

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09882

研究課題名(和文) 歯髄におけるGCCaseの核移行に着目した新規創傷治癒因子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel wound healing factors focusing on nuclear accumulation of GCCase in human dental pulp

研究代表者

室町 幸一郎 (MUROMACHI, Koichiro)

神奈川県立歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：50637072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト歯髄培養細胞(hDPCs)においてBMP-1により制御されるGCCaseが果たす役割の解明と新規創傷治癒因子の同定を目的に研究を行った。

GCCaseはlysosomeに局在することが知られるが、BMP-1によりGCCaseはimportin- を介した核内輸送経路によって核移行しCCN2のmRNA発現を調節することを明らかにした。加えて、hDPCsにsiGCCaseを導入しRNA-seqにて解析したところ、BMP-1-GCCaseはDNA replicationなどに関する複数の遺伝子の発現を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BMP-1が細胞内の標的分子としてGCCaseの局在を制御しCCN2遺伝子発現に関与するとの報告はなく、また象牙質・歯髄複合体におけるスフィンゴ糖脂質分解酵素に着目した研究も皆無であることから本研究結果は学術的意義を有すると考える。

GCCase遺伝子の変異を原因とする疾患にGaucher病があるが、本研究はGCCaseの新たな制御機構を解明したことでGaucher病の診断や治療薬の開発に寄与する可能性を有しており、歯科に止まらない幅広い社会的意義を持つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the role of GCCase regulated by BMP-1 in human dental pulp cells (hDPCs) and to identify novel wound healing factors.

We found that BMP-1-mediated nuclear accumulation of GCCase through importin- mediated nuclear import pathway regulates mRNA expression of CCN2. In addition, RNA-seq analysis of hDPCs transfected with siGCCase revealed that BMP-1-GCCase regulates the expression of multiple genes involved in DNA replication.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：象牙質・歯髄複合体 BMP-1 GCCase

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は齶蝕に罹患した象牙質・歯髄複合体の創傷治癒におけるプロテアーゼを起点とした機序を解明することで、歯髄保存療法へ応用可能な新規標的分子の同定と機能解析を行い創薬への展開を目的として研究を行っている。

これまでの研究から、齶蝕歯の象牙芽細胞様細胞および修復象牙質において発現が亢進する bone morphogenetic protein (BMP)-1 が glucosylceramidase (GCase) を標的とすることを明らかにしている。GCase は glucosylceramide を glucose と ceramide に加水分解する酵素であり lysosome に局在することが知られているが、興味深いことに BMP-1 の存在下で核へ集積することを見出している。分子の核内への輸送は nuclear localization signal (NLS) 配列を認識した importin によって行われる。しかしながら、BMP-1-GCase 系が importin 核内輸送経路を介するとの報告は見当たらない。

一方で、研究代表者は過去の研究から BMP-1 が cellular communication network factor (CCN) 2 の発現を促進することを明らかにしている (Muromachi *et al.*, 2015)。

このことから、本研究では BMP-1 による CCN2 発現における GCase の核移行と importin- $\beta$  の核内輸送経路の関与について検討を行うとともに、RNA-seq を用いた網羅的解析から歯髄において BMP-1-GCase 系が制御する新規創傷治癒因子の同定を試みるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト歯髄培養細胞 (hDPCs) において BMP-1 により制御される GCase の局在および CCN2 発現における役割の解明と新規創傷治癒因子の同定を目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 細胞培養：治療目的で抜歯予定の患者に研究のインフォームドコンセントを行い、同意後に抜去された健全歯から歯髄を抽出したのち、3~5代継代培養した細胞を hDPCs として実験に用いた。なお本研究は神奈川県大学倫理委員会の承認を得て行った(承認番号: 277)。
- (2) Immunofluorescence：hDPCs を chamber slide に播種し rhBMP-1 (500 ng/ml) で刺激したのちに、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、rabbit anti-GCase 抗体および mouse anti-LAMP1 抗体を一次抗体として、Alexa Fluor 594-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragments of goat anti-rabbit IgG (H + L) 抗体および goat anti-mouse IgG H&L (Alexa Fluor 488) 抗体を二次抗体として蛍光多重免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて GCase と LAMP1 の細胞内共局在を解析した。また hDPCs を importin- $\beta$  阻害剤 importazole (5  $\mu$ M) および exportin 1 阻害剤 KPT-276 (10  $\mu$ M) にて1時間前処理したのちに rhBMP-1 で刺激し蛍光免疫染色を行い GCase の核移行を解析した。
- (3) siRNA transfection：hDPCs を lipofectamine 2000 および 200 nM siRNA にて24時間刺激し GCase のノックダウン系を作製した。siGCase の導入後に hDPCs を rhBMP-1 にて刺激したのちに total RNA を抽出した。
- (4) Real-time RT-PCR：total RNA から PrimeScript RT Master Mix を用いて逆転写反応により cDNA を合成したのちに、Thermal Cycler Dice Real Time System II を用いて Real-time RT-PCR を行った。

(5) RNA-seq : hDPCs に siRNA を導入し GCCase のノックダウンを行ったのちに BMP-1 にて刺激後に total RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析にて転写産物の発現変動を網羅的に探索した。

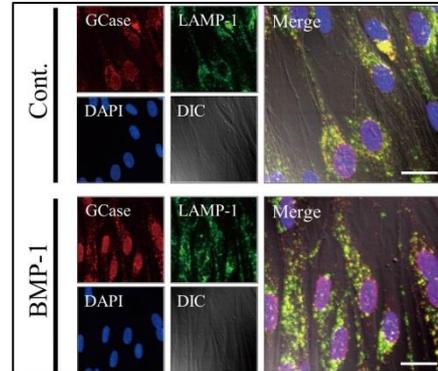
#### 4. 研究成果

##### (1) BMP-1 によって GCCase は lysosome ではなく核へ集積する

hDPCs において、cont. 群では GCCase は lysosome マーカーである LAMP1 と一致する局在を示した。またわずかに核にも GCCase シグナルを認めた。

一方で、BMP-1 群においては核における GCCase シグナルが増強した (Fig. 1)。

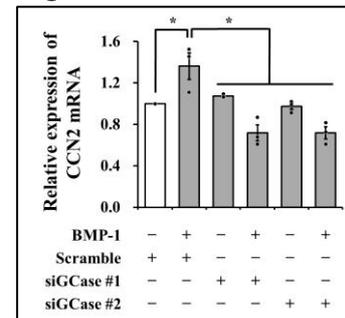
Fig. 1



##### (2) GCCase は BMP-1 による CCN2 発現の制御に寄与する

hDPCs にデザイン異なる 2 種の siGCCase を導入したのちに BMP-1 にて刺激したところ、CCN2 mRNA 発現は GCCase ノックダウンによって有意に抑制された。なお、siGCCase は CCN2 発現のベースラインに影響を及ぼさないことから、CCN2 発現における GCCase の働きは BMP-1 特異的であると考えられた (Fig. 2)。

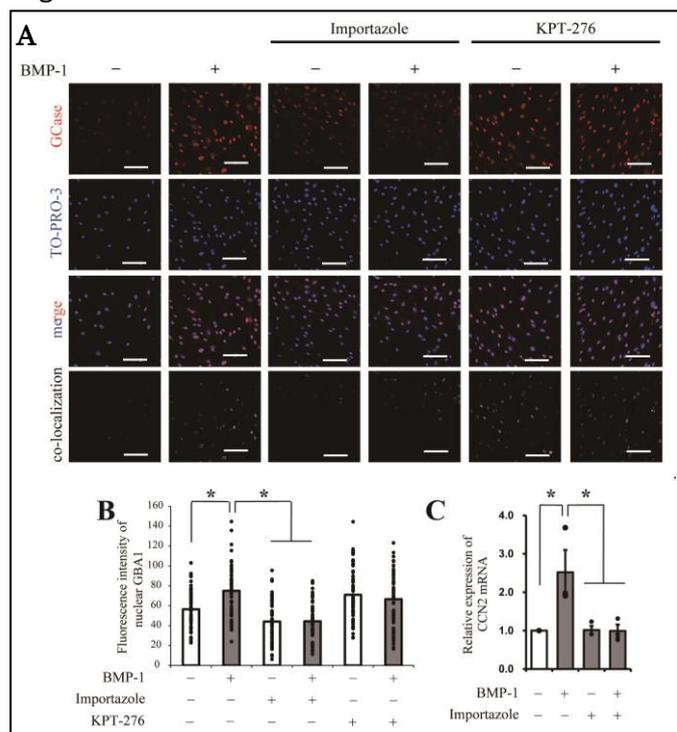
Fig. 2



##### (3) Importin-β を介した GCCase の核内輸送による BMP-1 誘導性 CCN2 発現の調節

BMP-1 による GCCase の核移行は importin-β 阻害剤である importazole にて抑制された。Exportin 1 阻害剤である KPT-276 は単独で GCCase の核移行を促進したが、BMP-1 との相乗効果は認めなかった (Fig. 3A)。核内の GCCase シグナル強度は 3 つの異なる実験ごとに無作為に選んだ部位で定量した (Fig. 3B)。BMP-1 による CCN2 mRNA 発現は importazole によって有意に抑制された (Fig. 3C)。

Fig. 3



#### (4) BMP-1-GCase 系が hDPCs の転写産物に及ぼす影響の網羅的解析

hDPCs に siGCase を導入したのちに BMP-1 にて刺激を行い total RNA を抽出して RNA-seq 解析に供したところ、Gene ontology 解析の結果から BMP-1-GCase 経路は DNA replication などに関与する複数の遺伝子の発現を制御することを明らかにした。

以上の結果から、hDPCs において BMP-1 は importin- $\beta$  による GCase の核移行を介して CCN2 の mRNA 発現を調節することが明らかとなった。BMP-1 によって核移行した GCase は核内の DAPI 不染領域、すなわち高次構造がゆるみ遺伝子発現が活性化している euchromatin に多く局在している。加えて、GCase の C 末端には NLS 様の配列が存在することから、核内において GCase が転写因子様の役割を持つ可能性が予測される。

本研究は、BMP-1 がプロテアーゼとして細胞外マトリクス合成に関与する既知の働きのみならず、GCase を介して細胞における遺伝子発現を制御する可能性を見出した点で大きな意義を有すると考えられる。BMP-1-GCase 経路が象牙質・歯髄複合体の新たな創傷治癒マーカーとなり得る可能性もあり、生体に則した新規覆髄剤の開発に資するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koichiro Muromachi, Rei Nakano, Junko Fujita-Yoshigaki, Hiroshi Sugiya, Nobuyuki Tani-Ishii	4. 巻 -
2. 論文標題 BMP-1-induced GBA1 nuclear accumulation provokes CCN2 mRNA expression via importin- $\alpha$ -mediated nucleocytoplasmic pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12079-023-00740-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 室町幸一郎, 中野令, 吉垣純子, 杉谷博士, 石井信之
2. 発表標題 BMP-1はGCCaseを介してMCM2の発現を調節しヒト歯髄培養細胞の増殖に関与する
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2023年度春季学術大会（第158回）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 室町幸一郎, 中野令, 吉垣純子, 杉谷博士, 石井信之
2. 発表標題 ヒト歯髄におけるBMP-1-GBA1経路の役割
3. 学会等名 第14回日本CCNファミリー研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 室町幸一郎, 中野令, 吉垣純子, 杉谷博士, 石井信之
2. 発表標題 BMP-1-GCaseはヒト歯髄培養細胞においてMCM2の発現を調節し細胞増殖に関与する
3. 学会等名 第13回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室町幸一郎, 中野令, 吉垣純子, 杉谷博士, 石井信之
2. 発表標題 ヒト歯髄培養細胞におけるBMP-1を起点としたGCaseによるCCN2発現調節
3. 学会等名 第12回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	石井 信之  (Tani-Ishii Nobuyuki)	神奈川歯科大学・歯学部・教授	
	(20163610)	(32703)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------