

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20405

研究課題名(和文) 組み換えDPPタンパク質を利用した硬組織再生誘導法の確立

研究課題名(英文) Establishment of hard tissue regeneration induction method using recombinant DPP protein.

研究代表者

小武家 誠司(Kobuke, Seiji)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：50744794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨や歯牙などの硬組織に高発現する Dentin phosphoprotein (DPP) は、高度にリン酸化された Ser-Ser-Asp 繰り返し配列 (SDrr配列) を持つ細胞外基質である。ゆえに、組み換え DPP タンパク質は再生誘導材としての期待があるが、精製が困難であった。本研究ではSDrr配列長を種々の長さに短縮した改変型組み換え DPP タンパク質を作製し、これら組み換えタンパク質の精製効率ならびに硬組織細胞外基質としての活性を比較することを目的とした。細胞外基質石灰化モデルを用いた検討においてSDrrを欠失させると石灰化誘導能は失われるが、分泌・精製効率は向上した。

研究成果の概要(英文)：Dentin phosphoprotein (DPP) which contains tandem serine/asparatic acid rich repeats (SDrr) is known to enhance dentin mineralization. However, it remains unknown about the relationship between the length variations in SDrr and the functions of PP in matrix mineralization. By utilizing a mammalian expression system, we generated several recombinant PP proteins (rPP) containing SDrr of different lengths and analyzed their effects on the precipitation of calcium phosphate with an in vitro gel diffusion system. rPP- 63.5 SDrr, which possessed 36.5 % the length of SDrr in full-length rPP (rPP-full), induced the precipitation of calcium phosphate similar to that of rPP-full at the same molar concentration, whereas rPP- SDrr, in which SDrr were flipped, did not. The results of an ELISA analysis indicated that the amounts of rPP- 63.5 SDrr secreted from transfected cells were 7.1-fold greater than that of rPP-full, respectively.

研究分野：保存修復学

キーワード：歯内治療学 保存修復学 象牙質 組み換えタンパク質

1. 研究開始当初の背景

Dentin phosphoprotein (DPP) は象牙質や骨の細胞外基質に多量に存在する。DPP が他の歯牙・骨の細胞外基質と比較して特徴的であるのは、そのアミノ酸配列にセリン-セリン-アスパラギン酸 (Ser-Ser-Asp: SDrr) の約 600 アミノ酸に渡る繰り返し配列を持つことである。この配列中の Ser は大半がリン酸化されており、強いカルシウムイオン結合能から、硬組織の石灰化においてその核となる分子である。ゆえに DPP タンパク質は、歯科領域においては覆髄剤として象牙質の再生に、更には歯槽骨欠損やインプラント治療時の骨増生等、硬組織再生に有用である可能性が高い。しかしながら、その特徴的な配列ゆえに、その cDNA クローニング並びにそれを利用しての遺伝子組み換えタンパク質の作製が困難を極めてきたが、現在、臨床応用を見据え、活性のある組み換え DPP タンパク質の作製が競われている

2. 研究の目的

本研究では、高度にリン酸化された組み換え DPP タンパク質の効率良い作製方法を樹立することを目的とした。まず、組み換え DPP タンパク質中の繰り返し配列を様々な長さに短縮した改変型組み換え DPP タンパク質を作製し、細胞外基質石灰化モデルを用いて硬組織細胞外基質としての活性を評価し、通常型及び各種改変型組み換え DPP タンパク質の硬組織誘導・再生材料としての有用性を検討・比較することを目的とした。

3. 研究の方法

組み換え DPP タンパク質の精製方法の改良 これまでの研究で、DPP cDNA を遺伝子組み換えタンパク質発現ベクターに導入し、6xHis Tag を利用し遺伝子組み換え DPP タンパク質を 293 細胞上清より精製している。しかしながら、組み換え DPP タンパク質はその高い酸性度のためか、収量が少なく、また SDrr 繰り返し配列が長いほど組み換えタンパク質の収量が少なくなるという問題を抱えている。そこで、Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement (ITS) を上清に添加し、組み換えタンパク質産生細胞の無血清培地中での生存と分泌量の増加に効果があるかを検討する。更に精製に用いる上清から Ni-NTA agarose で目的組み換えタンパク質を精製する前処理として、Hi Trap Q Column (GE Healthcare) で前精製を行うことで純度の

更なる改善を行う。**各 SDrr 短縮型 DPP を用いて、SDrr 繰り返し配列長と石灰化誘導能との関連の検討** SDrr 繰り返し配列の短縮は組み換えタンパク質の収量を上げるものの、過度の短縮は石灰化誘導能を欠失すると考えられるため、細胞外基質石灰化モデルを用いて、各 SDrr 短縮型 DPP タンパク質のリン酸およびカルシウム沈着量を計測する。細胞外基質石灰化モデルとしては、Hydrogel-based double-diffusion system (Dorvee et al., Cry Eng Com, 2012) を参考に自ら実験室内に構築し、実験を行った。具体的には 6 cm に切断した 10 ml ディスポーザブルピペットに、10% (w/v) ゼラチンゲル (Type A) を充填する。中央部には、各種組み換えタンパク質の単体またはハイドロキシアパタイト粉末 (粒径 200 nm 以下) と混合したものをゼラチンゲルに包埋し配置する。この際ハイドロキシアパタイトの濃度は 0.25 mg/ml とする。上記のゲルを充填したピペットの両端にそれぞれ送液チューブを連結し、一方にはカルシウム溶液 (100 mM CaCl₂), 150 mM Tris-HCl pH 7.4) を、もう一方にはリン酸溶液 (100 mM (NH₃)₂HPO₄, 150 mM Tris-HCl pH 7.4) を、それぞれリザーバーから送液ポンプで循環させる。送液開始後、最大 120 時間後に各ゼラチンゲルをピペットから取り出し、組み換えタンパク質を添加した部位を中心に 150 µl 分のゲルを切り出す。切り出したゲルを 2N HCl で 50 - 120 分間加水分解する。加水分解により液化したサンプル中のカルシウムイオンとリン酸イオン量をそれぞれ QuantiChrom™ Calcium Assay kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) と Malachite Green phosphate Assay kit (BioAssay Systems) を使用して定量する。

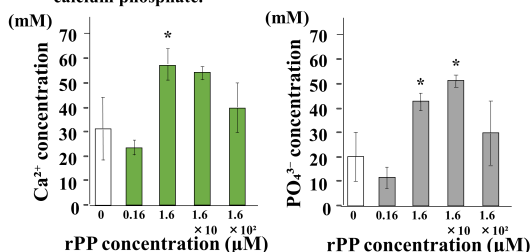
4. 研究成果

組み換え DPP タンパク質の精製については Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement (ITS) の上清への添加で、組み換えタンパク質産生細胞の無血清培地中での長期生存が可能となり、さらに回収量も著しく増加した。更に精製に用いる上清から Ni-NTA agarose で目的組み換えタンパク質を精製する前処理として、Hi Trap Q Column (GE Healthcare) で前精製を行うことで純度の改善を行うとともに、組み換えタンパク質の持つ 6xHis Tag に対する Ni-NTA agarose による affinity chromatography を阻害する可能性のある ITS 中に含まれる Transferrin を除去することができた。組み換え DPP タンパク質の発

現量は Ser-Ser-Asp 繰り返し配列を短縮すればするほど培養上清中に分泌されることが明らかとなり、繰り返し配列をそれぞれ 37.6%、63.5% 欠失した組み換え DPP タンパク質では、欠失していない組み換え DPP タンパク質と比較して約 5.2, 7.1 倍の分泌量を認めた。将来的な臨床応用を想定したタンパク質作製のコストを考慮すると、繰り返し配列の短縮が有用であることが示唆された。

続いて細胞外基質石灰化モデルを用いた組み換え DPP タンパク質の石灰化効果を検討した。R. Dorvee らによって確立された細胞外基質石灰化モデルを用いて、各種組み換えタンパク質を封入したゼラチンゲルに沈着したリン酸カルシウムのカルシウムイオン量とリン酸イオン量を比較した。組み換え DPP タンパク質を各種濃度で添加したゲルへの各イオンの沈着量を比較したところ、図 1 に示すようにカルシウムイオンとリン酸イオンの沈着量はコントロールと比較して 1.6 μM の濃度で添加した際に有意に増加した。そこで、この同濃度で各種改変型組み換え DPP タンパク質を添加したゲルを作製し、そのカルシウムイオン量とリン酸イオンの沈着量を検討した。SDrr を欠失した組み換え DPP タンパク質を添加したゲルでは full length 組み換え DPP タンパク質を添加したゲルと比較して有意にこれらイオンの沈着量が少なかった。一方、SDrr を 63.5 および 37.6% 欠失した組み換え DPP タンパク質は full length 組み換え DPP タンパク質と同様の各イオン沈着量を示した。以上より、SDrr 長は生物種あるいは同一生物間で異なっていることが知られているが、報告されている toothed animals の SDrr 長のほとんどはこの 63.5% 欠失させた DPP より長いことから、toothed animals が持つ SDrr 長の差異は歯牙硬組織の石灰化成熟や石灰化度に影響を与えないことが示唆された。さらに、この 63.5% 欠失組み換え DPP タンパク質は硬組織誘導能ならびに精製効率という点において、将来的に硬組織再生への有用性が高いと考えられた。

図1. Dose-dependent effects of rPP-full on the precipitation of calcium phosphate. (n = 3, Dunnett's test, *p < 0.05)



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 1件)

Relationship between length variations in Ser/Asp-rich repeats in phosphophoryn and in vitro precipitation of calcium phosphate : Kobuke S., Suzuki S., Hoshino H., Haruyama N., Nishimura F., Shiba H. : Arch. Oral Biol., 60, 1263-1272, 2015. 査読あり.

[学会発表](計 9件)

マクロファージからの TNF- α 産生を誘導する歯髓細胞特異的因子の探索 : 永安慎太郎, 鈴木茂樹, 中西 惇, 吉田和真, 土屋志津, 本山直世, 小武家誠司, 柴秀樹 : 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (長野), 2016.10.27.

Antimicrobial ability of Heparin-LL37 hybrid : 吉田和真, 鈴木茂樹, 中西 惇, 永安慎太郎, 小武家誠司, 柴秀樹 : 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (長野), 2016.10.27.

歯髓細胞特異的因子によるマクロファージからの TNF- α 産生誘導機構の解明 : 永安慎太郎, 鈴木茂樹, 小武家誠司, 中西 惇, 吉田和真, 柴秀樹 : 第 37 回日本歯内療法学会学術大会 (名古屋), 2016.7.23.

Exploration of a TNF- α -inducing factor produced by pulp cells : Nagayasu S., Suzuki S., Kobuke S., Shiba H. : 第 49 回広島大学歯学会総会 (広島), 2016.7.2.

Proliferative and migratory effects of MSC-delivered ECM : Yoshida K., Suzuki S.,

Nakanishi J., Kobuke S., Nagayasu S., Shiba H. : 第 49 回広島大学歯学会総会 (広島), 2016.7.2

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :

Anti-inflammatory effects of phosphophoryn : Nakanishi J., Suzuki S., Kobuke S., Yoshida K., Nagayasu S., Shiba H. : 第 49 回広島大学歯学会総会 (広島), 2016.7.2

(4) 研究協力者
()

Phosphophoryn の持つ抗炎症作用の検討 : 中西 惇, 鈴木茂樹, 小武家誠司, 吉田和真, 永安慎太郎, 柴 秀樹 : 第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会 (宇都宮), 2016.6.9.

歯髄細胞が産生する TNF- 誘導因子の探索 : 永安慎太郎, 鈴木茂樹, 小武家誠司, 柴 秀樹 : 第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (東京), 2015.11.12.

Phosphophoryn のセリン・アスパラギン酸繰り返し配列の長さとお細胞外基質石灰化効果との関連性 : 小武家誠司, 鈴木茂樹, 星野博昭, 柴 秀樹 : 第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会 (北九州), 2015.6.25.

[その他]

特記事項なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小武家 誠司 (Kobuke Seiji)

広島大学 医歯薬保健学研究院 助教

研究者番号 : 50744794

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :