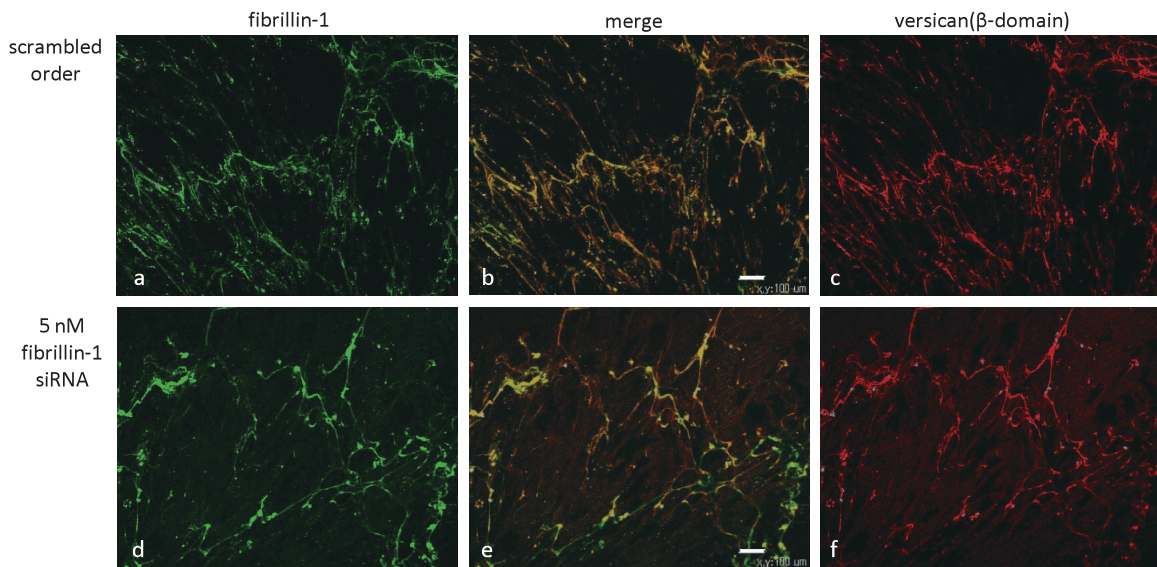


図4 siRNAによるfibrillin-1 mRNA発現抑制におけるfibrillin-1とversican GAG- β domainの免疫組織化学的局在
Fibrillin-1 siRNAにより, 細い細網状の染色パターンは消失し, 一部で太い線維状の染色パターンを示している (a, d). Versican GAG- β domainも同様の傾向を示し, さらにその間にびまん性の赤色蛍光が認められる (c, f). Scale bars : 100 μ m.

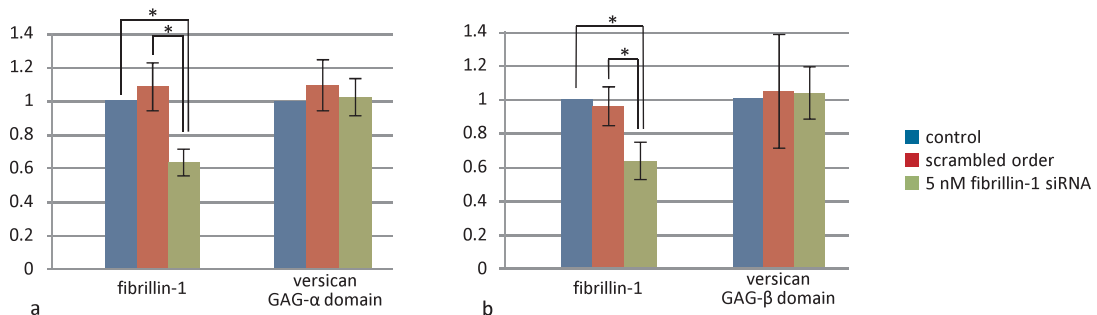


図5 siRNAによるfibrillin-1 mRNA発現抑制におけるfibrillin-1とversican GAG- α , GAG- β domainの共焦点レーザー顕微鏡像の解析
Fibrillin-1 siRNAにより, fibrillin-1のタンパク質発現量は約60%まで減少しているが, GAG- α , GAG- β domainには大きな変化は認められない. また, 対照群とscrambled order群との間には差異はみられない. * $p < 0.01$ (n = 5)

示していない). Fibrillin-1のmRNAを抑制したときの 強度は対照群と変わらなかった (図5 a, b).
免疫染色におけるGAG- β domainとGAG- α domainの蛍光

考 察

1. 歯根膜培養細胞におけるPLAP-1とperiostinの遺伝子発現について

ヒト歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF) の特性を明らかにするため、歯根膜組織に特徴的な遺伝子であるPLAP-1 (Periodontal-ligament-associated protein-1; Yamada et al., 2001; 2006; 2007) とperiostin (Horiuchi et al., 1999; Wilde et al., 2003) の発現に関して、類似した結合組織系の歯肉由来線維芽細胞 (HGF) と比較した。その結果、HPLFのみに両方のmRNA発現が認められた。

Small leucine-rich proteoglycan (SLRP) に属するPLAP-1遺伝子は歯根膜組織に特異的に発現し、歯肉、歯槽骨、骨膜などには全く発現していない (Yamada et al., 2001)。PLAP-1遺伝子は歯根膜組織に潜在する骨組織形成能を抑制し、軟組織としての恒常性を維持する機能を営んでいると考えられている (Yamada et al., 2001; 2006; 2007)。また、periostin遺伝子は骨芽細胞様培養細胞であるMC 3 T 3 -E 1 の遺伝子ライブラリより単離・同定された遺伝子であり、骨膜表面と歯根膜組織に局在し (Horiuchi et al., 1999)、矯正学的歯の移動に伴う歯槽骨のリモデリングに関与していると考えられている (Wilde et al., 2003)。したがって、本研究で単離したHPLFは歯根膜由来線維芽細胞に特異的な形質を保持していると考えられる。

2. 歯根膜培養細胞のfibrillin-1とversicanの発現と局在について

HPLFにfibrillin-1とversicanに対する抗体を用いてそれぞれ単染色を行い、さらにfibrillin-1に対する一次抗体、二次抗体、versicanに用いた二次抗体の順で二重染色を行った。その結果から、今回用いた抗体がターゲットであるfibrillin-1とversicanそれぞれに反応することを確認した。

生化学的分析から、HPLFが産生する主要なプロテオグリカンはversican, 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)。

今回の研究で、siRNAによってfibrillin-1 mRNAを抑制するとfibrillin-1の繊細な細網状の局在は減少し、太い線維状の局在を示した。また、蛍光強度からタンパク量は60%に減少していることが推定された。一方versicanのGAG- α およびGAG- β domainの局在はfibrillin-1 mRNAの抑制によりfibrillin-1に一致した太い線維状の

局在を示すとともに、線維間にびまん性の局在を示した。蛍光強度からタンパク量に変化がないことが推定され、versicanの発現がfibrillin-1の発現に影響されないPCRの結果と一致する。このことはfibrillin-1 mRNAの抑制によりfibrillin-1が減少したことにより、fibrillin-1に結合できないversicanが基質中に散在している可能性を示唆する。また一定量以上のversicanとの結合により、fibrillin-1が繊細な細網状の分布パターンを取れない可能性も考えられる。

Versicanは複数の構成domainによる多彩な機能を有している (Zimmermann & Ruoslahti, 1989; Wight, 2002)。G1 domain (hyaluronate binding region; HBR) はGAGの一種であるヒアルロン酸との結合能を有し (LeBaron et al., 1992; Ang et al., 1999)、細胞外空間のヒアルロン酸被膜 (hyaluronate coat) を形成する (LeBaron et al., 1992)。最近の研究によると、視覚の遠近を調節する毛様体においてfibrillin-1, versicanおよびhyaluronateの複合体が柔軟性と含水性をもたらす、眼球の形を維持し圧力や刺激の吸収を行う硝子体においてはその複合体の分解産物が存在することが報告されている。このことから、fibrillin-1とversicanがこれらの組織での生理学的特性に関与していることが示唆されている (Ohno-Jinno et al., 2008)。

以上のことからHPLFはversicanのもつヒアルロン酸結合能力を介して (Zimmermann & Ruoslahti, 1989; LeBaron et al., 1992)、大きい保水容量をもつヒアルロナンリッチマトリックスにマイクロフィブリル (fibrillin-1) を結合させ、歯根膜組織に弾性を与える (Isogai et al., 2002) と推測される。

結 論

ヒト歯根膜由来線維芽細胞のfibrillin-1発現を抑制すると、fibrillin-1およびversicanの局在が変化することから、歯根膜中のfibrillin-1がversican沈着の足場として機能し、その分布の制御に関わることが示唆された。また適正量のfibrillin-1とversicanの結合が歯根膜におけるfibrillin-1とversicanの細網状局在に重要であることが示された。

参 考 文 献

- Ang LC, Zhang Y, Cao L, Yang BL, Young B, Kiani C, Lee V, Allan K & Yang BB. Versican enhances locomotion of astrocytoma cells and reduces cell adhesion through its G1 domain. *J Neuropathol Exp Neurol* 58 : 597-605, 1999.

- Beertsen W, Everts V & van den Hooff A. Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption. *Arch Oral Biol* 19 : 1087-1098, 1974.
- 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.
- Carmichael GG & Fullmer HM. The fine structure of oxytalan fibers. *J Cell Biol* 28 : 33-36, 1966.
- Cleary EG & Gibson MA. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. *Int Rev Connect Tissue Res* 10 : 97-209, 1983.
- Edmunds RS, Simmons TA, Cox CF & Avery JK. Light and ultrastructural relationship between oxytalan fibers in the periodontal ligament of the guinea pig. *J Oral Pathol* 8 : 109-120, 1979.
- Edwards JG. A study of the periodontium during orthodontic rotation of teeth. *Am J Orthod* 54 : 441-461, 1968.
- Fullmer HM & Lillie RD. The oxytalan fiber : a previously undescribed connective tissue fiber. *J Histochem Cytochem* 6 : 425-430, 1958.
- Fullmer HM, Sheetz JH & Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers : a review. *J Oral Pathol* 3 : 291-316, 1974.
- Greenlee TK Jr, Ross R & Hartman JL. The fine structure of elastic fibers. *J Cell Biol* 30 : 59-71, 1966.
- Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsura 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 β . *J Bone Miner Res* 14 : 1239-1249, 1999.
- Iozzo RV & Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment : clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 10 : 598-614, 1996.
- 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.
- Landolt RM, Vaughan L, Winterhalter KH & Zimmermann DR. Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* 121 : 2303-2312, 1995.
- 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. 281-314, 1994.
- Nakashima K, Tsuruga E, Hisanaga Y, Ishikawa H & Sawa Y. Stretching stimulates fibulin-5 expression and controls microfibril bundles in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 44 : 622-627, 2009.
- Ohno-Jinno A, Isogai Z, Yoneda M, Kasai K, Miyaishi O, Inoue Y, Kataoka T, Zhao JS, Li H, Takeyama M, Keene DR, Sakai LY, Kimata K, Iwaki M & Zako M. Versican and fibrillin-1 form a major hyaluronan-binding complex in the ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 2870-2877, 2008.
- 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 Gen* 62 : 233-242, 1996.
- Rosenbloom J, Abrams WR & Engvall E. Extracellular matrix 4 : The elastic fiber. *FASEB J* 7 : 1208-1218, 1993.
- Ross R & Bornstein P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol* 40 : 366-381, 1969.
- 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.
- Sakai LY, Keene DR, Glanville RW & Bachinger HP. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue of microfibrils. *J Biol Chem* 266 : 14763-14770, 1991.
- Simmons TA & Avery JK. Electron dense staining affinities of mouse oxytalan and elastic fibers. *J Oral Pathol* 9 : 183-188, 1980.
- Sims MR. Oxytalan fiber system of molars in the mouse mandible. *J Dent Res* 52 : 797-802, 1973.
- Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y & Yajima T. Expression of fibrillins and tropoelastin by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodont Res*

37 : 23-28, 2002.

Tsuruga E, Irie K & Yajima T. Gene expression and accumulation of fibrillin-1, fibrillin-2, and tropoelastin in cultured periodontal fibroblasts. *J Dent Res* 81 : 771-775, 2002.

Tsuruga E, Irie K & Yajima T. Fibrillin-2 degradation by matrix metalloproteinase-2 in periodontium. *J Dent Res* 86 : 352-356, 2007.

Tsuruga E, Nakashima K, Ishikawa H, Yajima T & Sawa Y. Stretching modulates oxytalan fibers in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 44 : 170-174, 2009.

Wight TN. Versican : a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 14 : 617-623, 2002.

Wilde J, Yokozeki M, Terai K, Kudo A & Moriyama K. The divergent expression of periostin mRNA in the periodontal ligament during experimental tooth movement. *Cell Tissue Res* 312 : 345-351, 2003.

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

Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM & Kimata K. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem* 64 : 8012-8018, 1989.

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.

Yamagata M & Kimata K. Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J Cell Sci* 107 : 2581-2590, 1994.

Yang BL, Zhang Y, Cao L & Yang BB. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem* 72 : 210-220, 1999.

Zhang Y, Cao L, Yang BL & Yang BB. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem* 273 : 21342-21351, 1998a.

Zhang Y, Cao L, Yang BL & Yang BB. The G3 domain of versican inhibits mesenchymal chondrogenesis via the epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem* 273 : 33054-33063, 1998b.

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



永坂 萌

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19年 3月 北海道医療大学歯学部卒業

平成24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24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
任期制助手