

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06492

研究課題名(和文)新規アメロジェニン会合分子Grp78の誘導を介した歯周組織再生治療に向けて

研究課題名(英文)The periodontal regeneration therapy with novel amelogenin binding protein Grp78

研究代表者

豊田 敬介 (Toyoda, Kyosuke)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70757947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規アメロジェニン会合分子 Glucose regulated protein 78 (Grp78) が歯周組織再生に与える影響を検証するためヒト歯根膜幹細胞/前駆細胞株である1-17を用いて、アメロジェニン(rM180)とGrp78の生物学的相互作用を検討した。その結果、rM180刺激がTGF-beta経路と細胞遊走関連経路を活性化すると同時にGrp78発現量が細胞遊走関連遺伝子群の発現制御に関与することを解明した。細胞機能の解析において、rM180刺激とGrp78強発現は1-17細胞の細胞遊走能と細胞接着能を促進した。さらに1-17細胞で著明な葉状仮足形成の促進が認められた。

研究成果の概要(英文)：Our recent proteomic study identified glucose-regulated protein 78 (Grp78) as a new amelogenin-binding protein. we demonstrate the cellular responses induced by the biological interaction between amelogenin and Grp78 in the human undifferentiated PDL cell line 1-17, which possesses the most typical characteristics of PDLSCs. Microarray analysis indicated that rM180 and Grp78 regulate the expression profiles of cell migration-associated genes in 1-17 cells. Moreover, Grp78 overexpression enhanced rM180-induced cell migration and adhesion without affecting cell proliferation, while silencing of Grp78 diminished these activities. Finally, binding of rM180 to Grp78 promoted the formation of lamellipodia, and the simultaneous activation of Rac1 was also demonstrated by NSC23766, a widely accepted Rac1 inhibitor. These results suggest that Grp78 is essential for enhancing amelogenin-induced migration in 1-17 cells.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：アメロジェニン Grp78

1. 研究開始当初の背景

歯周組織はセメント質・歯根膜・歯槽骨・歯肉により構成されているが、特に歯根膜は歯根周囲を覆うだけでなく歯槽骨と歯を連結しており、歯の維持に必須である。さらに歯根膜は、歯周組織の再生過程において中心的役割を果たす歯根膜幹細胞 (PDLSCs) の供給源として注目されている。PDLSCs は自己複製能を持ち、微小環境に応じて線維芽細胞、骨芽細胞、またはセメント芽細胞に分化する。そのため歯周組織再生の初期段階において、これら PDLSCs を歯周組織欠損部位へ誘導することが極めて重要なステップとなる。

EMD の主要成分 (> 95%) であるアメロジェニンは、ECM 蛋白の 1 種である。アメロジェニンは歯の成長過程においてエナメル芽細胞により分泌され、歯根象牙質表層に沈着する。その結果、アメロジェニンがセメント質および歯根膜の形成を誘導し、歯槽骨の石灰化を促進する。そのためアメロジェニンは、歯周組織再生を誘導する生物活性分子の一つであると位置づけられている。EMD の歯周組織再生効果について、エナメル基質蛋白の他の成分が組織再生に関与している可能性がある一方で、最近の研究では組み換えアメロジェニン単独でも、動物実験で歯周組織の再生を誘導することが報告された。

2. 研究の目的

私たちはこれまでの研究でアメロジェニンの生理活性機序の解明を目的として、完全長の組換えアメロジェニン (rM180) と骨芽細胞を用いてアメロジェニン結合タンパクのスクリーニングを行った。その結果、Glucose regulated protein 78 (Grp78) が骨芽細胞の細胞質分画および細胞膜分画の両分画で唯一同定された。Grp78 は熱ショックタンパク質 70 (HSP70) ファミリーに属しており、小胞体分子シャペロンや小胞体ストレスのシグナル伝達経路の調節因子として知られている。Grp78 は主に小胞体に存在しているが、小胞体ストレス刺激により細胞膜上へと誘導され、受容体としてシグナル伝達に関与するといわれている。さらに、Grp78 の細胞表面への局在が腫瘍細胞の浸潤と遊走に関連することも報告されている。

本研究では、アメロジェニンと Grp78 間の生物学的相互作用が PDLSCs の細胞応答に及ぼす影響について解析を行った。

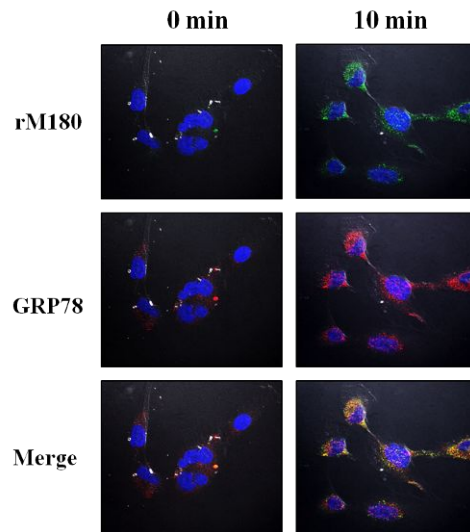
3. 研究の方法

PDLSCs を証明する決定的なマーカーは未だ不明であるため、実験にはヒト多能性歯根膜幹細胞/前駆細胞株である 1-17 細胞を使用した。さらに、PDLSCs に Grp78 強発現ベクター、siRNA を導入し、細胞内シグナル伝達経路をウエスタンブロッティング法により解析した。また、アメロジェニンが PDLSCs の細胞機能に及ぼす影響について検証した。

4. 研究成果

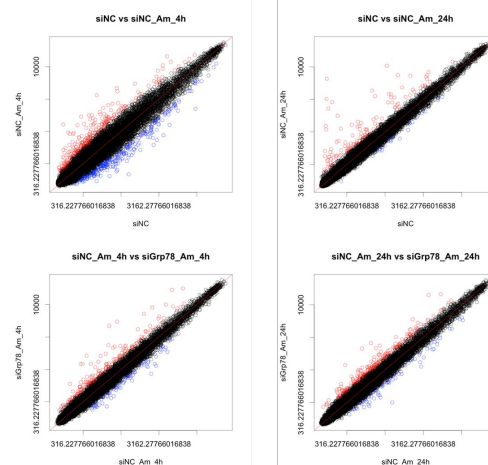
Grp78 は PDLSCs においてアメロジェニンのエンドサイトーシスを媒介する。

rM180 添加、無添加時の Grp78 の 1-17 細胞内局在を非透過処理条件下で確認した。rM180 の添加前にも発現量は少ないが Grp78 は 1-17 細胞の細胞膜上に限局して発現している。rM180 添加 10 分後では rM180 は細胞膜に付着するだけでなく、細胞膜上で発現している Grp78 との共局在が確認された。以上より、外因性の rM180 刺激と 1-17 細胞に発現している Grp78 は相互作用を示し、アメロジェニンの細胞内取り込みが細胞膜上に発現している Grp78 を介して行われることが示唆された。

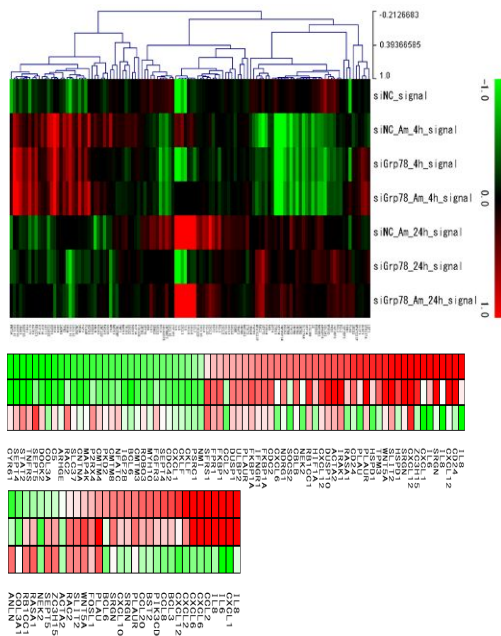


PDLSCs においてアメロジェニン刺激は TGF-beta 経路を活性化し、Grp78 の発現レベルは細胞遊走関連遺伝子群の発現プロファイルに影響を及ぼす。

続いて、細胞に Grp78siRNA を導入し、rM180 刺激を行った場合、rM180 刺激後 4 時間の細胞では、rM180 刺激後 24 時間の細胞より多くの遺伝子発現変動が起こっていた。アメロジェニン刺激は転写レベルで比較的早期の遺伝子発現変動が生じていたが、24 時間でほぼ沈静化傾向にあった。



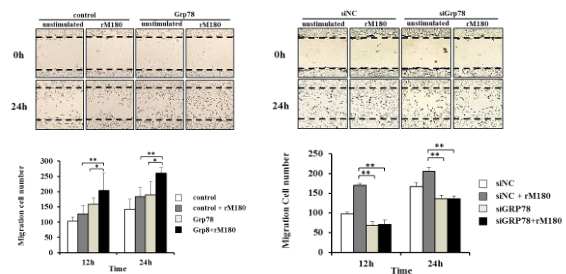
さらに、機能的情報についてクラスター解析を行った結果、最上位の enrichment 値のグループは“cell migration”、“cell localization”、“cell motility”および“cell movement”といった細胞遊走関連用語でしめられていた。TGF-beta が歯根膜細胞の生理活性に及ぼす効果も考慮したうえで、細胞遊走効果に注目した。PDLSCs の細胞遊走能は歯周組織再生過程において重要な機能を担っているため、アメロジェニンおよび Grp78 が細胞遊走関連遺伝子群の発現に及ぼす影響について遺伝子変動プロファイルを解析した。1-17 細胞において、以下の項目でふるい出した。 siRNA の種類 (コントロール、Grp78) rM180 刺激の有無、 rM180 の刺激時間 (0, 4, 24 時間) 遺伝子用語に基づき抽出された 116 の細胞遊走関連遺伝子について、クラスター解析したヒートマップを作成してサンプル間の比較を行った。また、4 時間後および 24 時間において、有意な発現変動 ($|\log_{2}FC| \geq 0.5$) がみられた遊走関連遺伝子を抽出し比較解析を行った。発現変動遺伝子数は 72 遺伝子 (4 h) から 32 遺伝子 (24 h) への減少し、アメロジェニン刺激と Grp78 ノックダウンでは同様の遺伝子発現傾向が認められた。また、アメロジェニン刺激中の Grp78 の影響での発現プロファイルはかなり異なっていた。この比較プロファイルは相反する傾向にあったため、大部分のアメロジェニン誘導遺伝子が Grp78 の発現レベルの影響を受けることが示唆された。



アメロジェニン誘導性の細胞遊走活性は Grp78 依存性である

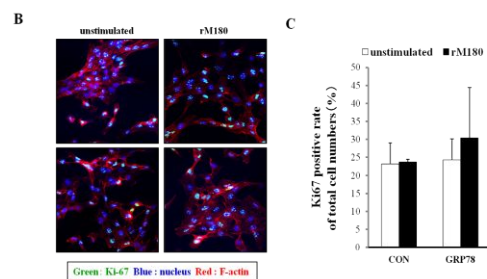
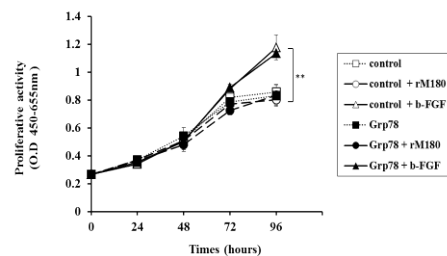
in vitro において Grp78 とアメロジェニンの相互作用が細胞遊走に与える影響を検討するため、創傷治癒モデルアッセイによる細胞遊走能実験を行った。24 時間時点で、rM180 刺激もしくは Grp78 強発現のみでも細胞遊走を促進したが、Grp78 強発現 1-17 細胞に

rM180 刺激を添加すると、さらに細胞遊走が促進した。対照的に、Grp78 のノックダウン群では細胞遊走が抑制されるだけでなく rM180 誘導性細胞遊走の効果も減少した。



アメロジェニン刺激および Grp78 の発現変動は、PDLSCs の細胞増殖能に影響しない。

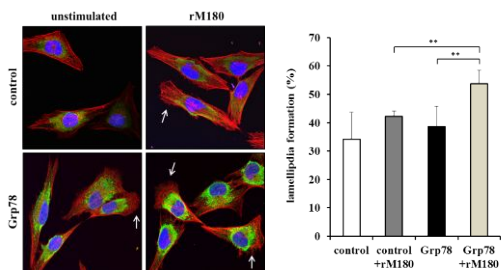
細胞増殖の亢進に伴い起こった現象かどうかを検証するため、1-17 細胞の細胞増殖能に対する Grp78 強発現およびアメロジェニン刺激の効果、WST-8 アッセイならびに Ki-67 染色細胞増殖アッセイにより評価した。WST-8 アッセイでは b-FGF 刺激 (50 ng/mL) をポジティブコントロールとして使用した。ポジティブコントロールを除いた群間において細胞増殖率に有意な差は認められなかった。また、Ki-67 染色においても同様の結果が得られ、rM180 の存在、非存在下での Grp78 強発現は Ki-67 陽性細胞の割合に影響を及ぼさなかった。



PDLSCs におけるアメロジェニン刺激および Grp78 の強発現は Lamellipodia (葉状仮足) の形成を促進する

一般的に、細胞遊走には細胞骨格の再構成と細胞形態の変化が必要であることが知られている。特に移動方向に対しては、葉状仮足や糸状仮足に代表される細胞周囲への突起の形成が重要になる。アメロジェニンと Grp78 が、細胞遊走に伴うアクチン構造や細胞形態の変化に及ぼす影響を検討した。1-17 細胞の細胞骨格を染色し、各条件での細胞の

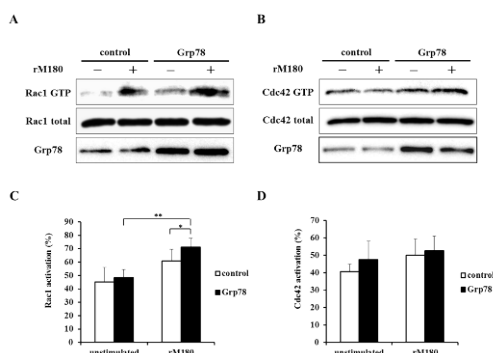
形態を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、アメロジェニン刺激を加えた Grp78 強発現 1-17 細胞において、葉状仮足を呈する細胞数の著明な増加が認められた。一方、糸状仮足の形成には変化が認められなかった。そこで、各条件下での葉状仮足を呈する細胞の割合を測定した。1-17 細胞において Grp78 の強発現は葉状仮足の形成を促進したが、rM180 刺激を加えることにより、さらに葉状仮足の陽性率が有意に増加した



アメロジェニン刺激によって Rac1 が活性化し、Grp78 を強発現量させると、さらに Rac1 活性は増強する。

Rho ファミリー G タンパク質が細胞極性と細胞骨格の動態を制御することは広く知られている。中でも Rho ファミリー G タンパク質の Rac1/Cdc42 は糸状仮足、葉状仮足の形成において重要な分子である。これまでの実験結果において、細胞遊走と葉状仮足形成が増加したことから、アメロジェニンと Grp78 の相互作用が Rac1/Cdc42 の活性化に関わっている可能性が生じた。そこで、Rac1/Cdc42 の活性を検討するため、Rac1/Cdc42 が特異的に結合する PAK1 ビーズを使用したプルダウンアッセイにより検討した。その結果、アメロジェニン刺激および Grp78 強発現群では総 Rac1 レベルの変動なしに、活性型 Rac1 の発現量が亢進した。特に Grp78 強発現細胞にアメロジェニン刺激を加えた実験群で、最も活性型 Rac1 が増加した。一方、活性型 Cdc42 はどの条件下でも有意な差は認められなかった。これらの結果は、アメロジェニンと Grp78 の相互作用によって誘導される葉状仮足の形成や細胞遊走の促進に、Rac1 の活性が関与していることを示唆している。

結論として、本研究では Grp78 とアメロジェニンの生物学的相互作用が、PDLSCs 細胞株である 1-17 細胞の細胞増殖能に影響を与えることなく、アメロジェニン誘導性細胞遊走・細胞接着を促進させることを示し、さらに Rac1 の活性化と葉状仮足の形成がアメロ



ジェニン誘導性細胞遊走の重要なステップであることを示した。今回得られた知見はアメロジェニンによって誘導される歯周組織再生の機能の一端を解明する重要な分子基盤の一つと考えられる。

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)

[雑誌論文](計4件)

1. Sanui T, Fukuda T, Yamamichi K, Toyoda K, Tanaka U, Yotsumoto K, Taketomi T, Nishimura F. (2017), Microarray analysis of the effects of amelogenin on U937 monocytic cells. *American Journal of Molecular Biology*, 7(2): 107-122.
2. Sanui T, Fukuda T, Tanaka U, Toyoda K, Yamamichi K, Taketomi T, Nishimura F. (2016) Biological effects of Sprouty2 inhibition in periodontal ligament cells. *Journal of Cell Signaling*, 1: 117. doi:10.4172/jcs.1000117.
3. Atomura R, Sanui T, Fukuda T, Tanaka U, Toyoda K, Taketomi T, Yamamichi K, Akiyama H, Nishimura F. (2016), Inhibition of Sprouty2 polarizes macrophages toward an M2 phenotype by stimulation with interferon and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Immunity, Inflammation and Disease*, 4(1): 98-110.
4. Toyoda K, Fukuda T, Sanui T, Tanaka U, Yamamichi K, Atomura R, Maeda H, Tomokiyo A, Taketomi T, Uchiumi T, Nishimura F. (2016), Grp78 is critical for amelogenin-induced cell migration in a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. *Journal of Cellular Physiology*, 231:414-427.

[学会発表](計7件)

1. 讚井彰一、四本かれん、豊田敬介、福田隆男、田中麗、山道研介、西村英紀。(2017.05.13. 福岡市) 限局性侵襲性歯周炎患者にエナメルマトリックステリパティブによる歯周組織再生療法を行った一症例. 第60回春季日本歯周病学会学術大会.
2. 山道研介、福田隆男、讚井彰一、豊田敬介、田中麗、西村英紀: アメロジェニンが有する抗炎症効果の機序解明 平成28年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部・合同研修会、長崎県歯科医師会館、長崎市、2016. 11. 6.
3. Kensuke Yamamichi, Hajime Akiyama,

- Takao Fukuda, Terukazu Sanui, **Kyosuke Toyoda**, Urara Tanaka, Takaharu Taketomi, Fusanori Nishimura: Amelogenin Modulates Macrophage Phenotype During Inflammatory Responses. 94th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Seoul, South Korea, 2016. 6. 22-25.
4. **Kyosuke Toyoda**, Hajime Akiyama, Takao Fukuda, Terukazu Sanui, Urara Tanaka, Takaharu Taketomi, Fusanori Nishimura: Grp78 is crucial for cell migration induced by amelogenin in a human periodontal ligament cells. 94th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Seoul, South Korea, 2016. 6. 22-25.
 5. Terukazu Sanui, Hajime Akiyama, Takao Fukuda, Urara Tanaka, **Kyosuke Toyoda**, Takaharu Taketomi, Fusanori Nishimura: Spry2 Downregulation Shifts Macrophages Toward an M2 Phenotype by Stimulation with Interferon and *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide. 94th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Seoul, South Korea, 2016. 6. 22-25.
 6. Takao Fukuda, Terukazu Sanui, **Kyosuke Toyoda**, Urara Tanaka, Kensuke Yamamichi, Ryo Atomura, Hajime Akiyama, Fusanori Nishimura. Molecular basis of amelogenin-induced periodontal tissue regeneration. 口腔から健康長寿を支えるプロジェクト推進に向けた研究拠点構築プログラム 2nd Symposium 福岡リーセントホテル. 2016.2.28
 7. **豊田敬介**、福田隆男、讃井彰一、山道研介、後村亮、西村英紀 ヒト歯根膜幹細胞/前駆細胞株の細胞遊走時に及ぼす分子機構 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会 (143 回) 第 17 回日韓歯科保存学会学術大会 文京シビックホール 2015. 11.13.

〔その他〕

ホームページ等

九州大学研究者情報

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学
講座歯周病学分野

hppt://www.dent.kyushu-u.ac.jp

6 . 研究組織

(1)研究代表者

豊田 敬介 (TOYODA KYOSUKE)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70757947