

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791601
 研究課題名（和文） 変異型副甲状腺ホルモン受容体トランスジェニックマウスにおける骨・軟骨異常

研究課題名（英文） Abnormality of bone and cartilage in transgenic mice with mutant PTH/PTHrP receptor

研究代表者

下村 淳子 (SHIMOMURA JUNKO)
 日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
 研究者番号：00386286

研究成果の概要：本研究目的は、正常な野生型PTH/PTHrP受容体（PTH-R）タンパクは小胞体・ゴルジ体を経由してすみやかに細胞膜上に輸送されるのに対して、Blomstrand型PTH/PTHrP受容体（PTH-R^{P132L}）タンパクは小胞体の品質管理機構によって細胞膜まで輸送されず小胞体蓄積または細胞質内漏出を受ける可能性について解析することである。その結果、PTH-R^{P132L}遺伝子を過剰発現する培養骨芽細胞ならびに軟骨細胞では、変異型受容体蛋白は細胞膜上に発現せず小胞体への蓄積を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯学・矯正小児系歯学

キーワード：骨，軟骨

1. 研究開始当初の背景

骨代謝調節因子である副甲状腺ホルモン（PTH）・副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP）の受容体（PTH/PTHrP受容体、以下PTH-R）の遺伝子変異は骨・軟骨異形成症を発症させることが明らかにされている（Science 1995, New Engl. J Med. 1996）。

骨・軟骨異形成症は四肢・体幹の骨格異常ばかりでなく、口腔や顔面組織においても歯の萌出異常を誘導すること、さらに、PTHrP遺伝子欠損マウスが歯の形成・萌出異常を招くことから、これら変異型PTH-Rのシグナリング経路と細胞分化異常を解明することは、学術的・臨床的に重要かつ急務を要すると考え

られる。

2. 研究の目的

Blomstrand 型 PTH/PTHrP 受容体（以下 PTH-R^{P132L}）の機能異常、特に軟骨における作用について *in vivo* で解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PTH-R^{P132L} 遺伝子を lipofection 法にて骨芽細胞株 (MC3T3-E1) に transfection し、PTH-R に対する特異抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡観察、また pre-embedding 法による免疫電顕観察により Golgi 体、ER (粗面小胞体)、分泌顆粒、細胞膜における変異型 PTH-R タンパクの微細局在を明らかにする。

(2) MC3T3-E1 における cyclic AMP の産生を、野生型 PTH-R、PTH-R^{P132L} で比較し、変異型受容体のシグナル伝達の差異を検討する。

(3) 変異型受容体の細胞内局在・シグナリング経路に加えて、Runx-2/Cbfa-1, osterix, アルカリホスファターゼ、オステオカルシンなどの発現を PCR 法で解析することで、変異型 PTH-R 誘導における骨芽細胞の分化異常を分子レベルで解析する。

(4) type II collagen promoter/enhancer cassette に PTH-R^{P132L} 遺伝子を組み込んだ vector を構築し、マウス軟骨細胞の primary culture に一過性の発現を行いその機能を確認する。

(5) 採卵した受精卵に調整した DNA をインジェクション（顕鏡注入）し、インジェクションした受精卵を仮親の卵管に移植し、産仔を得る。但し、この過程は専門技術を要するので、研究委託をする。

(6) Founder マウスのジェノタイピングを生後 3 週目の Founder マウスの尾より抽出したゲノムを用いて、PCR 法により transgene が組み込まれたマウスをスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) 野生型 PTH-R、PTH-R^{P132L} 遺伝子発現ベクターを MC3T3-E1 細胞に transfection し、共焦点レーザー顕微鏡及び免疫電顕観察を行い、変異型受容体の細胞内局在を観察した。その結果、野生型 PTH-R 遺伝子を導入した

MC3T3-E1 細胞では、細胞膜表面に均一な PTH-R 陽性反応を認めた (図 1)。また PTH-R^{P132L} 遺伝子を導入した細胞では、細胞膜表面に PTH-R 陽性反応をほとんど認めず、小胞体の一部に蓄積する像、および細胞質内に拡散する像を認めた (図 2)。以上の結果より、野生型 PTH-R タンパクは小胞体・ゴルジ体を経由してすみやかに細胞膜上に輸送されるが、PTH-R^{P132L} タンパクは小胞体の "quality control (品質管理機構)" によって細胞膜まで輸送されず、小胞体蓄積および細胞質内漏出によって処理される可能性が推測された。

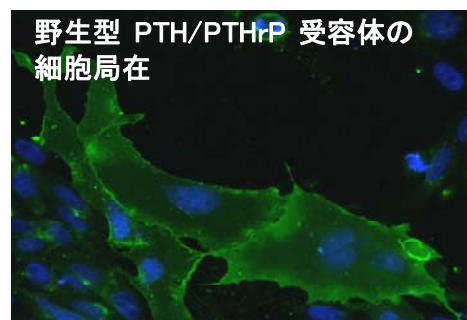


図 1



図 2

(2) 野生型 PTH-R および PTH-R^{P132L} タンパクをそれぞれ発現させた骨芽細胞を用い、PTH-R タンパクの細胞内局在を western blot 法にて確認したところ、野生型 PTH-R タンパクは膜に強い局在を示したのに対し、PTH-R^{P132L} タンパクは細胞質および膜分画にそれぞれわずかに局在していること、すなわち小胞体などの organelle に蓄積されていることが示唆された。また、PTH-R を導入していないコントロールでは、PTH-R タンパクは検出されなかった (図 3)。これらの結果は免疫電顕でも確認された。

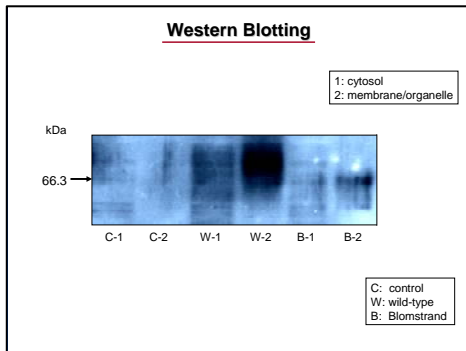


図 3

さらに、変異型 PTH-R と野生型 PTH-R とのユビキチン化の相違について比較検討するため、PTH-R 発現ベクターを transfection した骨芽細胞に proteasome 抑制剤である MG132 を投与後、抗 PTH-R 抗体で免疫沈降を行い、その後抗ユビキチン抗体を用いて western を行ったところ、有意な差を得ることができなかった。これは、上記手法による検出の難しさを示していると考えられたため、新たに PTH-R 発現ベクターの C 末端に c-myc tag を付加した発現ベクターを構築し、以後の実験に用いた。

(3) type II collagen promoter/enhancer cassette に野生型 PTH-R または PTH-R^{P132L} 遺伝子を組み込んだ vector を構築し (図 4)、マウス軟骨細胞の primary culture に一過性の発現を行いその機能を確認した。

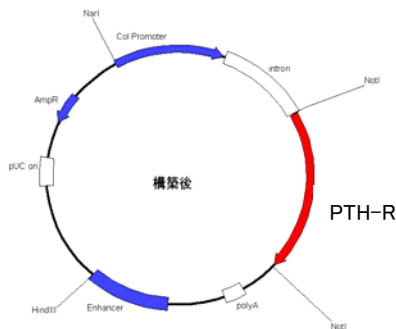


図 4

(4) 以上の研究成果について、日本小児歯科学会、日本骨代謝学会、米国骨代謝学会、歯科基礎医学会および国際歯科研究学会において発表を行い、さらに Biomedical Research, 2008. に掲載された。現在、type II collagen promoter/enhancer cassette に野生型 PTH/PTHrP 受容体遺伝子を組み込んだ vector を、採卵した受精卵に顕鏡注入し、インジェクションした受精卵を仮親の卵管に移植し、産仔 (野生型 PTH-R のトランスジェニックマウス) を得た。さらに、Founder マウスのジ

ェノタイピングを行い、組織異常解析および遺伝子発現解析中であり、今後は変異型 PTH-R のトランスジェニックマウスを作製し、その解析につなげる予定である。

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 7 件)

- ① Shimomura-Kuroki J., Yamashita K, Shimooka S: *Tannerella forsythia* and the HLA-DQB1 allele are associated with susceptibility to periodontal disease in Japanese adolescents, *Odontology*, 97:32-37, 2009. (査読有り)
- ② Endo T, Ozoe R, Shinkai K, Shimomura J., Katoh Y, Shimooka S: Comparison of shear bond strengths of orthodontic brackets bonded to deciduous and permanent teeth, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 134: 198-202, 2008. (査読有り)
- ③ Shimomura-Kuroki J., Sobhan U, de Freitas PH, Li M, Ishida Y, Saito N, Oda K, Shimooka S, Amizuka N: Rat wild-type parathyroid hormone receptor (PTH-R) and mutant PTH-R^{P132L} show the different intracellular localization in vitro, *Biomedical Research*, 29(2); 61-69, 2008. (査読有り)
- ④ 網塚憲生, Ubaidus Sobhan, 小島 拓, Freitas Paulo HL, 李 敏啓, 下村淳子: 骨細胞・骨細管系の顕微解剖学, 腎と骨代謝, 21(3): 183-190, 2008. (査読なし)
- ⑤ Ali MM, Yoshizawa T, Ishibashi O, Matsuda A, Ikegame M, Shimomura J., Mera H, Nakashima K, Kawashima H: PIASxβ is a key regulator of osteoblast transcriptional activity and matrix mineralization in osteoblasts. *Journal of Cell Science*. 120(15): 2565-2573, 2007. (査読有り)
- ⑥ Li M., Sasaki T., Ono K., de Freitas PH., Sobhan U., Kojima T., Shimomura J., Oda K., Amizuka N.: Distribution of macrophages, osteoclasts and the B-lymphocyte lineage in osteolytic metastasis of mouse mammary carcinoma. *Biomedical Research*. 28(3): 127-137, 2007. (査読有り)
- ⑦ 網塚憲生, 李 敏啓, 下村淳子: 【骨粗鬆症一臨床と研究の最新動向】骨粗鬆症理解のための基礎, 骨の構造と機能, 医学のあゆみ, 221 巻 1 号, 5-13 頁, 2007 年 4 月. (査読なし)

[学会発表] (計 4 件)

- ① **Shimomura-Kuroki J**, Yamashita K, Oda K, Shimooka S, Amizuka N: Abnormal intracellular localization and transport of a PTH-R mutant protein, The 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008. 7.2-7.5, Toronto, Canada, J of Dent. Res., 87 (Special Issue B), 877, 2008.
- ② **下村淳子**, 山下貴絵, 下岡正八: PTH/PTHrP受容体遺伝子変異による細胞内局在異常, 第46回日本小児歯科学会大会, 2008.6.12-13, 埼玉, 小児歯科学雑誌, 46(2): 140, 2008.
- ③ **下村淳子**, 下岡正八: 若年者における歯周病原性菌と遺伝的要因の関係, 第45回日本小児歯科学会大会, 2007.7.19-20, 東京, 小児歯科学雑誌 45(2): 245, 2007.
- ④ 喜井 勲, 徐方, **下村淳子**, 網塚憲生, 常 智杰, 工藤 明: カドヘリン-11 はマウス頭蓋骨発生においてFGF受容体1を安定化する, 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会, 2007.5.28-30, 福岡, 日本発生生物学会・日本細胞生物学会合同大会要旨集 40回・59回, p169, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下村 淳子 (SHIMOMURA JUNKO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 00386286

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし