

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592726

研究課題名(和文) アメロジェニンによる新規軟骨細胞分化機序の解明

研究課題名(英文) The study of chondrocyte cell differentiation mechanism induced by amelogenin

研究代表者

畠山 雄次 (HATAKEYAMA, YUJI)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40302161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル質のタンパクであるアメロジェニンは軟骨形成を促進するが、そのメカニズムは不明である。本研究はアメロジェニンの一つであるLRAPが軟骨細胞にどのような影響があるのかを調べるために、化学的人工合成によりマウスLRAPを新たに作成した。このLRAPは軟骨細胞の細胞増殖を促進した。またLRAPが含まれるブタ由来アメロジェニンの軟骨細胞分化にLAMP-1が関わる可能性が示された。これらの結果はアメロジェニンによる軟骨再生療法の開発に役立つものである。

研究成果の概要(英文)：Amelogenin is one of proteins in enamel matrices and promotes chondrogenesis. However it has been still unknown the mechanism of chondrogenesis by amelogenin. In this study, we have newly made a chemical artificial synthesized leucin rich amelogenin peptide (LRAP), which is one of amelogenin's splicing isoforms, and this synthesized LRAP promoted the cell proliferation of mouse chondrocytes compared with control significantly. Furthermore enamel matrix derivative (EMD) derived from porcine tooth germ including LRAP promoted chondrogenesis involving LAMP-1 (Lysosome associated membrane protein-1), which has been reported the amelogenin binding protein and suggested as signaling receptor of amelogenin. These results may provide useful information to promote the development of the cartilage regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 形態系基礎歯科学

キーワード：アメロジェニン 軟骨

1. 研究開始当初の背景

(1) アメロジェニン(AMG)はエナメル芽細胞により産生されるエナメル質基質タンパクであることから、エナメル質特異的タンパクと考えられてきた。しかし我々は、AMGが軟骨および歯周組織に存在し、軟骨形成促進および歯周組織の恒常性維持にかかわることを報告した。

(2) 近年、AMGは細胞内小胞膜の膜結合型受容体 LAMP-1 に結合することが報告されている。しかし LAMP-1 がAMGによる軟骨細胞増殖および分化にどのように関わるかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) AMG、およびそのスプライシングアイソフォームによる軟骨細胞前駆細胞の増殖および分化において、LAMP-1 を介したシグナル伝達経路を解明し、これまでエナメル質特異タンパクと考えられてきたAMGの新たな機能とその作用機序を明らかにする。また本研究で得られる知見は歯周病治療に用いられているブタエナメルタンパク抽出物であるエムドゲインによる新規軟骨再生治療法の開発に貢献できる基礎的知見を提供するものである。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスの関節軟骨を含む骨より得られる RNA から LRAP の cDNA を RT-PCR にて増幅し、大腸菌用発現ベクターにサブクローニングする。

(2) 大腸菌よりリコンビナントマウス LRAP を作成する。
上記までのステップについては、研究の効率を上げるために、企業に外注することにより作成する。

(3) 大腸菌由来 LRAP を軟骨細胞前駆細胞株 ATDC5 に添加し、Sox9 および II 型コラーゲンをマーカーとして軟骨細胞分化能について検討を行う。

(4) また、生体内軟骨における LAMP-1 の免疫組織学的検討を行う。
さらにマイクロマスカルチャーによる in vitro における軟骨形成モデルにおける LAMP-1 の免疫組織学的検討を行う。

4. 研究成果

(1) 外注した企業(株式会社トランスジェニック 熊本市)と作製方法について検討した結果、さらなる研究効率化のために、マウス LRAP の C 末端に 6xHis が付加されるような塩基配列を化学合成し、合成された配列を大腸菌用タンパク質発現プラスミド pET15b にサブクローニングして、発現プラスミドを構

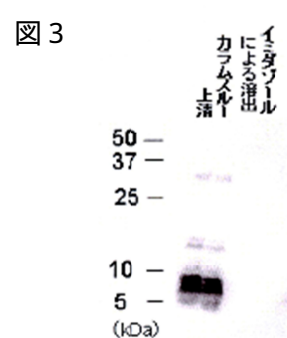
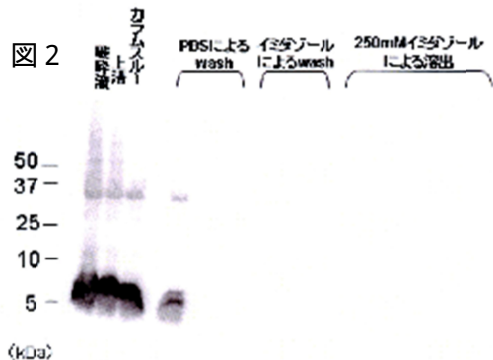
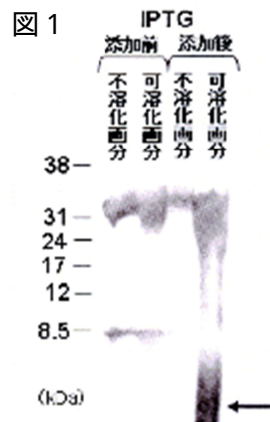
築した。この発現プラスミドを保持させた大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 株の培養液に、イソプロピルチオガラクトピラノシド (IPTG) を添加して LRAP の発現を誘導した。その結果、

IPTG 添加後の可溶化画分(上清)に LRAP に相当するタンパク質発現をウェスタンブロットにて確認した(図1)

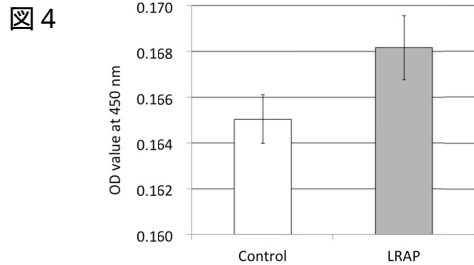
(1) 発現 LRAP を精製するために Ni カラムに供したが、Ni カラムへの特異的な吸着はみられなかった(図2)。

(2) さらに硫酸アンモニウムによる沈殿により分離を試みたが、50%飽和硫酸アンモニウムによる画分に目的の LRAP は存在するが、Ni カラムへの吸着がみられなかった(図3)。

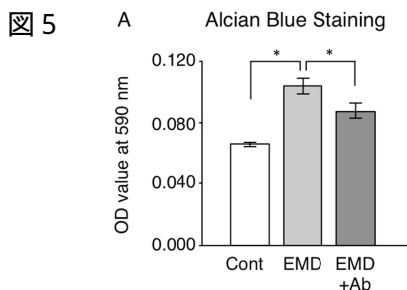
(3) そこで、大腸菌発現による LRAP 作成から、F-moc 法による合成マウス LRAP 作成を企業(株式会社 BEX、東京都板橋区)に外注した。その結果、純度 98%以上、収量 10mg 以上の合成に成功した。



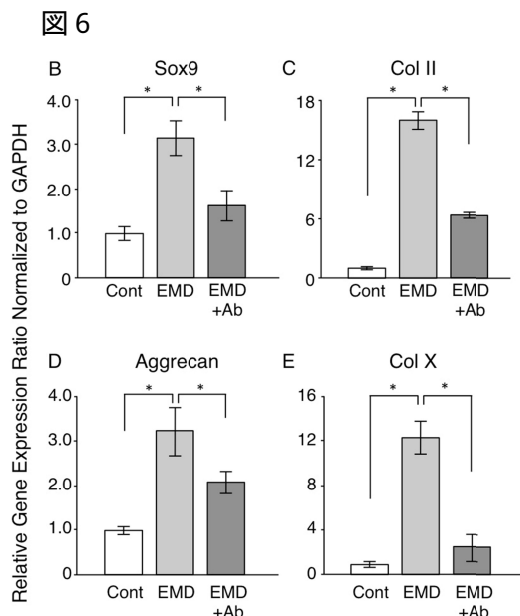
(4) 作成した合成マウス LRAP を最終濃度 10ug/ml にて ATDC5 細胞培地に添加し、24 時間培養した結果、コントロールと比較して有意に軟骨細胞前駆細胞の増殖を促進した (図 4)



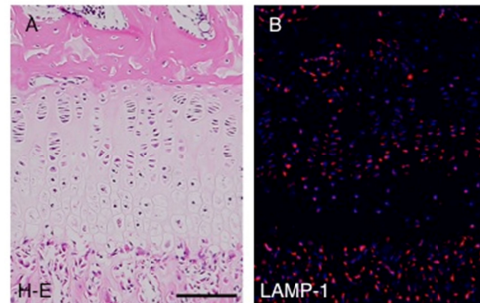
(5) エナメルマトリックスデリバティブ (EMD) はブタの歯胚から抽出されたエナメルタンパクで、アメロジェニンを主成分としている。これを用いて、軟骨細胞の分化に LAMP-1 がどのように関与するか検討した。まず、軟骨基質産生能として EMD 単体、および EMD と LAMP-1 中和抗体を添加して 2 週間培養後、アルシアンブルー染色した結果、EMD 単体ではアルシアンブルーに強く染まったが、EMD と LAMP-1 中和抗体を添加するとアルシアンブルー染色の染色強度が抑制された (図 5)



(6) さらに軟骨細胞分化マーカーである、Sox9、II 型コラーゲン、X 型コラーゲンおよびアグリカンの遺伝子発現は LAMP-1 中和抗体が存在すると抑制された (図 6)



(7) 生体内軟骨における LAMP-1 の発現を検討するために生後 4 週齢マウス膝関節を用いて抗 LAMP-1 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、増殖層軟骨における軟骨細胞に陽性反応が認められた。(図 7)



以上、本研究の成果として、化学的人工合成の LRAP を作成し、軟骨細胞前駆細胞の増殖を促進する可能性を示唆した。また、LRAP を含むアメロジェニンデリバティブの軟骨細胞前駆細胞の軟骨分化マーカー遺伝子の上昇には LAMP-1 が関与する可能性を示唆した。さらに、生体内軟骨において増殖層軟骨細胞に LAMP-1 陽性反応が認められた。これらのことはアメロジェニンスプライシングアイソフォームの一つである LRAP の軟骨再生应用到に有用な一知見を提供するものである。今後、LRAP による間葉細胞から軟骨細胞前駆細胞への運命決定、または軟骨細胞に類似の性質をもつ骨芽細胞の細胞動態全般に与える影響を検討していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- Hatakeyama Y, Maruya Y, Hatakeyama J, Oka K, Tsuruga E, Inai T, Sawa Y. The Distinct Roles of Growth /Differentiation Factor-5 in Cell Proliferation and Odontoblast Differentiation from Dental Pulp Cells. *The Internet Journal of Dental Science* 2012 10(2) (電子ジャーナル) 査読あり <http://ispub.com/IJDS/10/2/14018>
- Hatakeyama Y, Maruya Y, Hatakeyama J, Oka K, Tsuruga E, Inai T, Sawa Y. Immunohistochemical Study of Lysosome -Associated Membrane Proteins During Periodontal Ligament Development. *Journal of Hard Tissue Biology* 2013 22(2), 233-240 査読あり
- Hatakeyama Y, Hatakeyama J, Oka K, Tsuruga E, Inai T, Anan H, Sawa Y. Immunohistochemical study of Amelogein and Lysosome-associate membrane proteins (LAMPs) in cartilage. *International Journal of Morphology*

2014 32(2) 掲載予定 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

畠山雄次、畠山純子、岡暁子、敦賀英知、
稲井哲一郎、沢禎彦 アメロジェニン遺
伝子機能喪失マウスの歯根形成完了期
におけるセメント質吸収に関する組織
学的検討 第 53 回歯科基礎医学会
2011 年 10 月 1 日、2 日 岐阜市

畠山雄次、畠山純子、岡暁子、敦賀英知、
稲井哲一郎、沢禎彦 マウス歯周組織形
成過程における LAMP-1 の免疫組織学的
検討 第 67 回日本解剖学会九州支部学
術集会 2011 年 10 月 22 日 宮崎市

畠山雄次、畠山純子、岡暁子、敦賀英知、
稲井哲一郎、沢禎彦 成長板軟骨におけ
るアメロジェニンおよび LAMP-1 の免疫
組織学的研究 第 44 回日本結合組織学
会 2012 年 6 月 7 日、8 日 東京都新宿
区

畠山雄次、畠山純子、岡暁子、敦賀英知、
稲井哲一郎、沢禎彦 歯根膜形成におけ
る Lysosome-associated membrane
protein-1 (LAMP-1) の免疫組織化学的局
在について 第 54 回歯科基礎医学会学
術大会 2012 年 9 月 14 日、15 日、16
日 郡山市

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 雄次 (HATAKEYAMA YUJI)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号：40302161

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし