

総 説

—日本歯周病学会学術賞受賞—

歯周組織恒常性維持の分子基盤研究

—歯根膜特異的分子 PLAP-1 の解析—

山田 聡

大阪大学歯学部附属病院 口腔治療・歯周科

Molecular basis of periodontal tissue homeostasis
—analysis of periodontal ligament specific molecule, PLAP-1—

Satoru Yamada

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

はじめに

21世紀の初頭、ヒトゲノムの完全解読によりヒトゲノム計画は完了し、現在、生物学の世界はポストゲノム時代を迎えている。ポストゲノムにおいては、技術革新の結果、大規模な解析を短時間に効率よく行うことができ、トランスクリプトーム、プロテオームなど網羅的な発現解析や、バイオインフォマティクスを駆使した統計分析解析など様々な研究手法が確立されている。

これまでの生命科学では、生命現象を観察して、その原因や生物学的意義などを詳細に解析することにより、分子・遺伝子レベルでの解明を試みるという「生命現象から分子構造へ」と解析を進める研究の方向性が主にとられてきた。その結果、大きな研究成果が挙げられ、生命科学はめざましい発展をとげている。一方、ヒトゲノムの完全解読の結果、個々の遺伝子・分子情報はもとより、何千何万もの遺伝子・分子情報へ

のアクセスが可能となり、ゲノム本体の統合的・構造的な研究はもとより、個々の遺伝子・タンパク質の機能研究を行う際にも、各研究者が研究の出発点としてゲノムの情報体系を利用することが可能となっている。すなわち、個々の遺伝子・分子の配列・構造情報だけでなく、それに関連する疾患情報、他の遺伝子との発現パターン、他の分子との相互作用、他の動物モデルにおける機能あるいは関連するあらゆる研究文献へのリンク等のゲノム情報体系の利用が現実のものとなっている。つまり、「ゲノム情報から生命現象へ」解析を進めるという新しい研究方向が開かれたといえる。本稿では、この新しい研究アプローチを用いた歯周病学分野におけるポストゲノム研究について我々が展開している歯根膜のトランスクリプトーム解析を中心に論じてみたい。

歯根膜の遺伝子発現プロファイル解析

近年の研究から、歯周組織の中でも歯根膜は、歯周組織の恒常性維持および、歯周組織の修復・再生に中

連絡先：山田 聡

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-8

大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科

Satoru Yamada

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

E-mail: satoru@dent.osaka-u.ac.jp

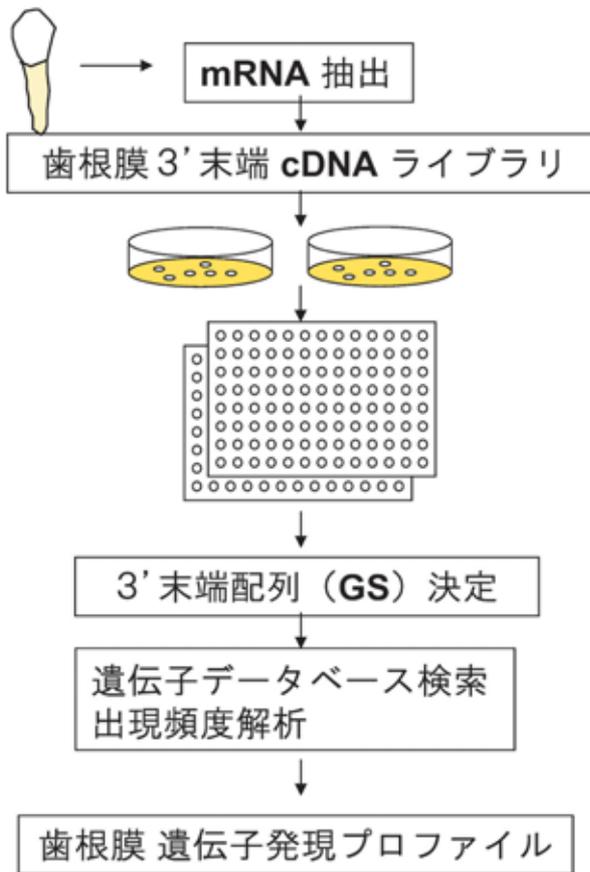


図1 ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル解析

歯根膜3'末端cDNAライブラリは、各cDNAクローンの挿入サイズが、3'末端のpoly Aから上流の約250 bpとなっており、逆転写酵素の効率やクローニング効率といった様々な2次的な影響を受けにくいことが特徴となっている。したがって、ライブラリ中のcDNAクローンの存在比率は、ソースとなった組織・細胞でのmRNA構成を正確に再現しているものと考えられる。

心的な役割を果たす最も重要な組織の一つであることが明らかとなっている。歯根膜は、歯と歯槽骨という2つの硬組織の間に存在する、コラーゲン線維に富む非石灰化組織である。正常な咬合状態にある歯の歯根膜組織は、0.15 mmから0.35 mmの幅を有し、咬合力、矯正力といったメカニカルストレスに反応して歯槽骨、セメント質、および結合組織のリモデリングを行い、歯周組織の動的平衡を保っていると考えられる¹⁾。さらに、歯根膜は、硬組織形成の制御に関わる分子やサイトカインを自ら分泌して歯周組織の再生をもたらす得ること、また、骨芽細胞やセメント芽細胞といった歯周組織再生に関与する細胞群へと分化する間葉系幹細胞のリザーバーとして機能していること

表1 ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル

GS	発現頻度	遺伝子名
1678	46	COLLAGEN TYPE I alpha-2
3880	45	COLLAGEN TYPE I alpha-1
4556	30	COLLAGEN TYPE III alpha-1
3371	22	OSTEONECTIN
2698	17	COLLAGEN TYPE I alpha-2
1851	17	COLLAGEN TYPE III alpha-2
0110	12	RIBOSOMAL PROTEIN L21
5214	8	PERIOSTIN
2282	8	RIBOSOMAL PROTEIN S18
0367	7	RIBOSOMAL PROTEIN L13a
5096	7	Unknown
1047	6	RIBOSOMAL PROTEIN L30
0226	6	TRANSLATIONALLY CONTROLLED I
1134	6	RIBOSOMAL PROTEIN 28S

も明らかとなってきた^{2, 3)}。事実、*in vitro*の培養系において、歯根膜由来の幹細胞が種々の刺激を受けることにより硬組織形成細胞へと分化し、石灰化ノジュールを形成することが報告されている⁴⁾。このような歯根膜細胞を特徴づける分子基盤を解明することは歯根膜の理解を深めるのみならず、歯周病の病理病態の解明、歯周組織再生の分子機構を解明する上で極めて有益な情報を提供するものと期待される。

ヒトの身体は、約60兆個の様々な形態や機能を有する細胞が相互に協調しながら形作られている。約60兆個の全ての細胞は、共通のゲノム30億塩基対をその核の中に含有し、そのゲノムは、全ての遺伝子を発現し機能するポテンシャルを有している。しかしながら、実際には、全ての組織・細胞において、全ての遺伝子が常に発現し機能しているわけではなく、各々の組織・細胞において、異なった遺伝子発現の組み合わせが存在し、その組み合わせのパターンこそが組織・細胞の多岐にわたる形態や機能といった特異性を導き、身体を形作っているといえる。このような身体の各組織・細胞における特有の遺伝子発現パターンを大規模・網羅的に解析することにより、各々の組織・細胞における遺伝子発現の組み合わせを解明し、分子生物学的な側面からその組織・細胞の特徴や特有の機能を明らかにしようとする組織遺伝子発現プロファイル解析がなされている⁵⁻⁷⁾。我々は、3'末端cDNAライブラリを用いた組織遺伝子発現プロファイル解析の手法を用いて歯根膜組織における遺伝子発現プロファイル解析を試みた⁸⁾。図1に示すように、矯正治療中の患者より便宜抜去された歯の歯根膜組織から得られた

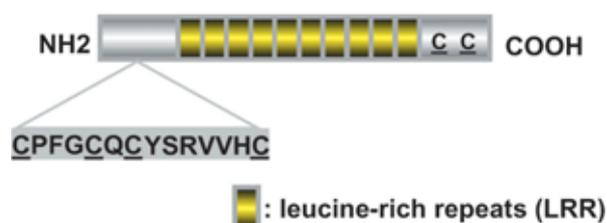


図2 PLAP-1 タンパクの構造

PLAP-1 は、中央部に 10 個の連続した leucine-rich repeats (LRR)、N 末端および C 末端に保存されたシステイン配列を有し、small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) ファミリーに属する。

mRNA より歯根膜 3' 末端 cDNA ライブラリを構築した。このライブラリ中の cDNA クローンの存在比率は *in vivo* 歯根膜での恒常的な mRNA 構成を正確に再現しているものと考えられる。次に無作為に選択した 1752 個の cDNA クローンの塩基配列を DNA シークエンサーにて解読し、歯根膜組織において発現している遺伝子の 3' 末端配列 (Gene signature : GS) を決定した。コンピューター解析による出現頻度および遺伝子バンクへの相同性検索を行い、歯根膜組織遺伝子発現プロファイルを作成した (頻度 6 以上を表 1 に示す)。

歯根膜は形態的にコラーゲン線維に富んだ結合組織であり、そのコラーゲン線維を構成する主要な成分は I 型及び III 型コラーゲンである。ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイル解析の結果、*COLLAGEN TYPE I alpha-1, -2*, 及び *COLLAGEN TYPE III alpha-1, -2* 遺伝子の高発現を認め、歯根膜の特徴を遺伝子発現の側面からも裏付けた。また、*RIBOSOMAL PROTEIN* 遺伝子の高い発現を認めており、歯根膜組織ではコラーゲンの生合成が盛んに行われ、結合組織のリモデリングが恒常的に行われていることが推測される。次いで高い発現を認める *OSTEONECTIN* 遺伝子のコードするタンパクは、骨において豊富に見られる非コラーゲン性の基質タンパクであり、骨芽細胞から分泌され、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた系において石灰化ノジュールの形成にあわせてその発現が上昇するとの報告がある⁹⁾。また、歯根膜細胞においては、*OSTEONECTIN* タンパクの発現上昇が *MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPs)* の産生を亢進させる結果、*MMPs* が細胞外基質を分解し、細胞外の微小環境を変化させ、歯根膜細胞の増殖を促進していると考えられている¹⁰⁾。これらの知見より *OSTEONECTIN* は歯根膜組織のリモデリングを調整すると同時に硬組織形成に関与する分子であると考えられる。また、

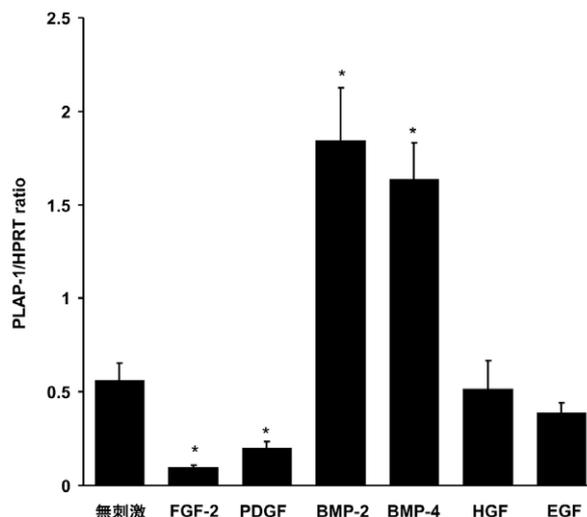


図3 各種サイトカインによる PLAP-1 発現制御
各種サイトカインにてヒト歯根膜細胞を 48 時間刺激した際の PLAP-1 の遺伝子発現を、HPRT 遺伝子発現を基準とした Real-time PCR により解析した。 *p < 0.05

PERIOSTIN 遺伝子の高い発現も同時に認められた。*PERIOSTIN* 遺伝子は MC3T3-E1 の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、骨芽細胞の前駆細胞を遊走させ、歯槽骨及び歯根膜組織のリモデリングを行っていると考えられている^{11, 12)}。この *OSTEONECTIN* 及び *PERIOSTIN* 遺伝子の高発現は、ヒト歯根膜組織の硬組織形成能を裏付けるものと考えられる。ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイル解析の結果、新陳代謝の活発な線維性結合組織でありながら高い硬組織形成能を持つ歯根膜の組織特異性を、遺伝子発現状況の側面から忠実に再現することができたと考えられる。

新規細胞外基質 PLAP-1 の同定

歯根膜組織遺伝子発現プロファイルの中に、出現頻度 7 という高発現を示すにもかかわらず、遺伝子バンクに登録されていない全く未知の新規 3' 末端配列 (GS5096) が発見された (表 1)。全長 cDNA クローニングの結果、この遺伝子は全長 2.5 kbp で、382 アミノ酸をコードする新規の遺伝子であることが明らかとなった (図 2)。我々は、この遺伝子を *PLAP-1 (periodontal ligament associated protein-1)* と命名し、予想されるタンパク質をプロテインデータベースにて検索したところ、興味深いことに、細胞外基質プロテオグリカンである *DECORIN* および *BIGLYCAN* に対して非常に高い相同性を有する分子で、small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) ファミリーの新

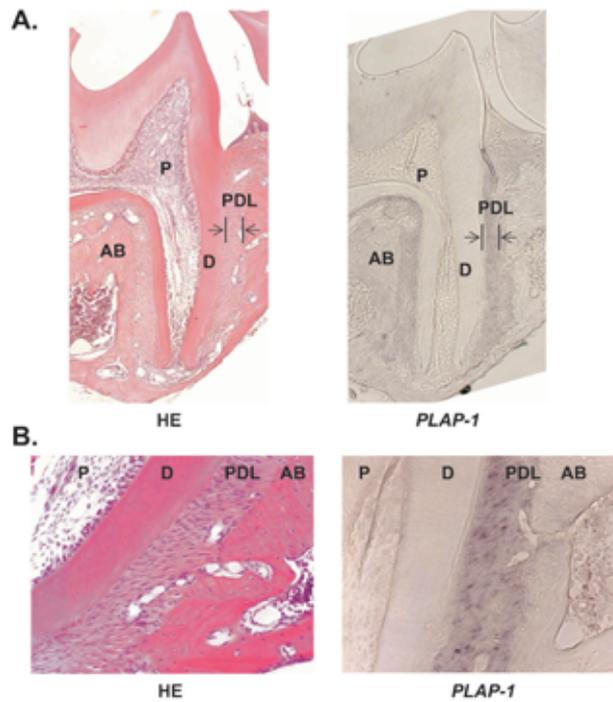


図4 歯根膜組織における *PLAP-1* 発現

A. マウス上顎組織における *PLAP-1* 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した。倍率 50 倍，HE：ヘマトキシリン・エオジン染色，*PLAP-1*：*PLAP-1* 遺伝子検出用アンチセンスプローブ
B. A の拡大像を示す。倍率 200 倍，P：歯髄，D：象牙質，PDL：歯根膜，AB：歯槽骨

しいメンバーあることが明らかとなった⁸⁾。DECORIN および BIGLYCAN は、これまで骨の形成や形態維持に重要な役割を果たしている事が報告されている^{13, 14)}。一方、ヒトの身体を構成する各組織より作成した臓器別遺伝子発現プロファイルデータベース化した東大医科研 BodyMap データベース¹⁵⁾を遺伝子検索した結果、*PLAP-1* は、わずか心臓結合組織および表皮乳頭状組織においてのみ、それぞれ一回の発現頻度でしか検出されなかった。これらの結果より、*PLAP-1* は歯根膜組織に特徴的に発現されており、その遺伝子産物である PLAP-1 タンパクは細胞外基質として、歯根膜における硬組織形成に関与している可能性が示唆された⁸⁾。

そこで、硬組織形成を誘導した培養歯根膜細胞において *PLAP-1* の発現を解析したところ、硬組織形成に伴ってその遺伝子発現が亢進することが示された。さらに、各種増殖因子による *PLAP-1* 発現への影響を検討ところ、骨形成誘導能を持つ BMP-2 および BMP-4 によって、*PLAP-1* の発現が誘導され、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) 添加により *PLAP-1* の発現が著明に抑制された (図 3)。すなわち *PLAP-1* は硬組織形成の過程でそれらサイトカインにより発

現制御を受けている可能性が示唆された¹⁶⁾。

歯根膜組織における *PLAP-1* の特異的発現

次に、生体内における *PLAP-1* の発現を解析するために、RT-PCR によりマウスの各臓器における遺伝子発現を検討した。その結果、*PLAP-1* は、歯周組織を含む上顎組織サンプルにおいて高い発現を示した¹⁷⁾。そこで、歯周組織における詳細な発現を明らかにするため、マウス上顎において *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。その結果、*PLAP-1* は、歯周組織のうちでも歯根膜に特異的に発現しており、歯肉や口腔上皮、歯槽骨、骨膜などには全くその発現が認められないことが明らかとなった (図 4)。歯根膜での詳細な発現を解析してみると、*PLAP-1* 遺伝子は歯根膜中央部に強く発現しており、セメント質および歯槽骨側での発現は弱いことが明らかとなり、*PLAP-1* は、歯根膜組織内でもその発現分布があることが示された。さらに、抗 *PLAP-1* 特異抗体による免疫組織染色を行ったところ、*PLAP-1* タンパクの歯根膜特異的な発現が確認されたことから、*PLAP-1* は歯根膜特異的分子であることが明らかとなった。

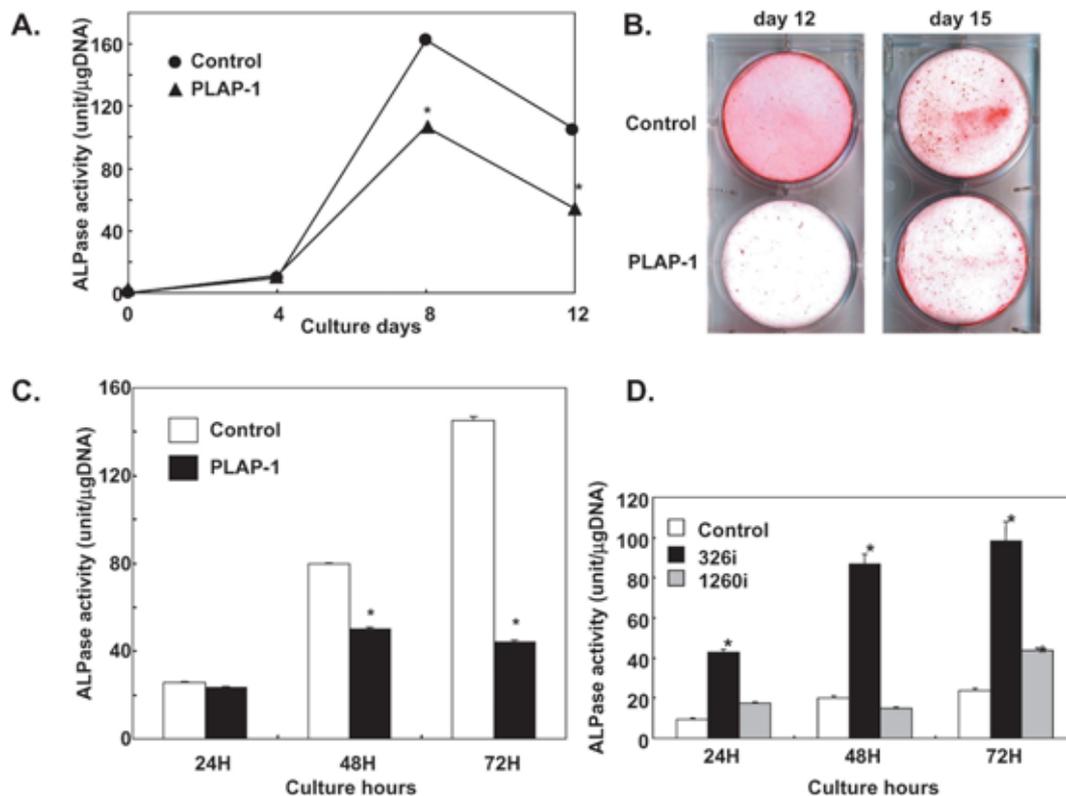


図5 歯根膜組織における *PLAP-1* 発現

- A. *PLAP-1* 強発現の ALPase 活性への影響。*PLAP-1* 強発現 MPDL22 株を石灰化誘導培地にて細胞分化誘導を行った。培養 4, 8, 12 日目に細胞分化マーカーである ALPase 活性を測定した。●: MPDL22 対照株, ▲: *PLAP-1* 強発現 MPDL22 株 * $p < 0.05$
- B. *PLAP-1* 強発現の石灰化物形成への影響。A の条件で培養した *PLAP-1* 強発現 MPDL22 株の培養 12 日, 15 日目における石灰化物形成をアリザリン染色にて検討した。
- C. BMP-2 誘導性の歯根膜細胞分化への影響。BMP-2(100 ng/ml)で刺激した *PLAP-1* 強発現 MPDL22 株の刺激後, 24, 48, 72 時間後における ALPase 活性を測定した。Control: MPDL22 対照株, *PLAP-1*: *PLAP-1* 強発現 MPDL22 株 * $p < 0.05$
- D. RNAi による内在性 *PLAP-1* 抑制の影響。BMP-2(100 ng/ml)で刺激した内在性 *PLAP-1* 抑制 MPDL22 株の刺激後, 24, 48, 72 時間後における ALPase 活性を測定した。Control: コントロール RNAi 導入 MPDL22 株, 326i: 内在性 *PLAP-1* 抑制 MPDL22 株, 1260i: 内在性 *PLAP-1* 抑制 MPDL22 株(内在性 *PLAP-1* 発現: 326i < 1260i) * $p < 0.05$

PLAP-1 による歯根膜細胞の硬組織形成分化抑制

次に, *in vitro* において *PLAP-1* 遺伝子を歯根膜細胞に強発現させ, その細胞分化過程に及ぼす影響を検討することにより, *PLAP-1* 機能の解析を試みた。まず, *PLAP-1* タンパクを強発現させる発現ベクターを構築し, 我々の研究室で樹立したマウス歯根膜細胞株 MPDL22^{17, 18)} へ遺伝子導入することにより *PLAP-1* 強発現 MPDL22 株を作製した¹⁷⁾(図 5)。

PLAP-1 強発現 MPDL22 株を用いて, 石灰化誘導培地での長期培養による細胞分化誘導を行った。コンフルエント状態に達した *PLAP-1* 強発現 MPDL22 株を石灰化誘導培地にて培養し, 培養 4, 8, 12 日目にお

ける ALPase 活性を測定した。その結果, 興味深いことに *PLAP-1* 強発現 MPDL22 株において, 長期培養に伴う ALPase 活性の上昇が対照株と比較して低いレベルにあることが明らかとなり, 特に培養 8 日目及び 12 日目の時点で有意に低い ALPase 活性を示した(図 5A)。さらに石灰化物形成に対する影響について検討するために, アリザリンレッド染色にて比較を行った。対照株においては著明なアリザリンレッド染色像が確認される一方, *PLAP-1* 強発現 MPDL22 株ではほとんどアリザリンレッド染色像が認められず, 石灰化物形成が抑制されていることが示された(図 5B)。以上のことから *PLAP-1* は, 歯根膜細胞の硬組

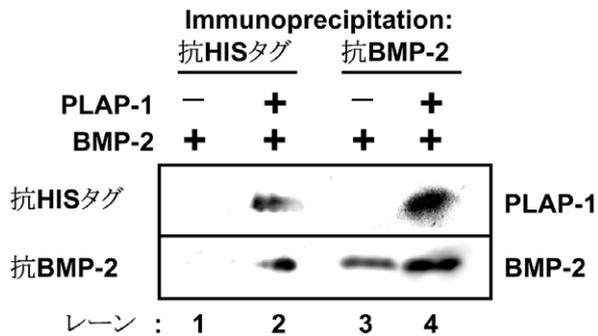


図6 PLAP-1とBMP-2との直接的結合

His タグ標識 PLAP-1 タンパクと BMP-2 とを混和後、抗 His タグ抗体を用いた免疫沈降実験(レーン 1 と 2)および抗 BMP-2 抗体を用いた免疫沈降実験(レーン 3 と 4)を行った。免疫沈降後、抗 His タグ抗体あるいは抗 BMP-2 抗体によるウエスタンブロッティング法にて共沈タンパクを検出した。

組織形成分化を抑制することが明らかとなった。

PLAP-1 による BMP-2 アンタゴニストとしての機能

次に、BMP-2 が PLAP-1 の遺伝子発現を著明に誘導したことから、PLAP-1 と BMP-2 との機能的関連性について検討を行った。PLAP-1 強発現 MPDL22 株を BMP-2(100 ng/ml)で刺激し、刺激後 24, 48, 72 時間後における ALPase 活性を測定したところ、対照株では BMP-2 刺激により経時的に ALPase 活性の上昇が認められたが、PLAP-1 強発現 MPDL22 株では、刺激後 48 及び 72 時間において有意に ALPase 活性が抑制されていた(図 5C)。さらに、内在性 PLAP-1 の発現を PLAP-1 特異的 RNAi にて抑制した場合の BMP-2 に対する反応性を検討した。その結果、内在性 PLAP-1 抑制 MPDL22 株では、BMP-2 誘導性の ALPase 活性が有意に向上していることが明らかとなった(図 5D)。この ALPase 活性の向上は、RNAi の効果がより強い 326i 株において高く認められた。以上のことから、PLAP-1 は、歯根膜細胞において BMP-2 の作用を抑制的に制御していることが示された。

PLAP-1 と相同性の高い Decorin や Biglycan は、TGF- β と結合しその作用を制御していることが報告されている¹⁹⁾。さらに、Biglycan と BMP-4 との相互作用についても報告されていることから¹⁴⁾、PLAP-1 は BMP-2 と直接的に結合することにより BMP-2 の作用を制御している可能性が考えられた。

そこで、His タグ標識のリコンビナント PLAP-1 を作製し、PLAP-1 と BMP-2 の 2 つのタンパクを試験

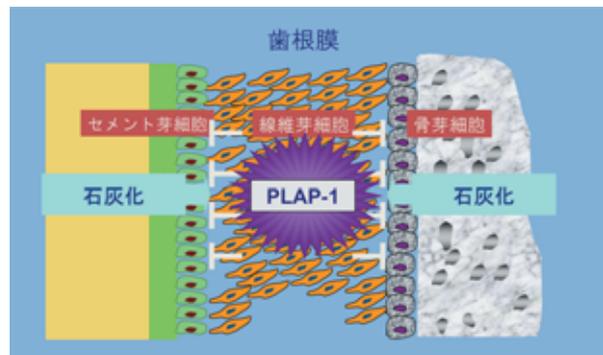


図7 PLAP-1による歯根膜の組織恒常性維持モデル

PLAP-1は歯根膜に特異的に発現し、細胞外基質タンパクとして分泌される。歯根膜は、潜在的に硬組織形成能を有する細胞を保有しているが、生理的状态においては PLAP-1 が恒常的に発現することにより細胞分化による硬組織形成を抑制し、一定の幅を保った軟組織として機能すると考えられる。

管内でインキュベーションした後、抗 His タグ抗体による免疫沈降実験を行った。その結果、BMP-2 は PLAP-1 と複合体を形成し、共沈することが明らかとなった(図 6)。さらに、抗 BMP-2 抗体を用いた免疫沈降実験においても PLAP-1 は、BMP-2 と共沈することが示されたことから、PLAP-1 と BMP-2 との直接的なタンパク結合が明らかとなった。さらに、PLAP-1 は BMP-2 が BMP-2 受容体(BMPRII)に結合するのを阻害することで細胞内 SMAD シグナルを抑制すること、その際、PLAP-1 の 5 番目の leucine-rich repeats (LRR5) が重要な役割を果たしていることが明らかとなり²⁰⁾、PLAP-1 は BMP-2 のアンタゴニストとして機能することが示された。

歯根膜における PLAP-1 の機能について考察したい。図 7 に示すように、歯根膜はセメント質と歯槽骨に挟まれた結合組織であり、それぞれの硬組織に沿ってセメント芽細胞や骨芽細胞など、高い石灰化能を有する細胞が多数存在している。このような環境において、PLAP-1 は歯根膜の中央部に位置する線維芽細胞様の細胞に特徴的に発現し、細胞外へ分泌型タンパクとして分泌され、BMP-2 等による硬組織形成細胞への分化シグナル伝達を競合的に阻害することで硬組織形成を抑制し、硬組織形成能を有しながらも生理的な条件下では軟組織として機能する歯根膜の恒常性維持に役割を果たす分子であると考察することができる。現在、我々の研究室では、PLAP-1 トランスジェニックマウスを作製している。歯周組織における表現型を解析することにより、PLAP-1 の詳細な *in vivo* 機能の解明が期待される。

おわりに

歯周組織の恒常性維持および歯周組織の再生・修復において中心的な役割を果たしている歯根膜について、我々がこれまでに進めてきた PLAP-1 解析を中心とした研究をご紹介します。興味深いことに、他の複数の研究グループが、我々と同時期に相次いで PLAP-1 と同一の遺伝子を心臓または膝軟骨からクローニングし、Asporin と名付けている^{21, 22)}。最近、遺伝子多型解析の結果、PLAP-1/Asporin が変形性関節症の原因遺伝子であり、TGF- β の作用を阻害することにより関節軟骨の再生・修復を制御していることも明らかとなっている²³⁾。関節軟骨は、細胞外基質が豊富で関節に加わるメカニカルストレスを緩和するクッションとしての機能も有し、歯根膜との形態的・機能的類似性が高い組織と思われることから、PLAP-1/Asporin が、歯根膜あるいは関節軟骨といった特殊な組織において、組織恒常性の維持や再生・修復の中心的な役割を果たしている重要な因子の一つであることが示唆される²⁴⁾。今後は、歯周病の発症機序や病理病態と PLAP-1/Asporin との関連性についても解明していくことが必要であろう。

文 献

- 1) Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J : The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000, 13: 20-40, 1997
- 2) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364: 149-155, 2004
- 3) Bartold PM, Shi S : Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000, 40: 164-172, 2006
- 4) Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res*, 67: 66-70, 1988
- 5) Okubo K, Hori N, Matoba R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima Y, Matsubara K : Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet*, 2: 173-179, 1992
- 6) Izawa D, Tanaka T, Saito K, Ogihara H, Usui T, Kawamoto S, Matsubara K, Okubo K, Miyasaka M : Expression profile of active genes in mouse lymph node high endothelial cells. *International immunology*, 11: 1989-1998, 1999
- 7) Shimizu-Matsumoto A, Adachi W, Mizuno K, Inazawa J, Nishida K, Kinoshita S, Matsubara K, Okubo K : An expression profile of genes in human retina and isolation of a complementary DNA for a novel rod photoreceptor protein. *Investigative ophthalmology & visual science*, 38: 2576-2585, 1997
- 8) 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
- 9) Kelm RJ, Jr., Swords NA, Orfeo T, Mann KG : Osteonectin in matrix remodeling. A plasminogen-osteonectin-collagen complex. *J Biol Chem*, 269: 30147-30153, 1994
- 10) Fujita T, Shiba H, Sakata M, Uchida Y, Ogawa T, Kurihara H : Effects of transforming growth factor- β 1 and fibronectin on SPARC expression in cultures of human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int*, 26: 1065-1072, 2002
- 11) 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
- 12) Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa 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 beta. *J Bone Miner Res*, 14: 1239-1249, 1999
- 13) Schaefer L, Iozzo RV : Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem*, 283: 21305-21309, 2008
- 14) Chen XD, Fisher LW, Robey PG, Young MF : The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *Faseb J*, 18: 948-958, 2004
- 15) Okubo K, Matsubara K : Complementary DNA sequence (EST) collections and the expression information of the human genome. *FEBS letters*, 403: 225-229, 1997
- 16) Yamada S, Ozawa Y, Tomoeda M, Matoba R, Matsubara K, Murakami S : Regulation of PLAP-1 Expression in Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res*, 85: 447-451, 2006
- 17) Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S,

- Terashima Y, Ikezawa K, Ikegawa S, Saito M, Toyosawa S, Murakami S : PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem*, 282: 23070-23080, 2007
- 18) Terashima Y, Shimabukuro Y, Terashima H, Ozasa M, Terakura M, Ikezawa K, Hashikawa T, Takedachi M, Oohara H, Yamada S, Murakami S : Fibroblast growth factor-2 regulates expression of osteopontin in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*, 216: 640-650, 2008
- 19) Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E : Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*, 302 (Pt 2): 527-534, 1994
- 20) Tomoeda M, Yamada S, Shirai H, Ozawa Y, Yanagita M, Murakami S : PLAP-1/asporin inhibits activation of BMP receptor via its leucine-rich repeat motif. *Biochem Biophys Res Commun*, 371: 191-196, 2008
- 21) Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegard D : Identification and characterization of asporin. a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem*, 276: 12201-12211, 2001
- 22) Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrughe B, Hook M, Mayne R : Expression pattern and gene characterization of asporin. a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem*, 276: 12212-12221, 2001
- 23) Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, Mabuchi A, Kotani A, Kawakami A, Yamamoto S, Uchida A, Nakamura K, Notoya K, Nakamura Y, Ikegawa S : An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet*, 37: 138-144, 2005
- 24) Ikegawa S : Expression, regulation and function of asporin, a susceptibility gene in common bone and joint diseases. *Curr Med Chem*, 15: 724-728, 2008
-