

機関番号：32667

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792098

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の受容体機能異常と軟骨異常

研究課題名（英文）Abnormality of receptor mechanism 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（和文）：本研究では、Blomstrand型変異PTH/PTHrP受容体（PTH-R^{P132L}）の機能異常、特に軟骨における作用について、そのシグナリング経路と細胞分化異常を*in vivo*で解明することを目的とし、PTH-R^{P132L}トランスジェニックマウスの作製を行い、その解析を行った。その結果、PTH-R^{P132L}変異型マウスの軟骨異常の表現型はPTHrP欠損マウスまたはPTH-R欠損マウスの異常と極めて類似していた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the altered signaling pathway and abnormal cell differentiation caused by the PTH/PTHrP receptor with P132L mutation (PTH-R^{P132L}), which is overexpressed in murine cartilage. Transgenic mice carrying PTH-R^{P132L} were generated and histologically analyzed. As a consequence, the histological phenotype of cartilage of PTH-R^{P132L} transgenic mice was similar to the knockout mice of PTHrP or PTH-R.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

平成 19 年度および 20 年度の科学研究費補助金において、*in vitro* の手法を用い、Blomstrand 型軟骨異形成症の骨格異常が、単にリガンド・受容体の結合能の欠如ばかりでなく受容体の局在異常にも起因すること、さらに変異型 PTH-R タンパクの細胞内輸送異常が、小胞体での品質管理機構による可能性が推察されることを報告した。

今回は、Blomstrand 型変異 PTH-R (PTH-R^{P132L}) の機能異常、特に軟骨における作用について、そのシグナリング経路と細胞分化異常を *in vivo* で解明することを目的とし、PTH-R^{P132L} トランスジェニックマウス (TGマウス) の作製と作製した TGマウスを用いて形態学的検討を行った。

3. 研究の方法

- (1) Type II collagen promoter/enhancer cassette (長崎大学・小守教授よりご供与) に PTH-R^{P132L} 遺伝子を組み込んだ vector を作製し (図 1)、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。

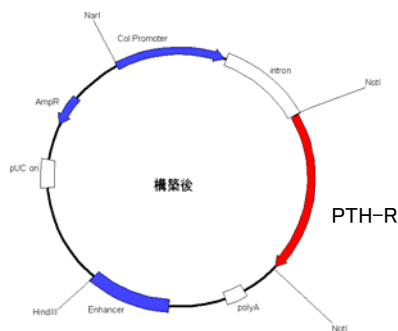


図 1 : ベクター構築

- (2) 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する。但し、この過程は専門技術を要するので、研究委託をする。
- (3) 胎生 18 日目で開腹により胎仔を得た後、尾からゲノムを抽出し、これを用いて、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) 組織切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色と、type II collagen および type X collagen に特異的な抗体を用いた免疫組織学的検討を行う。

4. 研究成果

- (1) マウス軟骨細胞の primary culture に作製した PTH-R^{P132L} 発現ベクターをマウス軟骨細胞の primary culture に transfection し、myc 抗体にて局在を確認したところ、野生型 PTH-R を強発現させた細胞では膜表面に発現を認めたが、PTH-R^{P132L} を強発現させた細胞では膜表面への発現をほとんど認めなかった (図 2)。

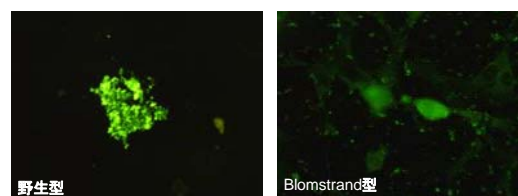


図 2 : c-myc 抗体による免疫染色

- (2) マイクロインジェクション (企業委託) に関しては、以下の手順で行われた。
 - ① 採卵用メスマウス (C57BL/6) の卵管膨大部より採卵する。
 - ② 採卵した前核期受精卵に精製済みの DNA 溶液をインジェクトする。
 - ③ インジェクトした受精卵を 1 昼夜インキュベート (37°C, 5%CO₂) し、翌日に 2 細胞期に発生した受精卵をレシピエントマウスに移植する。
- (3) レシピエントマウス計 9 腹を開腹し、ジェノタイピングおよび組織固定を行った。ジェノタイピングの結果、5/26 の確率で陽性を示した。陽性を示したマウスを PTH-R^{P132L} 遺伝子が組み込まれた TGマウスとして解析に用いた。
- (4) PTH-R^{P132L} 遺伝子が組み込まれた TGマウス胎仔の外観は PTH-R^{P132L} 遺伝子が組み込まれていない Control のマウス胎仔と比較して四肢が短かった (図 3)。



図 3 : 胎生 18 日齢マウス胎仔の表現系

- (5) H-E染色を行った結果、PTH-R^{PI32L} TGマウス胎仔では骨端軟骨の異形成が観察された(図4)。

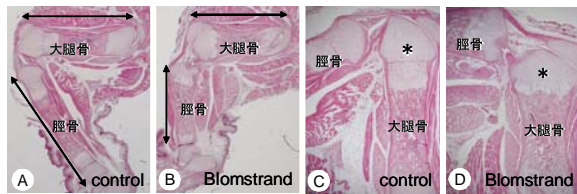
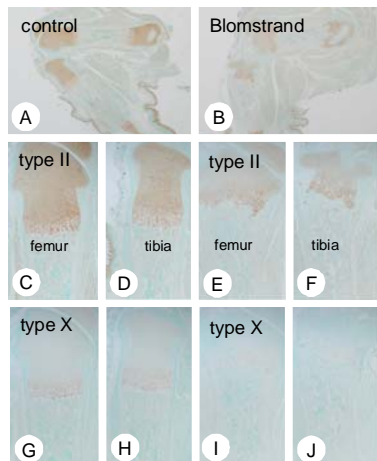


図 4 : Control マウス(A, C)と Blomstrand 型変異 PTH-R^{TG} マウス(B, D)の大腿骨および脛骨の HE 染色所見。図 A, B では Blomstrand 型 TG マウスの大腿骨と脛骨が短縮していることがわかる(矢印)。弱拡大で観察すると、大腿骨の骨端軟骨(*)が Blomstrand 型マウス(C)では低形成を示していた。

- (6) H-E染色での結果をふまえて、type II collagenに対する免疫染色を行った結果、PTH-R^{PI32L} TGマウス胎仔では、controlマウス胎仔と同様に、低形成を示しながらも軟骨基質はtype II collagen陽性を示した。さらに、type X collagenに対する免疫染色を行った結果、PTH-R^{PI32L} TGマウス胎仔では、type X collagen陽性を示す肥大化層も低形成を示していた(図5)。



- 図 5 : Control マウス(A, C, D, G, H)と PTH-R^{PI32L}TGマウス(B, E, F, I, J)の大腿骨(femur)および脛骨(tibia)の type II collagen(A-F)と type X collagen(G-J)の免疫染色所見。低倍像(A, B)および弱拡大像でも軟骨に一致したtype II collagen陽性反応がcontrolおよびPTH-R^{PI32L}TGマウスのどちらにも認められた。一方、type X collagen陽性反応は、controlマウスの骨端軟骨下層、すなわち、肥大化層に一致した領域で観察されたが、PTH-R^{PI32L}を過剰発現するTGマウスでは、弱いtype X collagen陽性反応が、骨端軟骨下層に観察されたにすぎなかった。

- (7) 以上の研究成果について、日本小児歯科学会において発表を行った。また、同学会において第 47 回日本小児歯科学会大会奨励賞を受賞した。現在、論文投稿に向け準備中である。

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 5 件)
- ① Li M, Seki Y, Freitas PH, Nagata M, Kojima T, Sultana S, Ubaidus S, Maeda T, Shimomura J, Henderson JE, Tamura M, Oda K, Liu Z, Guo Y, Suzuki R, Yamamoto T, Takagi R, Amizuka N: FGFR3 down-regulates PTH/PTHrP receptor gene expression by mediating JAK/STAT signaling in chondrocytic cell line, J Electron Microscopy, 59:227-236, 2010. (査読有り)
 - ② 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)
 - ③ 黒木大雄, 下村一黒木淳子, 遠藤敏哉, 伊藤秀俊, 水谷太尊, 山口晃: 上下顎歯列弓の不調和を伴う骨格性下顎前突の 1 例—上顎 2 分割 Le Fort I 型骨切り術と下顎枝垂直骨切り術の併用による咬合改善—, 日本顎変形症学会雑誌, 20 巻 33 号; 234-244 頁, 2010 年. (査読有り)
 - ④ 下村一黒木淳子: 副甲状腺ホルモン受容体点突然変異と細胞内局在異常, 小児歯科学雑誌, 47(4); 550-554, 2009. (査読有り)
 - ⑤ Sobhan Ubaidus, Sara Sultana, 織田公

光, 小島拓, 李敏啓, 鈴木礼子, 柳鑄晟, 網塚憲生, 小沢英浩, 下村一黒木淳子: 骨細胞・骨細管系におけるFGF23とDMP-1の免疫局在, The BONE, 23(4); 3-8, 2009. (査読無し)

[学会発表] (計5件)

- ① Matsuda K, Shimomura-Kuroki J, Haga M, Yoshie S, Shimooka S. Expression of DMP-1 in alveolar bone during physiological tooth movement. The 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010. 7.14-17, Barcelona, Spain, J of Dent. Res., 4255, 2010.
- ② 下村一黒木淳子, 松田貴絵, 網塚憲生, 下岡正八: PTH/PTHrP受容体トランスジェニックマウスにおける骨・軟骨異常, 平成22年度日本小児歯科学会秋期大会, 郡山, 2010年12月2-3日, 小児歯科学雑誌, 48(5); 569, 2010.
- ③ 松田貴絵, 下村一黒木淳子, 羽下麻衣子, 吉江紀夫, 下岡正八: マウス臼歯の生理的遠心移動による歯槽骨でのDMP-1の発現様式, 第48回日本小児歯科学会, 名古屋, 2010. 5. 19-20, 小児歯科学雑誌, 48(2); 212, 2010.
- ④ 下村一黒木淳子, 山下一松田貴絵, 本間裕章, 田中聖至, 下岡正八: 小児における口腔疾患発症リスクの評価, 第46回日本小児歯科学会大会, 2009. 5. 14-15, 大阪, 小児歯科学雑誌, 47(2): 379, 2009.
- ⑤ 下村一黒木淳子: 骨改造現象に関わる骨代謝調節因子に関する研究, 第47回日本小児歯科学会大会奨励賞受賞講演, 第47回日本小児歯科学会大会, 大阪, 2009年5月15日.

[図書] (計1件)

- ① 下村淳子, 下岡正八: 第2章, 小児歯科に必要な心身の発育, 新小児歯科学第3版, 下岡正八他編, クインテッセンス出版株式会社, 東京, 14-49頁, 2009.

[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

<http://www.ngt.ndu.ac.jp/guide/kouza/dental11.html>

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

