

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19390527  
 研究課題名 (和文) シグナル伝達物質としてのアメロジェニンの軟骨分化・形成に対する役割の解明  
 研究課題名 (英文) Biological functions of amelogenin' s splicing isoforms on chondrocyte differentiation and cartilage formation.  
 研究代表者  
 佐伯 修一 (SAEKI SYUICHI)  
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師  
 研究者番号：60271954

## 研究成果の概要 (和文)：

歯のエナメル質が作られるときに重要な役割を果たすタンパク質の一つ‘アメロジェニン’が、他部位でも何らかの役割を果たしていることが判明してきた。本研究では、アメロジェニンが軟骨形成においてどのような役割を果たすか調べた。軟骨細胞自体にアメロジェニンタンパクを作らせることには成功しなかったが、他の細胞によって作らせたタンパクを軟骨細胞株 (ATDC5 細胞) に加えることによって評価した。その結果、アメロジェニンは軟骨細胞分化を促進し、軟骨基質分泌も促進することがわかった。アメロジェニンタンパクの軟骨細胞制御への今後の応用可能性が示された。

## 研究成果の概要 (英文)：

Amelogenin is a major protein expressed in enamel tissue and playing an important role for enamel formation. However, recent studies show that the amelogenin is expressed in various tissues including cartilage. Especially, two amelogenins among a number of splice isoforms, a full length amelogenin (M180) and a leucine rich amelogenin peptide (LRAP), are implicated as signaling molecules in the mesenchymal cells. In this study, we examined the effects of M180 and LRAP on chondrogenesis. Using differentiation medium supplemented with various concentrations of the M180 or LRAP containing medium, ATDC5 cells, a chondrogenic cell line, were cultivated. Addition of a higher concentration of M180 or LRAP to ATDC5 cells increased the alkaline phosphatase (ALP) activity at 14 days of culture compared to that in control. Increased glycosaminoglycan (GAG) secretion was also observed by alcian blue staining at 21 days of culture. Gene expression levels of ALP, Aggrecan, Col10a1 and Osteopontin were significantly increased in the samples supplemented with amelogenin at 28 days of culture. M180 and LRAP may have significant role to accelerate the chondrogenic differentiation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学, アメロジェニン, エナメルタンパク, スプライスアイソフォーム

## 1. 研究開始当初の背景

2つのアロジェニンアイソフォーム (M180 と LRAP) は、歯周、骨、その他の間葉系細胞において、本来の細胞外基質としての役割ではなく、むしろ細胞間のシグナル伝達物質としての役割を担っていると考えられる。M180 と LRAP は主要なスプライスアイソフォームであるが、それらの機能の違いについては未解明であった。アロジェニンノックアウトマウスは生後約 21 日まで (離乳前: エナメル質形成不全の影響ではない) 野生型に比較して体重が小さいこと (Eur J Oral Sci. 2006;114 S1:190-3)、LRAP の骨での過剰発現マウスは野生型に比較して長管骨の長さが長いこと (unpublished data)、また LRAP は Cbfa1/Runx2 と Sox9 の発現を制御することが判明し (*J Biol Chem.* 2000 29;275(52):41263-72)、近年アロジェニンは軟骨細胞の分化/増殖に影響を与えることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

よって、本研究の目的はアロジェニンのスプライシングアイソフォーム、特に M180 と LRAP、を軟骨細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスの表現型を解析することで、軟骨細胞分化もしくは増殖に与えるシグナル伝達物質としてのアロジェニンの機能を解明することである。

特に、

(1) M180 と LRAP はシグナル伝達物質としての役割 (もしくは作用強度) が異なる。

① M180 は、未分化な軟骨細胞の分化を促進し増殖を抑制する。

② LRAP は、未分化な軟骨細胞の分化を抑制し増殖を促進する。

(2) LRAP による RANKL 発現抑制により、軟骨への血管侵入が抑制される。

という仮説を検証することを目的とした。

矯正歯科医療は、顎顔面複合体の成長・発育を機能的あるいは器械的力学刺激によって制御することで顎顔面形態の不調和を改善し、良好な咬合形成を行うことを目的として発展してきたが、軟骨組織は顎関節の一部としてばかりでなく、顎顔面骨格の成長発育を担う成長板軟骨としても重要な役割を果たすことが知られている。本研究は、本来エナメルの基質タンパクとして分泌されるタンパクのスプライスアイソフォームが、シグナル伝達物質として他種の細胞に作用するという生物学的に非常にユニークな現象を証明するだけでなく、本研究の結果から軟骨分化の作用機序の一端を明らかにするこ

とで、最終的に軟骨発育制御や、リュウマチ性関節炎や顎関節症などの疾患を有する症状の治療など、歯科矯正治療のみならず歯科治療全体に貢献する有益な情報を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) M180 と LRAP の ATDC5 細胞における役割の詳細な解析

M180 と LRAP の蛋白発現ベクター

(pEF6V5His: Invitrogen) を ATDC5 細胞に遺伝子導入し、細胞分化/増殖の変化を詳細に解析する。

(2) トランスジェニックマウス作製用ベクター作製

(3) トランスジェニックマウスの作製

遺伝子改変マウス作製受託サービス会社へ送付し、トランスジェニックマウス (ファウンダーマウス) を得る。

(4) アロジェニン発現トランスジェニックマウスラインの選択

軟骨細胞からタンパクを抽出し、目的のアロジェニンタンパクが発現しているかどうかを、ウェスタンブロッティング法で確認する。

(5) アロジェニン発現マウスの表現型解析マウスの体重、体長計測

① 軟エックス線写真撮影による、全身の骨/軟骨の表現型の解析スクリーニング

② 軟骨の組織切片を作製し、一般組織学的所見を得る

③ マイクロ CT にて、頭蓋および長管骨の形態計測

④ 骨格のホールマウント Alizarin red、Alcian blue 染色

⑤ 軟骨細胞増殖能を比較するための、動物腹腔内への BrdU 投与後、免疫染色

⑥ アポトーシス細胞の有無 (TUNEL 染色)

⑦ II 型、X 型コラーゲン、Cbfa1、Sox9、MSX 2、PTHrP、I 型コラーゲン等の軟骨/骨の分化マーカーの発現量の違いを Q-PCR で確認するとともに、組織切片上でのパターンの変化を免疫染色にて評価

⑧ アグリカンやリンクプロテイン、I 型コラーゲンなど軟骨/骨基質の発現パターンとレベルを免疫染色にて評価

## 4. 研究成果

まず、スプライスアイソフォームである M180 と LRAP の cDNA フラグメントを所有のプラスミ

ドから適切な制限酵素で切り出し、pcDNA3.1myc-hisベクターに載せ替えを行い、目的のタンパクが正常に発現できるかどうか抗アモロジェニン抗体および抗mycタグ抗体を用いてウェスタンブロッティング法にて確認を行った。その結果、どちらの抗体でもスプライスアイソフォームに応じたサイズのタンパク発現が確かめられた。このベクターをATDC5（マウス株化軟骨細胞）に遺伝子導入し、Q-PCR法により軟骨分化関連マーカー（II型、X型コラーゲン、Cbf1a、Sox9等）発現量の変化を検索した。しかしトランスフェクションの効率が低く、かつ発現量をコントロールすることが難しく、得られた結果の解釈が困難であった。

これと平行して、トランスジェニックマウス作製用ベクターの作製も行い、動物において導入遺伝子の発現パターンがリアルタイムに観察できるように目的タンパク質をEGFP（改良緑色蛍光タンパク）と同時に発現させるため、pIRES-EGFPにまず目的cDNAの組みこみを行った。また、EF-1プロモーター下流にアモロジェニンcDNA-IRES-EGFP部分のサブクローニングをおこない、ATDC5細胞にて発現が可能かどうか確認を行ったところ、適切な蛋白の発現を得ることができなかつた。これは、アモロジェニンのタンパク自体が、軟骨細胞に高発現させることが難しいという可能性が考えられた。

この時点で、トランスジェニックマウス作成の基本的な手技および考慮すべき事項についてまとめ、実験プロトコルとして世界的に著名なプロトコル集において成果発表を行った。さらに、本研究と関連して比較することで有効なデータが得られると考えられる群として、M180 およびLRAPの遺伝子導入がなされ且つ骨にお

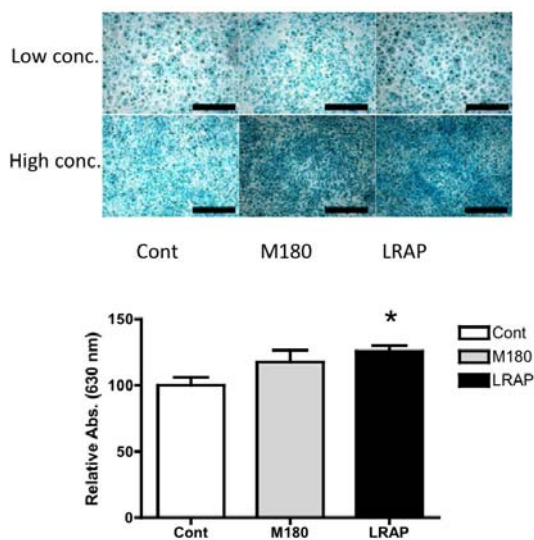


図 1

いて発現が確認されているマウスを入手し、表現型解析を行った。

ATDC5細胞にて発現が可能かどうか確認を行ったが、適切なタンパク発現が得られなかったため、アモロジェニンの異なる2つのアイソフォームを293F細胞にて強制発現させ、回収したタンパクを濃縮して軟骨細胞株ATDC5細胞へ添加し、実際軟骨分化様相の違いが起きるかどうかを分析した。

アモロジェニンの存在下でATDC5細胞を軟骨分化培地中で培養したところ、M180とLRAPは、ともにALP活性を上昇させ、軟骨基質分泌も促進させた(図1)。また、LRAPは軟骨分化誘導後7日以内にRunx2、Col2a1、Aggrecanの遺伝子発現を有意に上昇させ、M180とLRAPは軟骨分化誘導後14日以後Alkaline phosphatase、Aggrecan、Col10a1、Osteopontinの遺伝子発現を有意に上昇させるという結果が得られた(図2)。

Altered gene expressions in ATDC5 cells (14~28 days of culture)

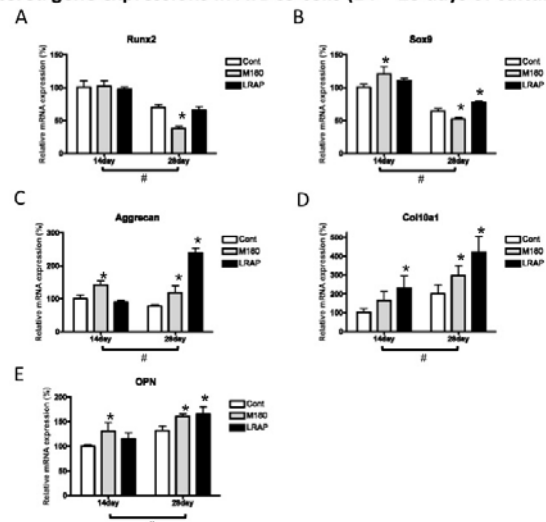


図 2

一方、軟骨細胞におけるRANKLやVEGFの発現レベルにおいて有意な変化はみられなかつた。この成果について国際学会において学会発表を行った。

本実験から得られた結果は、アモロジェニンが軟骨系細胞に及ぼす役割を明らかにし、軟骨発育制御や顎関節軟骨修復など、将来の歯科矯正治療のみならず歯科治療全体に貢献する有益な情報を得る端緒になったと考える。

## 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6件)

① Sato K, Haruyama N, Shimizu Y,

- Hara J, Kawamura H. Osteogenesis by gradually expanding the interface between bone surface and periosteum enhanced by bone marrow stem cell administration in Rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 査読あり, 2010 Feb 24. [Epub ahead of print] <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.11.005>
- ② Haruyama N, Sreenath TL, Suzuki S, Yao X, Wang Z, Wang Y, Honeycutt C, Iozzo RV, Young MF, Kulkarni AB. Genetic evidence for key roles of decorin and biglycan in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 査読あり, 2009 Apr;28(3):129-136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2683192/>
- ③ Hatakeyama J, Fukumoto S, Nakamura T, Haruyama N, Suzuki S, Hatakeyama Y, Shum L, Gibson CW, Yamada Y, Kulkarni AB. Synergistic Roles of Amelogenin and Ameloblastin. *J Dent Res.* 査読あり, 2009 Apr;88(4):318-322. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2758615/>
- ④ Choi SJ, Roodman GD, Feng JQ, Song IS, Amin K, Hart PS, Wright JT, Haruyama N, Hart TC. In vivo impact of a 4 bp deletion mutation in the DLX3 gene on bone development. *Dev Biol.* 査読あり, 2009 Jan; 325(1):129-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.014>
- ⑤ Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 査読あり, 2009 May;28(4):221-229. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2758621/>
- ⑥ Verdelis K, Ling Y, Sreenath T, Haruyama N, Macdougall M, van der Meulen MC, Lukashova L, Spevak L, Kulkarni AB, Boskey AL. DSPP effects on in vivo bone mineralization *Bone.* 査読あり, 2008 Dec; 43(6):983-990 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2621360/>
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 佐藤光一郎、春山直人、清水良央、原純一、川村仁. 骨膜延長による骨誘導に対する骨髄由来間葉系幹細胞の有効性の検討 第 9 回日本再生医療学会総会、広島、平成 22 年 3 月 18-19 日
- ② Mitani K, Haruyama N, Igarashi K. Amelogenin splice isoforms stimulate chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. The 39<sup>th</sup> Annual Meeting & Exhibition of the AADR/CADR, Washington DC, USA, March 3-6, 2010.
- ③ 三戸天元、春山直人、五十嵐薫. 筋ジストロフィーマウスにおける筋機能活性化が下顎骨の成長に与える影響. 第 68 回日本矯正歯科学会、福岡、平成 21 年 11 月 16-18 日.
- ④ 佐藤光一郎、春山直人、清水良央、原純一、川村仁. 骨-骨膜延長による骨誘導に対する骨髄由来間葉系幹細胞の有効性の検討. 第 54 回社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会、札幌、平成 21 年 10 月 9-11 日.
- ⑤ 春山直人: DSPPの象牙質石灰化における役割—マウスモデルの表現型解析から— 第 2 回 顎顔面の器官発生・形態形成研究会、軽井沢、平成 21 年 10 月 17-18 日
- ⑥ 春山直人: エナメル質および象牙質細胞外基質タンパクのシグナル分子としての生物学的機能の解析 第 25 回 東京医科歯科大学グローバルCOE総合プレゼンテーション、東京、平成 21 年 5 月 25 日.
- ⑦ Haruyama N. Functional analysis of extra cellular matrix proteins as signaling molecules predominantly expressed in tooth enamel and dentin. Tokyo Medical & Dental University Global Center of Excellence Program International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases 1<sup>st</sup> Retreat Camp (Mar. 17-18, 2007) Kanagawa, Japan.

- ⑧ Sato K, Haruyama N, Shimizu Y, Hara J, Kawamura H. Osteogenesis by gradually expanding the interface between bone surface and periosteum: Preliminary analysis of the use of novel plate and bone marrow stem cell administration in rabbit. 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science (January 15-16, 2009) Sendai, Miyagi, Japan
- ⑨ 春山直人. アメロジェニンのスプライスフォーム(LRAP)を骨特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスにおける骨代謝変化. 第29回 東北骨代謝研究会. 2008年2月2日 仙台
- ⑩ 春山直人. 象牙質シアロリン酸化タンパク(DSP)の象牙質石灰化における役割. 生体バイオマテリアル高機能インターフェイス科学 第3回高機能インターフェイス科学カンファレンス 2008年3月1日 仙台
- ⑪ Verdelis K, Wright JT, Haruyama N, Kulkarni AB, Lukashova L, Boskey AL. Enamel Phenotype and Sexual Dimorphism in Dentin of dspp-null Mouse Molars ASBMR 29th Annual Meeting (September 16-19, 2007) Hawaii, USA.
- ⑫ Suzuki S, Haruyama N, Cho A, Honeycutt C, Sreenath TL, Kulkarni AB. Characterization of molecular roles of dentin sialoprotein (DSP) and dentin phosphoprotein (DPP) in dentin biomineralization. 9th International Conference on the Chemistry & Biology of Mineralized Tissues (November 4-8, 2007) Austin, Texas, USA

[図書] (計2件)

- ① Haruyama N, Cho A, and Kulkarni AB. Overview: engineering transgenic constructs and mice. In: Current Protocols in Cell Biology. 2009 Mar; Chapter 19: Unit 19.10. Bonifacino JS, Dasso M, Harford JB, Lippincott-Schwartz J, and Yamada KM editors. NY, USA: John Wiley & Sons, Inc. pp. Unit 19.10.1 - 19.10.9 (9 pages)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/arti>

[cles/PMC2743315/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2743315/)

- ② Cho A, Haruyama N, and Kulkarni AB. Generation of transgenic mice. In: Current Protocols in Cell Biology. 2009 Mar; Chapter 19: Unit 19.11. Bonifacino JS, Dasso M, Harford JB, Lippincott-Schwartz J, and Yamada KM editors. NY, USA: John Wiley & Sons, Inc. pp. Unit 19.11.1 - 19.11.22 (22 pages)  
<http://dx.doi.org/10.1002/0471143030.cb1911s42>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐伯 修一 (SAEKI SYUICHI)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60271954

##### (2) 研究分担者

春山 直人 (HARUYAMA NAOTO)

東京医科歯科大学・歯と骨のGCOE拠点・GCOE拠点形成特任教員

研究者番号：70359529

五十嵐 薫 (IGARASHI KAORU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70202851

##### (3) 連携研究者

なし