

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05514

研究課題名(和文) Pannexin3を応用した歯周炎における抗炎症薬および新骨再生療法の開発

研究課題名(英文) The development of anti-inflammatory and regenerative medicine for periodontitis: application of Pannexin 3 signaling pathways.

研究代表者

石河 真幸 (Masaki, Ishikawa)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60432936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢化社会を迎えた現代で、健康長寿には慢性歯周炎のより良い治療法の開発は急務である。近年、間葉系幹細胞を応用した組織再生および抗炎症療法の開発研究が進められている。そこで、本研究では、骨に強発現する新規Gap junction family に属するPannexin3 (Panx3)に着目し、機能解析を行い、新治療法への応用を模索した。その結果、Panx3が新骨制御因子であることが明らかになり、Panx3の機能を応用した歯周病における新骨再生療法開発への可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Panx3が軟骨細胞および骨芽細胞分化過程において、前駆細胞の増殖を抑制し、分化を促進するスイッチの役割を担っていること、小因子の細胞内外移動を調節していることが明らかになった。また、Panx3 KOマウスが骨形成不全を示すことからPanx3が新骨制御因子であることが示唆された。その結果、Panx3機能の制御機構を応用した再生療法開発および創薬に繋がる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Coping with the hyper-aging society, an advanced treatment for periodontal disease is necessary in order to maintain the quality of life. Here, we show that Pannexin 3 (Panx3), a member of gap junction protein is a new regulator to switch from proliferation to differentiation of chondrogenitors and osteoprogenitors via multiple Panx3 signaling pathways. We demonstrated that Panx3 has potentials for new medical treatment and drug application in periodontitis by promoting bone regeneration.

研究分野：歯科保存学

キーワード：再生治療 ギャップ ジャンクション 骨形成 骨再生 骨芽細胞分化 軟骨細胞分化 抗炎症 2nd
メッセンジャー

1. 研究開始当初の背景

重篤な歯周炎は中高年齢層から罹患率の高まる慢性炎症性疾患であり、患者数は5,000万人を超える国民病とも言える。中でも重篤な歯周炎の罹患率は高年齢層で高まるため、高齢者の Quality of life (QOL) の向上を脅かす原因となることから、その対応は急務と言える。これまで重篤な歯周炎の治療は、対症療法と口腔清掃指導による予防が行われてきた。近年では、細胞移植治療による歯周外科処置後の骨再生を図る再生医療技術と、線維芽細胞増殖因子あるいは血小板成長因子などのサイトカインを局所投与することで歯周組織中の幹細胞を活性化して再生を図る治療技術も開発されている。しかし、重篤な歯周炎の治療のためには更なる開発が必要である。

近年、未分化の細胞を目的の細胞に分化誘導することが必須な再生医療において、生理作用および薬理作用により生命の恒常性維持を劇的に変化させる ATP や Ca^{2+} などの 2nd messengers の機能応用が注目されている。しかし、2nd messengers を放出する側についての研究およびその応用は未開の部分が多い。現在、2nd messengers を調整する因子で代表的なものには Gap junction protein である。Gap junction は細胞間結合を構築し、2nd messenger を交換することにより細胞内のシグナリングを調節する。私はこれまで新規 Pannexin family (Pannx1, 2 and 3) のメンバーである Pannx3 に関して研究を進めてきた。Pannx3 は硬組織において軟骨を作る軟骨細胞、骨組織の中心である骨芽細胞および歯の象牙質を作る象牙芽細胞で強発現する。また、Pannx3 は細胞膜および小胞体膜に存在し、ATP や Ca^{2+} を細胞内外に移動させるチャンネル機能を持つ。Pannx3 チャンネルは、細胞内 ATP を細胞外に放出する hemichannel、小胞体膜に存在し小胞体内腔に蓄えられている Ca^{2+} を細胞質内に放出する ER Ca^{2+} channel、さらに細胞間で Ca^{2+} を交換する gap junction の3つの機能を持つ。

歯周炎の治療で抗炎症は重要項目である。近年、細胞からの ATP 放出に起因するシグナル伝達が T 細胞を介する炎症性疾患の治療に有効であることも示唆されている。また、細胞死の際、Pannx1 hemichannel から ATP を放出する (「find-me」シグナル) ことが貪食細胞の動員調節を行うことが報告された。このように、アポトーシス初期の細胞に発現する Pannx1 は「find-me」シグナルにより死細胞へのマクロファージの誘引を促進し、炎症を躍起させる。しかし、Pannx3 の炎症躍起機構は未だ報告はない。

このように Pannx3 は歯周炎治療で必須である骨の再生および抗炎症に関して有効な因子であることが示唆され、より良い医療ツールを提供出来るものである。

2. 研究の目的

超高齢化社会を迎えた現代で、慢性歯周炎のより良い治療法の開発は急務である。本研究の目的は新規 Gap junction family に属する Pannexin3 (Pannx3) の機能を応用し、歯周炎における抗炎症作用および骨再生を誘導する創薬をデザインし、より良い歯周炎治療を可能にする新薬剤の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) Pannx3 を介した骨芽細胞の増殖・分化制御機構の解析

A. 骨形成における Pannx3 KO マウスの解剖学的解析: Pannx3 KO マウス(胎生 14、16、17、18日および新生児)を用いて、発生、発達および細胞分化の経過を観察する。マウスから Alizarin Red と Alcian Blue 染色を用いて骨モデルを作製し、mineralized された骨および軟骨の発生および発達を Pannx3 Wild type (WT) または Hetero (HT) と KO とで観察比較する。また、 μ CT を用いて、骨密度を測る。骨密度および週齢に合わせた骨分化解析は研究協力者である NIH の Yoshihiko Yamada 先生および東北大学の福本敏先生に助言および協力をいただく。B. 骨形成における Pannx3 KO マウスの組織学的解析: 軟骨内骨化: 大腿骨または脛骨を用いてパラフィン切片を作製し、Alcian Blue または Masson Trichrome 染色を行って軟骨におけるマトリックス形成の比較を行う。また、von Kossa 染色を行って骨の石灰化度を比較する。また、骨および軟骨の発生および分化度の比較検討する。胎生期または新生児における大腿骨または脛骨を用いてパラフィン切片または凍結切片を作製し、軟骨や骨の分化マーカー、例えば、Collagen type X, Osteopontin, MMP13 や Osterix, Alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin を免疫染色で発現比較する。また、大腿骨または脛骨から mRNA を抽出し、cDNA を作製後、RT-quantitative PCR 法で分化マーカーの発現比較を行う。分化への影響と同時に骨成長における増殖細胞の比較検討も行う。大腿骨または脛骨のパラフィン切片または凍結切片に対して、細胞増殖マーカーである Ki67 の免疫染色を行い、前軟骨芽細胞および前骨芽細胞の増殖率を比較する。膜内骨化: 頭蓋骨を用いて膜内骨化の比較を行う。解析方法は軟骨内骨化で行う方法手順に従う。C. Primary 骨芽細胞および軟骨芽細胞を用いての Pannx3 の機能解析: (a) Primary 骨芽細胞および軟骨芽細胞の抽出と培養。Pannx3 WT または HT と KO マウスの頭蓋骨または胸骨、大腿骨から、それぞれ、primary 骨芽細胞および軟骨芽細胞を酵素処理法により抽出し、細胞培養を行う。抽出法や細胞培養法は既に確立されており、同様の primary 細胞を用いた多数の報告がある。(b) 培養細胞の分化能の比較。Primary 骨芽細胞に対しては、Ascorbic acid または BMP2 による成熟骨芽細胞への分化誘導を行い、分化マーカーの発現比較を行う。早期の骨芽細胞分化指標として ALP 染色、石灰化を示すより成熟した骨芽細胞の指標として Alizarin Red 染色を培養細胞に対して行う。また、様々な培養期間を設定し、各タイミングで mRNA を抽出し、qPCR で分化マーカー (Runx2, Osterix, ALP, Osteocalcin) の発現を定量比較する。一方、primary 軟骨芽細胞に関しては ITS (insulin, transferrin, selenous acid) により分化誘導を行い、14日間培養後、Alcian blue 染色を行う。また、培養期間において数回のタイムポイントを設定し、各ポイントで mRNA を抽出し、qPCR で分化マーカー (Collagen type 2, Collagen type X, Aggrecan) の発現定量比較を行う。(c) 培養細胞の増殖能の比較。Primary 細胞を増殖の培養条件で 0 から 7日間培養する。7日毎日、細胞数を測定かつ MTT assay を行って細胞の増殖率を比較する。(d) Gap junction protein の機能解析。Hemichannel の機能測定としては、細胞外への ATP 放出量を比較する。Gap junction の機能としては、Caged Ca^{2+} reagent と Ca^{2+} indicator (Fluo-4) を使い、2光子共焦点顕微鏡を用いて細胞間の Ca^{2+} 透過性を観測する。ER Ca^{2+} channel の解析には Ca^{2+} indicator (Fura-2) を細胞に作用させ、細胞外の Ca^{2+} を抜いた状態で ATP 刺激することで細胞内の Ca^{2+} 変動を測定する。細胞内 Ca^{2+} の変動を測定するために、Luminometer を使用する。

(2) Pannx3 と Cx43 を介した骨再生機構の解析

A. **Panx3**; **Cx43 double KO** マウスの作製と解析: **Panx3 HT** マウス または **KO** マウスと **Cx43 HT** マウスを交配し、**Panx3;Cx43 double KO** マウスの作製を行う。**Double KO** マウス作製後、**Panx3 KO** マウスの解析方法と同様に、解剖学および組織学的に表現型を解析し、**Panx3 KO** マウスと **Cx43 KO** マウスの表現型との比較を行う。また、**primary** 軟骨芽細胞および骨芽細胞を抽出し、培養を行い、**in vitro** により生化学的および生理学的手法を用いて **Panx3 KO** マウスおよび **Cx43 KO** マウスの **primary** 細胞との比較検討を行う。**Cx43 KO** マウスは心臓欠陥の異常形成により生まれて直ぐに致死に至るため、**Panx3;Cx43 double KO** マウスも同様に誕生後致死または胎生致死の可能性はある。**Panx3** は軟骨、骨に強い発現がみられる為に、**double KO** マウスの表現型はさらにシビアな可能性がある。従って、まずは異なった母体数腹で誕生させて遺伝子型を確認する。その結果、ホモが確認できない場合、胎生 13,14,15,17,18 日のマウスを調整し観察する。**Double KO** マウスの作製には時間がかかると予想される為、**Panx3 KO** マウスの表現型によっては **Panx3 KO;Cx43 HT** 同士での交配を進めて解析のスピードをあげる。

(3) 炎症状態における **Panx3** の機能解析

A. **Panx3** の **find-me signal** 放出機能の解析: アポトーシスを起す細胞は **find-me signal** を発する。**Find-me signal** は ATP もしくは UTP であることが報告されている。また、**Panx1** は ATP 放出を行うことで **find-me signal** を発する。そこで、**Panx3** も **find-me signal** 機能を有しているかを確認するため、**Fas** 抗体または UV 照射を用いて骨芽細胞にアポトーシスを起させる。その後、細胞の mRNA および **protein** を回収し、**Panx3** の発現をそれぞれ RT-PCR および **western blotting** にて確認する。また、正常骨芽細胞に比べ、アポトーシス細胞では ATP release の増加が認められるかを観察する。具体的には、細胞培養上清を回収して、**luminescence** との反応を計測比較する。その後、その ATP release が **Panx3** 由来であるのかを確認する為に、**Panx3 KO** マウスから抽出した骨芽細胞で同様の実験を行い、比較検討する。**Find-me signal** はマクロファージの遊走を促進する為のものであるので、**Panx3** の ATP release が **find-me signal** であることを示す為に、**Panx3** を強制発現させた。または **Panx3 KO** マウスからの骨芽細胞株 (**C2C12 cells** または **primary osteoblasts**) の培養上清とチャンバー付きの **culture dish** でマクロファージの **migration assay** を行う。 B. **Panx3 blocker** の作製とその効果の測定実験: **Hemichannel**, **ER Ca²⁺ channel** および **Gap junction** の **Panx3** の 3 機能のうち、**find-me signal** として作用するのは **hemichannel** であると予想している。また、既に我々は **Panx3 hemichannel** の機能を得意的に抑制する **Panx3** 抗体とその **Panx3 antigen peptide** を持っている。ただ、それらが炎症状態における **find-me signal** も同様に遮断するのは未だ試していない。また、**find-me signal** では通常の **Panx3 hemichannel** の開閉機序と異なっている事が予想され、**Panx3** 抗体および **Panx3 peptide** が作用しない恐れもある。そこで、まずは、**find-me signal** を行っているアポトーシスを起した骨芽細胞に対して **Panx3** 抗体および **Panx3 peptide** を作用し、同様の ATP release 抑制が認められるか確認する。もしも、効果が薄い場合は、新たな **Panx3 channel** の開閉に関わる部位を特定し、そこに得意的に作用する抗体または **peptide** を作製し、**find-me signal** の抑制の観測を行う。**Panx1 find-me signal** は **Panx1** が **caspase** によって切断される事により活性すると報告されているが、**Panx3** は **caspase** による切断が認められない。したがって、他の選択肢として **Panx3** のリン酸化部位の特定を行うことで **Panx3 channel** の開閉機構を探り、**find-me signal** との関係性を解析する必要がある。

(4) 歯周病モデルマウスにおける **Panx3** を応用した骨再生実験

歯周炎で破壊された組織の再生能力を判定するため、慢性炎症を人為的に誘発させた歯周病モデルマウスを作製する。また、**Panx3;Cx43 KO** マウスおよび **Panx3;Cx43 DKO** マウスにも同様の歯周病を躍起させ、それぞれの骨吸収の差を観察する。具体的には組織切片を作り免疫染色により骨芽細胞分化マーカーの発現を比較することと、**μCT** による骨密度の測定比較を行う。また、組織より直接骨を採り mRNA を抽出後、分化マーカーに対する RT-PCR を行い骨芽細胞の破壊具合を比較する。以上の解析により、**Panx3** と **Cx43** の歯周病による骨破壊に対する機能の識別ができ、病態におけるそれぞれの役割を明確にできる。さらに、骨再生実験としては、**Panx3** を強制発現する骨芽細胞を野生型マウスの骨欠損部位に移植する。移植後の骨再生能力の判定は、組織学的解析ならびに骨マーカー分子の発現および骨密度の測定を指標に行う。

(5) 歯周病モデルマウスに対して **Panx3 blocker** を応用した抗炎症実験

A. **in vivo** における **Panx3** の **find-me signal** の解析: 歯周病モデルマウスの組織切片を用いてマクロファージのマーカーである **CD107b** と **Panx3** の免疫染色を行う。歯周病モデルで **Panx3** の発現が促進しているのかを免疫染色および、歯周病モデル マウスの骨組織から **protein** または mRNA を抽出し、それぞれ **western blot** と RT-PCR で **Panx3** の発現を非歯周病モデルマウスのもものと比較する。その後、**Panx3 positive** の細胞の近くに **CD107b positive** のマクロファージが存在しているかを観測する。また、アポトーシスのマーカーである **caspase 3** または **Annexin V** と **Panx3** の免疫染色も行い、アポトーシスの細胞が **Panx3** の発現をあげて **find-me signal** を出しているのかを確認する。この実験は正常な骨形成と病態では **Panx3** の発現機序が違う可能性をしめすことができ、新たな研究領域を広げることができる。 B. 歯周病モデルマウスへの **Panx3 blocker** の効果実験: 歯周病モデルマウスに開発した **Panx3** 抗体または **Panx3 peptide** を歯槽骨の炎症部位に直接作用させて、抗炎症効果を見る。具体的には免疫染色によりマクロファージの浸潤度合いを比較する。または **CD31** などの血管内皮細胞マーカーの発現をみて血管の拡張度合いを観察する。また、同時に **Panx3 blocker** を作用しての骨形成の程度も比較検討しなくてはならない。なぜならば、通常の骨形成では **Panx3 hemichannel** の機能は骨芽細胞分化には必須のものであり、抑制してしまうと骨の形成にも影響があると予想される。この場合、**Panx3 blocker** の投与濃度の検討を行う必要がある。炎症を止めない事には骨形成もうまくできないことから、まずは抗炎症の作用効果を期待する濃度を算定する。その後、骨形成においては **Panx3** の発現をあげるか機能を更新することが必要になる。それに対しては、**Panx3** を強制発現した骨芽細胞の自家移植を行うか、**Panx3** 機能を調整する分子の研究を行う。もし、**find-me signal** の **hemichannel** 活性機構と通常の **Panx3 hemichannel** 開閉機構が違うものであるのであれば、それぞれの状況に適した **Panx3 blocker** を使用し、抗炎症効果および骨再生を促す。

4. 研究成果

(1) *Panx3* を介した骨芽細胞の増殖・分化制御機構の解析における成果

Panx3 KO マウスの表現系解析の結果、胎生致死ではなくメンデルの法則に従い誕生し、生活能力を有していた。新生児は体の大きさが小さく、骨形成に異常を示した (図 1)。Alizarin Red および Alcian Blue 染色を施した骨モデルにおいて、全ての骨部位において軟骨および骨の形成不全が認められた。さらに μ CT による骨密度解析の結果、新生児の骨の石灰化が抑制されていることがわかった。新生児 *Panx3* KO および野生型マウスの脛骨を用いてパラフィン組織切片を作製し、HE 染色の結果、成長板における軟骨増殖帯および前肥大層の延長、そして、肥大層の縮小が認められた。また、軟骨の分化マーカー (Collagen type X, Osteopontin, Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13)) は免疫染色および qPCR により発現の抑制が確認された。特に Osteopontin と MMP13 の発現の減少は軟骨の最終分化が抑制されていることを示唆した。従って、軟骨の最終分化期に必要な成長板の軟骨と骨領域境界への血管流入の状況を把握するため、Vascular endothelial growth factor (VEGF) と血管内皮細胞マーカーである CD31 の免疫染色を行った結果、それぞれ発現の減少を示した。さらに骨芽細胞の分化度合いを調べるため、骨芽細胞分化マーカーである Osterix, Alkaline phosphatase (ALP) および Osteocalcin の発現を同様に免疫染色および qPCR で確認した結果、それらの発現の減少が認められた。また、*Panx3* KO マウス ラインと Osterix-GFP マウスの交配を行うことで Osterix 発現の差を観察した結果、*Panx3* KO マウスでは GFP 陽性細胞の減少が認められた。次に、*Panx3* KO マウスに軟骨細胞および骨芽細胞の分化抑制が認められたこと、以前の我々の結果より *Panx3* は軟骨前駆細胞および骨芽前駆細胞の増殖を抑制することがわかっていたことから、増殖マーカー Ki67 の免疫染色を行った結果、*Panx3* KO マウスでは発現の増加が認められた。さらに、*Panx3* は canonical Wnt signal の抑制を行うことで細胞周期を停止させることを明らかにしていたため、canonical Wnt signal の因子である Axin2-lacZ マウスと *Panx3* KO マウス ラインとの交配を行い、LacZ 陽性細胞の発現を比較検証した結果、*Panx3* KO マウスでは優位に LacZ 陽性細胞の増加が成長板に認められた。これらの結果より、*Panx3* は軟骨細胞前駆細胞および骨芽細胞前駆細胞の分化を抑制し、それぞれの細胞分化を促進することが示唆された。さらに、成長板における軟骨細胞最終分化期においても血管侵入を制御することで最終分化を促進し、軟骨から骨への置換制御を行うことが明らかになった。さらに、*Panx3* KO および野生型マウスから間葉系幹細胞を抽出し、軟骨細胞および骨芽細胞に分化誘導を行い細胞増殖および分化の違いを比較検討した。その結果、*in vitro* でも *in vivo* で認められた軟骨細胞および骨芽細胞の細胞増殖の促進および分化の抑制が *Panx3* KO マウスから抽出した primary 細胞でも確認できた。また、頭蓋から primary 骨芽細胞を抽出し、*Panx3* の 3 機能、ATP 放出 channel、ER Ca²⁺ channel および Ca²⁺ 透過性の gap junction 機能を luminometer および Ca²⁺ インディケーターと共焦点レーザー顕微鏡を用いた計測により調べた。結果、*Panx3* KO マウス由来の骨芽細胞では 3 機能が抑制されることが確認され、*Panx3* がその 3 機能を持ち合わせることが *Panx3* KO マウスを用いて確認された。次に、軟骨細胞分化および骨芽細胞分化機構での *Panx3* のシグナルメカニズムを調べるために、*in vitro* の系を利用してシグナル解析をシグナルトランスダクションと western blot 法により確認した結果、*Panx3* が ATP/PI3K/Akt/Calmodulin シグナルを介して細胞分化を制御していること、ATP/PKA/CREB シグナルを制御することで canonical Wnt シグナルを抑制することで細胞周期の停止を促進することを明らかにできた。

(2) *Panx3* と *Cx43* を介した骨再生機構の解析における成果

Panx3 マウスラインと *Cx43* マウスラインの交配を行い、*Panx3*;*Cx43* double KO (DKO) マウスを得た。組織学的解析および解剖学的解析の結果、DKO マウスの体のサイズは *Panx3* KO マウスのサイズとほぼ同じであった。また、骨形成不全の度合いは *Panx3* KO マウスのものよりもよりシビアなものであった。*Cx43* KO マウスの体のサイズは野生型のサイズとほぼ同じであること、*Cx43* の骨形成不全の度合いは新生児では頭蓋後頭部に軽い形成不全を認めるがそれ以外は野生型のものと同じであることから、骨芽細胞分化において *Panx3* は *Cx43* よりも早期に発現が認められて重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、頭蓋より *Panx3* KO、*Cx43* KO および DKO マウスから primary 骨芽細胞を抽出し、細胞増殖および分化実験を行った結果、*Panx3* KO マウス由来の細胞は増殖促進および分化抑制を示したが、*Cx43* 由来の細胞は分化にのみ抑制が認められた。特に *Cx43* の分化抑制はカルシウム沈着を測る alizarin red でのみ顕著な抑制が認められた。つまり、分化機構の後期、成熟期において *Cx43* 機能は重要であることが示唆された。そこで発現パターンを qPCR および western blot で確認した結果、*Panx3* は骨芽細胞分化において初期から発現が認められ、発現増加する。しかし、成熟期に移行する前にその発現は減少を認めた。一方、*Cx43* は初期には少ない発現を示すが、後期には *Panx3* 発現をキャッチアップするように増加する結果を示した。さらに、*Panx3* と *Cx43* の機能の違いを明らかにするために、*Panx3* KO マウスおよび *Cx43* KO マウスから抽出した primary 骨芽細胞にそれぞれ *Cx43* 発現ベクターおよび *Panx3* 発現ベクターを遺伝子導入し、それぞれの骨芽細胞分化異常の変化を観察した結果、*Panx3* 強制発現は *Cx43* 欠損骨芽細胞の分化異常をレスキューできたが、その *Cx43* 強制発現は *Panx3* 欠損による骨芽細胞分化異常をレスキューできなかった。このことから、明らかに骨芽細胞分化において *Panx3* と *Cx43* の機能や働きに違いがあることが示唆された。次に、それぞれの primary 細胞を用いて Gap junction protein の 3 機能、ATP 放出 channel、ER Ca²⁺ channel および Ca²⁺ 透過性の gap junction 機能を調べた結果、*Panx3* は 3 つの機能を有するが、*Cx43* は ATP 放出 channel および Ca²⁺ 透過性の gap junction 機能の 2 機能を保持することが確認された。

以上の結果より、*Panx3* は初期の骨芽細胞分化過程において増殖を抑制し、分化へシフトし促進するというスイッチの役割があることがわかった。また、*Panx3* は *Cx43* とは違う機能を持ち合わせていることも明らかになった (図 2)。骨再生において如何に未分化細胞を効率よく骨芽細胞に分化させるかが重要であることから初期分化に重要な役割を担っている *Panx3* は新骨再生療法を確立するには良い因子であることが示唆された。

(3) 炎症状態における *Panx3* の機能解析における成果

Panx3 の find-mesignal 放出機能の解析するために、骨芽細胞株 MC3T3-E1 およ

び分化誘導を進めた primary 骨芽細胞に Fas 抗体または UV 照射を用いてアポトーシスを起こさせ、Pann3 発現を RT-PCR および western blotting にて確認した。結果、アポトーシスを起こした細胞において Pann3 の発現の上昇が認められた。同アポトーシス誘導条件下において細胞外への ATP 放出量を測定した結果、アポトーシスを起こした細胞では ATP 放出が更新された。また、Pann3 強制発現細胞株 C2C12 においてもアポトーシス誘導下での ATP 放出量を測定した結果、Pann3 の発現のないコントロール C2C12 細胞や正常のコントロール細胞および Pann3 強制発現 C2C12 細胞に比べて優位に放出量が上昇した。さらに Pann3 抗体およびペプチドを用いるとこの ATP 放出は減少した。このことから、Pann3 はアポトーシスにおいて発現上昇を示し、ATP を放出することがわかった。このアポトーシス下における Pann3 機能が Find-me signal となりうるかを調べるため、Pann3 を強制発現させた、または Pann3 KO マウスからの骨芽細胞株 (C2C12 cells または primary osteoblasts) の培養上清とチャンパー付きの culture dish でマクロファージの migration assay を行った。その結果、正常培養下およびアポトーシス誘導下における Pann3 強制発現細胞においてはマクロファージの遊走が促進された。以上のことから、Pann3 は ATP 放出により免疫細胞を呼び寄せる find-me signal の機能をもつことが示唆された。

次に、Find-me signal は炎症を惹起し慢性炎症を引き起こす為、Pann3 の find-me signal を抑制する Pann3 機能ブロックの開発および機能解析を行った。Pann3 は 4 回膜貫通型の膜タンパクであり 2 つの細胞外ドメインおよび 3 つの細胞内ドメインがある。Pann3 のチャンネル開閉機能解析がこの課題においては重要であり、それにはリン酸化が関与しているのではと推測した。そこで、リン酸化部位を予測するため、データベースを利用したコンピューター解析を行った結果、Pann3 全体で 17 個のリン酸化候補部位が判明した(図 3)。次に、その 17 個にそれぞれ変異を入れた Pann3 発現ベクターを作製し、Pann3 の骨芽細胞分化促進および骨芽前駆細胞の増殖抑制機能を阻害する部位を選び出した。その結果、細胞外ドメインおよび細胞内ドメインに各一つ Pann3 の機能を阻害する部位を明らかにした。さらに解析を進めていった結果、細胞外ドメインのリン酸化部位では我々が作製した部位特異的 Pann3 リン酸化抗体によりリン酸化が確認され、特に Pann3 の ER Ca²⁺ channel 機能に重要なリン酸化部位であること、骨芽細胞分化に関してその機能はより重要な役割を担うことがわかった。細胞内ドメインの方は Pann3 の増殖抑制および分化促進機能両方に関与していることがわかったが、この部位における良いリン酸化抗体の作製には困難を要した。ただ、この部位はカスパーゼの標的部位とも近接していることから、この細胞内ドメインはアポトーシスにおいて重要な部位であることが推測された。さらに細胞内ドメインの変異は Pann3 hemichannel の ATP 放出機能を抑制することがわかり、この部位のリン酸化またはカスパーゼによるタンパクの形態変化が Pann3 hemichannel の開閉に関与していることが示唆された。細胞内ドメインを直接的にコントロールするのは細胞外からは難しいために、細胞外ドメインを標的とした Pann3 抗体、Pann3 ペプチド、Pann3 リン酸化抗体およびペプチドを用いて Pann3 hemichannel の機能阻害度合いを比較した結果、Pann3 リン酸化抗体およびペプチドが著しく Pann3 hemichannel 機能を阻害した。これらを用いて Pann3 の find-me signal の機能阻害実験を行った結果、優位に ATP 放出を阻害でき、結果、マクロファージの遊走も阻害することが確認できた。この結果より、新しく作製した Pann3 抗体およびペプチドが Pann3 find-me signal 阻害剤、ブロック剤になりうることを示唆された。

(4) 歯周病モデルマウスにおける Pann3 を応用した骨再生実験における成果

慢性炎症を人為的に誘発させた歯周病モデルマウスを下顎第一臼歯に糸を結紮させることで作製した。野生型マウスにおける歯周病モデルマウスの下顎のパラフィン切片による標本を用いて免疫染色を行った。その結果、炎症部位、つまり歯周炎部位で Pann3 の発現促進が認められ、かつ、Pann3 発現細胞の近傍にはマクロファージの集積が確認された。このことより、Pann3 が find-me signal によりマクロファージを遊走し慢性炎症を惹起する可能性を示唆した。この仮説をより証明するために Pann3 KO マウスにおいても歯周病モデルを作製する予定だったが、始めに Pann3 マウスの東北大学への導入および繁殖が遅れてしまい、時間切れとなった。今後研究を継続し更なる解析を行う必要がある。

(5) 歯周病モデルマウスに対して Pann3 blocker を応用した抗炎症実験における成果

この項目に関しては手付かずであった。予定通りに計画が進まなかったことで、より効率化した研究チームの編成が必要であると痛感した。今後の課題にしていきたい。

やり残した研究および継続中のものは今後さらに研究を進めていき、最終目標である新治療法の開発につなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Ishikawa M, Williams GL, Forcinito P, Ishikawa M, Petrie R, Saito K, Fukumoto S, Yamada Y, Pannexin 3 ER Ca²⁺ channel gating is regulated by phosphorylation at the Serine 68 residue, J Biol Chem. 2019 (under review).
2. Peipei Zhang, Masaki Ishikawa, Craig Rhodes, Andrew Doyle, Tomoko Ikeuchi, Kuniyuki Nakamura, Yuta Chiba, Bing He, Yoshihiko Yamada, Pannexin-3 deficiency delays skin wound healing in mice due to defects in its channel activities, J Invest Dermatol. 2018 Oct 30.
3. Iwamatsu-Kobayashi Y, Abe S, Fujieda Y, Orimoto A, Kanehira M, Handa K, Venkataiah VS, Zou W, Ishikawa M, Saito M, Metal ions from S-PRG filler have the potential to prevent periodontal disease, Clin Exp Dent Res. 2017 Aug 10;3(4):126-133.
4. Handa K, Abe S, Suresh VV, Fujieda Y, Ishikawa M, Orimoto A, Kobayashi Y, Yamada S, Yamaba S, Murakami S, Saito M, Fibrillin-1 insufficiency alters periodontal wound healing failure in a mouse model of Marfan syndrome, Arch Oral Biol. 2018 Jun;90:53-60.
5. Yoshizaki K, Hu L, Nguyen T, Sakai K, Ishikawa M, Takahashi I, Fukumoto S, DenBesten PK, Bikle DD, Oda Y, Yamada Y, Mediator 1 contributes to enamel mineralization as a coactivator for Notch1 signaling and stimulates transcription of the alkaline phosphatase gene, J Biol Chem. 2017 Aug 18;292(33):13531-13540.
6. Iwamoto T, Nakamura T, Ishikawa M, Yoshizaki K, Sugimoto A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Saito M, Yamada Y, Fukumoto S., Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities, PLoS One. 2017 May 11;12(5).
7. Ishikawa M, Yamada Y., The Role of Pannexin 3 in Bone Biology, J Dent Res. 2017 Apr;96(4):372-379.
8. Orimoto A, Kurokawa M, Handa K, Ishikawa M, Nishida E, Aino M, Mitani A, Ogawa M, Tsuji T, Saito M., F-spondin negatively regulates dental follicle

differentiation through the inhibition of TGF- β activity, Arch Oral Biol. 2017 Mar 1. **9.** Cabral WA, Ishikawa M, Garten M, Makareeva EN, Sargent BM, Weis M, Barnes AM, Webb EA, Shaw NJ, Ala-Kokko L, Lachawan FL, Högler W, Leikin S, Blank PS, Zimmerberg J, Eyre DR, Yamada Y, Marini JC., Absence of the ER Cation Channel TMEM38B/TRIC-B Disrupts Intracellular Calcium Homeostasis and Dysregulates Collagen Synthesis in Recessive Osteogenesis Imperfecta, PLoS Genet. 2016 Jul 21;12(7). **10.** Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Yamada A, Saito K, Ishikawa M, Xue H, Funada K, Haruyama N, Yamada Y, Fukumoto S, Takahashi I., Plakophilin-1, a Novel Wnt Signaling Regulator, Is Critical for Tooth Development and Ameloblast Differentiation, PLoS One. 2016 Mar 24;11(3). **11.** Ishikawa M, Williams GL, Ikeuchi T, Sakai K, Fukumoto S, Yamada Y., Pannexin 3 and Connexin43 Modulate Skeletal Development via Distinct Functions and Expression Patterns, J Cell Sci. 2016 Mar 1;129(5). **12.** Yamada A, Futagi M, Fukumoto E, Saito K, Yoshizaki K, Ishikawa M, Arakaki M, Hino R, Sugawara Y, Ishikawa M, Naruse M, Miyazaki K, Nakamura T, Fukumoto S., Connexin 43 Is Necessary for Salivary Gland Branching Morphogenesis and FGF10-induced ERK1/2 Phosphorylation, J Biol Chem. 2016 Jan 8;291(2):904-12. **13.** Nakatsukasa H, Zhang D, Maruyama T, Chen H, Cui K, Ishikawa M, Deng L, Zanvit P, Tu E, Jin W, Abbatiello B, Goldberg N, Chen Q, Sun L, Zhao K, Chen W., The DNA-binding inhibitor Id3 regulates IL-9 production in CD4(+) T cells, Nat Immunol. 2015 Oct;16(10):1077-84.

[学会発表] (計 12 件)

1. Skeletal Biology Interest Group Special Seminar in NIDCR. Ishikawa M., The role of gap junction protein skeletal biology: points of view from Pannexin 3 and Connexin 43. 2018, Maryland, USA **Invited speaker** **2.** Bones & Teeth Gordon Research conferences. Ishikawa M., Pannexin 3 ER Ca²⁺ channel gating is regulated by phosphorylation at Serine 68 residue to promote osteoblast differentiation. 2018, Texas, United States **Outstanding poster award winner** **3.** Consortium of Biological Sciences 2017, Ishikawa M., The role of gap junction proteins in skeletal biology : points of view from Pannexin 3 and Connexin 43. Kobe, Japan **Invited speaker** **4.** Skeletal Biology Interest Group Special Seminar in NIDCR. Ishikawa M., The role of Pannexin 3, gap junction protein, in skeletal development and disease. 2017, Maryland, USA **Invited speaker** **5.** The 49th Annual Meeting of the Japanese Society for Matrix Biology & Medicine. Ishikawa M., Pannexin 3 is a new regulator for bone formation. 2017, Mie, Japan **Invited speaker** **6.** Skeletal Science Retreat. Ishikawa M., Pannexin 3 is regulated for bone formation by modulating Wnt/ β -catenin signaling and regulating Osterix and Connexin 43 expression. 2016, Shizuoka, Japan **Discussion award winner** **7.** The 10th biennial Pediatric Dentistry Association of Asia (PDAA) Conference. Ishikawa M., Cellular communication regulates hard tissue development. “Pannexin 3, a new member of gap junction protein family modulates skeletal development via distinct functions from Connexin43.” 2016, Tokyo, Japan **Invited speaker** **8.** 第1回口腔医科学フロンティア研究会. 石河真幸、ギャップジャンクション蛋白 Panx3 による骨形成機構の解明. 2016, 愛媛, 日本 **Invited speaker** **9.** Bones & Teeth Gordon Research conferences. Ishikawa M., Pannexin 3 and Connexin 43 regulate skeletal formation through their distinct expression patterns and functions. 2016, Texas, United States **10.** General Session & Exhibition of Biochemistry and Molecular Biology 2015. Ishikawa M., Pannexin 3 is a new regulator that inhibits osteoprogenitor proliferation and subsequently promotes differentiation to osteoblasts. 2015, Kobe, Japan. **11.** 143th General Session & Exhibition of J. Conserv. Dent. Ishikawa M., Pannexin 3 functions as an ER Ca²⁺ channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. 2015, Tokyo, Japan. **12.** 4th Tripartite Conference on Tooth and Bone; Development & Regeneration. Ishikawa M., Gap junction protein regulates hard tissue development. 2015, Tokyo, Japan. **Invited speaker**

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

Gordon Research conferences, Bones & Teeth(2018)にて Outstanding Poster award を受賞。NIH/NIDCR, skeletal group (2017,2018)、生化学会、分子生物学会合同学会 (2017)、gap junction workshop にて招待講演を行った。骨代謝学会主催の Skeletal Science Retreat (2016)で優秀 discussion 賞を受章(<http://jsbmr.umin.jp/ssr/report/index.html>)。骨代謝学会 1st Author において論文が選出された(http://www.jsbmr.jp/1st_author/170_mishikawa.html)。Panx3 KO mouse の論文(JCS,2016)は出版社 From our sister journals が発表する論文において注目論文に選ばれた(<http://thenode.biologists.com/sister-journals-march-2016/research/>)。

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：齋藤 正寛

ローマ字氏名：(SAITO, masahiro)

所属研究機関名：東北大学

部局名：歯学

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40215562

研究分担者氏名：福本 敏

ローマ字氏名：(FUKUMOTO, satoshi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：歯学

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：30264253

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山田 吉彦

ローマ字氏名：(YAMADA, yoshihiko)