

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592605

研究課題名（和文）：アメロジェニンの骨形成に関与する新規受容体の特定

研究課題名（英文）：Determine the novel amelogenin receptor which influence bone formation

研究代表者

小西 郁理 (KONISHI IKURI)

長崎大学・病院・客員研究員

研究者番号：00572380

研究成果の概要（和文）：

アメロジェニンは骨芽細胞内で約 23 種類の転写因子を活性化させた。これら転写因子を *in silico* にてデータマイニングを行った結果、ERKシグナル、Wnt/ β -cateninシグナル、TGF- β ・BMP/Smadシグナルの3種類のパスウェイを介していると考えられた。そこで、これらシグナルを介しているかどうかリン酸化抗体を用いて検証した結果、Smadシグナルに変化は見られなかったのに対し、ERK、 β -cateninの活性化が認められた。以上の事から、CD63、LAMP1 以外の アメロジェニンの新規受容体としてWnt受容体である Frizzledファミリー等の関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Amelogenin stimulated about 23 kinds transcription factors in osteoblast. These transcription factors were analyzed by in silico data mining. This result was speculated that Amelogenin signaling pathways were ERK signal, Wnt/ β -catenin signal and TGF- β BMP/Smad signal. To confirm this result, it was inspected by a phosphorylation antibody whether Amelogenin through these signals in osteoblast or not.

Smad2/3/5 did not effect but ERK and β -catenin were activated by amelogenin. Thus, it is suggested that novel amelogenin receptor not involving LAMP1 and CD63 may be Frizzled families which were a Wnt receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：アメロジェニン・骨芽細胞・骨形成・受容体

1. 研究開始当初の背景

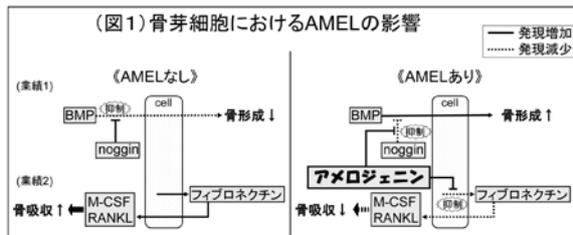
小児歯科領域における歯周疾患として若年性歯周炎が挙げられる。これらの歯周炎は *Aggregatibacter*

(*Actinobacillus*)

actinomycetemcomitans (以下 *A.a*)が原因菌といわれ、白血球を抑制することによって免疫力を下げ、不可逆的に急速な歯槽骨の吸収を引き起こす事が知られている。我々は以

前の研究で *A.a* が骨芽細胞の治癒能力を抑制する事も突き止めた。しかし、本疾患に対する特効薬は未だ発見されず、現在でも非常に予後が悪い疾患である。その一方で、成人の歯周外科治療ではエムドゲインが使用されており、病的骨吸収が見られる部位に塗布する事により、骨が回復することが臨床的に証明されている。エムドゲインはブタの歯胚から抽出したエナメルマトリックス蛋白であり、主な成分はアメロジェニン(AMEL)である。アメロジェニンはエナメル芽細胞特異的に発現し、エナメル質形成に関与している事が知られている。しかしアメロジェニンノックアウトマウスでは破骨細胞が増加し、歯根を吸収することから、アメロジェニンが骨代謝にも関与している事が示唆された。

そこでこのメカニズムを詳細に検証したところ、アメロジェニンが骨芽細胞に作用し、フィブロネクチンの発現量を抑制することにより、二次的に破骨細胞分化誘導を行う M-CSF や RANKL の発現量を抑制して破骨細胞分化を抑制する事を突き止めた(図1)。



更にアメロジェニンは BMP のアンタゴニストである noggin をブロックすることにより、骨分化抑制を阻害している事も突き止めた(図1)。

この様にアメロジェニンによる骨代謝への影響は徐々に解明されつつあるが、骨芽細胞内で起こるシグナルの解析についてはほとんど研究されていない。近年、アメロジェニンと結合する分子として LAMP1 や CD63 (LAMP3) が報告され、さらにアメロジェニンが LAMP1 と CD63 と結合し、細胞内へ取り込まれる事が報告された。そのため、これらの分子がアメロジェニンの受容体と考えられている。しかし、LAMP1 や CD63 は様々な分子を細胞内のライソソームに運び、分解する事で知られている。この事から、LAMP1 や CD63 はアメロジェニンの受容体と言うよりも分解・除去する分子の可能性が考えられる。

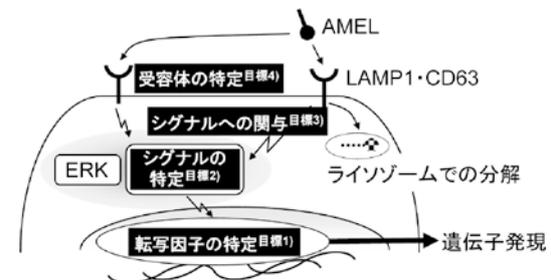
2. 研究の目的

本研究はアメロジェニンにより骨芽細胞内で活性化される転写因子を決定し、これら転写因子に関連するシグナルパスウェイを特定し、更に上流に位置する受容体を模索する。最終的には新たな受容体を発見する事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では直接受容体を探るのではなく、《転写因子の特定 → 細胞内シグナルの特定 → 受容体の特定》の様に逆方向から検索を行うことによって受容体の候補分子を特定する(図2)。具体的には以下の実験を行う。

(図2) 骨芽細胞におけるAMELの動向



- 1) 骨芽細胞内において、アメロジェニンによって活性化される転写因子の解明
 - ①以前の研究でマウスの歯胚を元に作製した全長アメロジェニンを大腸菌発現プラスミドである pET22b に組み込んだアメロジェニン発現ベクターを既に構築済みである。今回はこの発現ベクターを大腸菌 BL21 に遺伝子導入し、IPTG 誘導にてアメロジェニンを発現させる。発現したアメロジェニンは Ni ビーズにて回収し、精製、LPS 除去、可溶化を行う。
 - ②リコンビナントアメロジェニンをマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) に 2μg/ml になるように添加し、1 時間後、3 時間後に細胞を回収する。この細胞よりタンパクを精製し、Panomics 社の Protein/DNA arrays を用いてアメロジェニンによって活性化された転写因子のスクリーニングを行う。
 - ③Protein/DNA arrays の結果を基に BIOCARTA Pathways (<http://www.biocarta.com/genes/index.asp>)、Nature Pathway Interaction Database (<http://pid.nci.nih.gov/index.shtml>)、STRING (<http://string-db.org/>)、SIGMA Your Favorite Gene (<http://www.sigmaldrich.com/life-science/your-favorite-gene-search.html>) 等を利用し、転写因子のアレイ結果をデータマイニングすることによって、これら転写因子の上流に位置するシグナルを検討し、アメロジェニンによる骨芽細胞内でのパスウェイをインシリコにて検討する。

- 2) 上記転写因子に関与する細胞内シグナルの解析

転写因子のアレイの結果をデータマイニングし、候補シグナリングパスウェイについて確認を行う。具体的には、リコンビナントアメロジェニンをマウス骨芽細胞様細胞

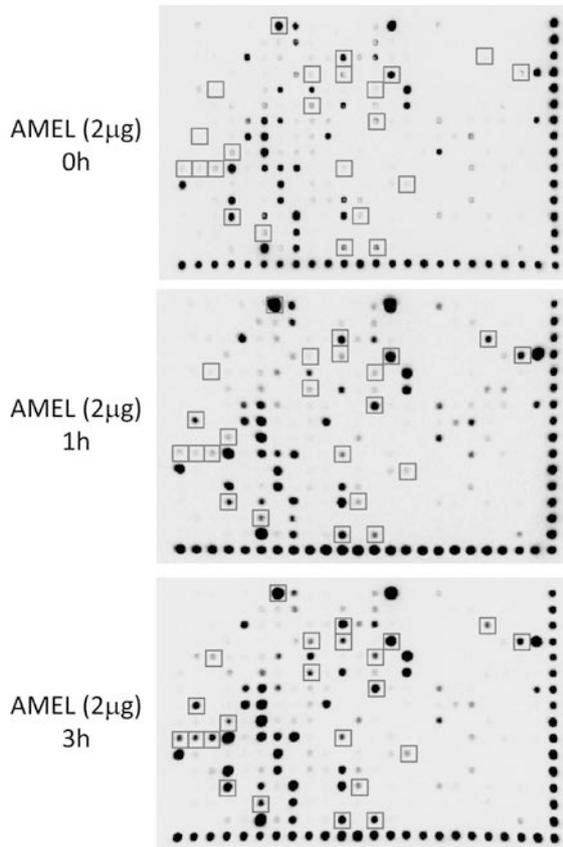
(MC3T3-E1 細胞)に 2 μ g/ml になるように添加し、0, 5, 15, 30 分後に細胞を回収し、タンパクを抽出する。得られたタンパクは電気泳動し、シグナリングパスウェイ中にある分子 (NF- κ B, ERK, Smad, JAK, Stat, p38, AKT 等) のリン酸化抗体を用いてシグナルが活性化しているかどうかを検討する。

4. 研究成果

1) リコンビナントアメロジェニンにより刺激されたマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 に対する Protein/DNA Arrays の結果

骨芽細胞にアメロジェニンを添加し、0, 1, 3 時間後に 345 種類の転写因子に対する影響を検討した。刺激直後 (0h) では既に 106 のスポットが検出された。1 時間後では 114 のスポット、3 時間後では 141 のスポットが検出された。(図 3)

(図 3) AMEL により活性化する転写因子



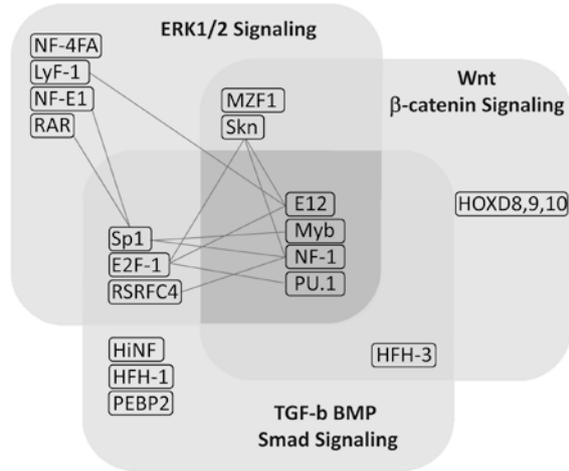
このうち、時間と共にシグナルの増加が認められたのは 23 種類の転写因子であった。以上の事より、骨芽細胞におけるアメロジェニンにより活性化される分子のスクリーニング結果として 23 の転写因子が関与していると考えられた。

2) *in silico* によるデータマイニング

Protein/DNA Arrays の結果から得られた 23

の転写因子に対して、BIOCARTA Pathways、Nature Pathway Interaction Database、SIGMA Your Favorite Gene 等を使い、転写因子上流に位置する細胞内シグナルを探り、また STRING、SIGMA Your Favorite Gene、PubMed 等を使い、転写因子関連分子を抽出した。これらの結果から細胞内シグナルカスケードを決定した(図 4)

(図 4) AMEL による骨芽細胞内シグナルカスケード



その結果、TGF- β ・BMP/Smad、ERK1/2、Wnt/ β -catenin 経路がアメロジェニンによる骨芽細胞内シグナルの候補パスウェイをとって考えられた。またこの内、Hoxd8, 9, 10 は Wnt/ β -catenin 経路のみに関与しており、HiNF、HFH-1、PEBP2 は TGF- β ・BMP/Smad 経路のみに関与しており、他の転写因子との関連は見られなかった。その反面、ERK 経路のみに関与する Lyf-1、NF-E1、RAR は TGF- β ・BMP/Smad や Wnt/ β -catenin 経路により活性化される Sp1 や E12 等の転写因子とも関連が見られる事からアメロジェニンのシグナルは ERK シグナルから波及し、TGF- β ・BMP/Smad と Wnt/ β -catenin 経路が活性化していると考えられる。

3) リン酸化抗体を用いた細胞内シグナルの特定

① TGF- β シグナルについて

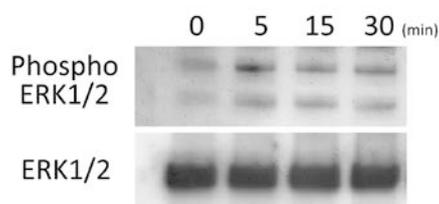
まず、第一の候補である TGF- β は細胞表面にある TGF レセプター I, II を受容体として細胞内で Smad2/3 を介してシグナルを伝達することが分かっている。そこで骨芽細胞にアメロジェニンを添加し、smad2/3 のリン酸化を検討した。しかし、5 分-30 分反応させても Smad のリン酸化に影響がなく、活性化されなかった。このことからアメロジェニンによる骨芽細胞へのシグナルは TGF レセプターを介していないことが明らかとなった。また、BMP シグナルは Smad1/5/8 を介して転写因子を活性化することが知られている。そこで同様に smad1/5/8 のリン酸化を検討したところ、5

分-30分反応させても Smad のリン酸化に影響が見られず、活性化されなかった。以上の事から、アメリロジェニン[®]は TGF- β スーパーファミリーである TGF- β 、BMP どちらも直接介さずに細胞内へシグナルを伝達していると考えられる。

②ERK1/2 シグナルについて

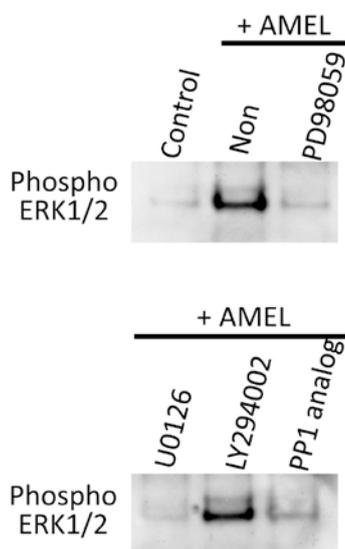
次に ERK シグナリングについて検討を行った。先ほどと同様に骨芽細胞にアメリロジェニンを添加し、ERK のリン酸化抗体にて検出を行った結果、ERK は 5 分後から活性化し、30 分後でも活性化が持続していることが判明した(図 5)。

(図 5) AMEL による ERK シグナル



次に ERK の上流に位置する MEK1/2 の阻害剤

(図 6) 阻害剤による ERK シグナル



である U0126、PD98059、Src の阻害剤である PP1analog、AKT の阻害剤である LY294002 を骨芽細胞に添加した後、アメリロジェニンで刺激を行った。その結果、U0126、PD-98059、PP1analog を添加した群では ERK のリン酸化が阻害された(図 6)。

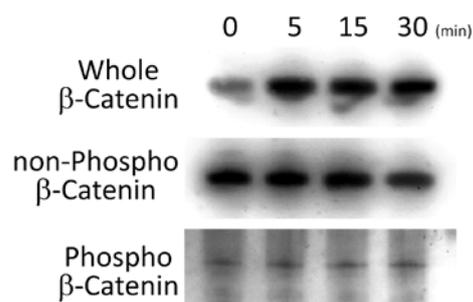
このことから、アメリロジェニンの ERK リン酸化には MEK、Src が関与している事が示唆され

た。

③Wnt/ β -catenin シグナルについて

最後に β -cateninシグナリングについても検討を行った。先ほどと同様に骨芽細胞にアメリロジェニンを添加し、総 β -catenin とリン酸化 β -catenin 量、非リン酸化 β -catenin 量を測定したところ、リン酸化 β -catenin 量は一定であったが、総 β -catenin 量の上昇と非リン酸化 β -catenin 量の減少が認められた(図 7)。

(図 7) AMEL による β -catenin シグナル



β -catenin は休止状態でリン酸化しており、刺激を受けることによって脱リン酸化が起こり、細胞内へシグナルを伝達する。そのため本結果からアメリロジェニンにより β -catenin が活性化していることが示唆された。 β -catenin の上流として Wnt シグナルが最もよく知られている。Wnt ファミリーはレセプターである Frizzled ファミリーと結合し、ヒト骨芽細胞では Frizzled2, 3, 4, 6 が発現している事も知られている。また、Wnt3 は β -catenin だけではなく、ERK シグナルも活性化することが知られ、近年では Wnt と Erk の関連性がいくつか報告されている。このことからアメリロジェニンは Frizzled を介して骨芽細胞に ERK や β -catenin シグナルを伝達している可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 郁理 (KONISHI IKURI)
長崎大学・病院・**客員研究員**
研究者番号：00572380

(2) 研究分担者

星野倫範 (HOSHINO TOMONORI)
長崎大学・病院・講師
研究者番号：00359960

西口 美由季 (NISHIGUCHI MIYUKI)
大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10253676

日高 聖 (HIDAKA KIYOSHI)
大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10389421

藤原 卓 (FUJIWARA TAKU)
大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00228975

佐藤 恭子 (SATOU KYOUKO)
長崎大学・病院・助教
研究者番号：70404499

(3) 連携研究者

なし