

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792408

研究課題名（和文） アメロジェニンスプライスアイソフォームの間葉系細胞分化に与える影響に関する研究

研究課題名（英文） The study of effects of amelogenin splice isoforms on the differentiation of mesenchymal cells

研究代表者

八幡 薫子 (YAHATA KAORUKO)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：50585312

研究成果の概要（和文）：本研究では、2つのアメロジェニンアイソフォーム、M180とLRAPが、軟骨細胞株（ATDC5）における軟骨分化に対してどのような影響をもたらすか、比較検討した。その結果、2つのアメロジェニンアイソフォーム M180、LRAPは、軟骨細胞株 ATDC5細胞のALP活性の上昇と、軟骨基質の分泌を促進させ、軟骨細胞の分化を促進させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined the effects of M180 and LRAP on a chondrogenic cell line, ATDC5, to investigate the role of amelogenins in chondrogenesis. The addition of amelogenins increased alkaline phosphatase activity and glycosaminoglycan secretion at 14 and 21 days of culture, respectively, as compared with the control. Quantitative PCR (Q-PCR) analysis revealed that LRAP increased the gene expression levels of Runx2, Col2a1 and Aggrecan at 7 days of differentiation. Moreover, both M180 and LRAP significantly increased the gene expression levels of ALP, Aggrecan, Col10a1 and osteopontin at 28 days of culture. Bromodeoxyuridine assay and Q-PCR analysis for Wnt signalling indicated that both M180 and LRAP reduced proliferation, but induced the cell differentiation possibly through altered non-canonical Wnt signalling.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|------------|----------|------------|
| 交付決定額 | 3,300,000円 | 990,000円 | 4,290,000円 |

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

1. 研究開始当初の背景

アメロジェニンは、エナメル質に存在するタンパク質のうち90%以上を占める細胞外基質タンパクであり(Terminet *et al.*,1980)、今日までに少なくとも15以上のヒトエナメル質形成不全症に関連した変異がアメロジェニン遺伝子上に同定されていることから(Kida *et al.*,2007;Wright,2006)、エナメル質形成に重要な役割を持つとされている。アメロジェニンのmRNAはその大部分がExon1-7から転写され、マウスでは10以上の異なる

mRNA スプライスアイソフォームがタンパクに翻訳されていることが確認されている(Simmer *et al.*,1994;Veis,2003;Yuan *et al.*,2001)。これらのアメロジェニンは非常に疎水性が高く、*in vitro*において微小な球状構造(nano-sphere)を形成するとされているが、この構造が特にエナメル小柱形成時の hidroキシアパタイト結晶の伸張や形、あるいは幅の制御において重要な役割を持つと考えられている(Du *et al.*,2005)。実際、アメロジェニンノックアウト(KO)マウスのエナメル質

は厚みが極めて薄く、ヒトエナメル質形成不全症の表現型にきわめて近いことが分かっている(Gibson *et al.*,2001)。

アメロジェニン¹はエナメル芽細胞に特異的に発現するタンパク質と考えられていたが、近年の研究より、ヘルトヴィッヒの上皮鞘(マラッセの上皮遺残)、象牙芽細胞、骨、軟骨、歯周組織、間葉系細胞、あるいは造血幹細胞など、幅広い組織での発現が確認されつつある(Deutsch *et al.*,2006;Haze *et al.*,2007)。なかでも、マウスの歯根膜表面から分離されたセメント芽細胞/歯根膜細胞(CM/PDL cells)は、アメロジェニンの主要なアイソフォームの、M180とLRAPに翻訳される2つのmRNAを発現していることが明らかになった(Hatakeyama *et al.*,2006)。また、アメロジェニンKOマウスの表現型解析から、KOマウスは野生型マウスと比較して歯根吸収が促進していること、KOマウスのCM/PDL cellsのRANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)の発現レベルが上昇していることがわかっている(Hatakeyama *et al.*,2003)。さらに、M180またはLRAPのリコンビナントタンパクを、それぞれ頭蓋冠由来骨芽細胞あるいはCM/PDL cellsの培養系に加えた実験では、M180とLRAPがRANKL発現を抑制し、結果的に破骨細胞形成支持能を抑制する効果があることが報告されている(Hatakeyama *et al.*,2006;Nishiguchi *et al.*,2007)。さらに、実験的な歯の再植前にラット歯根表面に対してアメロジェニン(ブタ全長アメロジェニン:M180ホモログ)を塗布した実験では、再植後に発生する歯根吸収が抑制されたという報告がある(Yagi *et al.*,2009)。これらの結果は、M180とLRAPが間葉系細胞への作用を通じて、破骨細胞形成を抑制する作用を持つということを示唆している。

以上のことから、これらM180とLRAPの異なるアメロジェニンアイソフォームは、歯周、骨、その他の組織の間葉系細胞において、本来の細胞外基質としての役割ではなく、むしろRANKLの発現を抑制する細胞間のシグナル伝達物質としての役割を担っていると考えられるが、M180とLRAPの機能の違いについては未解明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、異なる分化段階を持つ代表的な間葉系細胞株に対するアメロジェニンアイソフォーム(特にM180、LRAP)の影響を解析することで、シグナル伝達物質としてのアメロジェニンの働きをより明確にし、さらにM180とLRAPの機能の違いについて検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス M180/LRAP タンパク発現ベクター

生後5日齢C57B6系マウス下顎第一臼歯よりtotal RNAを抽出した後に(RNA isolation kit, Stratagene)、1 μ gのtotal RNAを逆転写酵素(SuperScriptII, Invitrogen)によるcDNA合成に用いた。アメロジェニンcDNAは5'-CGGGATCCGCCGCCACCATGGGGACCTGGATTTTG-3'、5'-CCGCTCGAGCATCCACTTCTCCCGCTT-3'の遺伝子特異的プライマーと、Pfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen)を用いて、cDNAからpolymerase chain reaction(PCR)法にて増幅した後、Taq DNAポリメラーゼ(Invitrogen)を添加し72°Cで5分間インキュベートしアデニンを付加した。アガロースゲルに電気泳動した後、M180とLRAPのサイズを持つDNAバンドをベクター(pEFV5-His TOPO, Invitrogen)にクローニングした。サイクルシーケンスによりそれぞれのcDNA配列を確認したのちに、制限酵素(BamHI-XhoI)を用いて切り出し、タンパク発現ベクター(pcDNA3.1 Myc/His, Invitrogen)にクローニングした。

(2) M180、LRAP タンパクの生産、濃縮

得られたM180、LRAPタンパク発現ベクターおよびMockベクター(コントロール)を、FreeStyle MAX 293 Expression System(Invitrogen)のプロトコルに従ってFreeStyle 293-F細胞にトランスフェクションした。293-F細胞の培養には、FreeStyle 293 Expression Medium(Invitrogen)を用い、300mlフラスコに培地60ml、もしくは100mlフラスコに培地30mlで37°C、8%CO₂環境下135rpmにて10日間振盪培養した。培養後、Western Blotting法により培地中への組換えタンパク質の分泌の有無を確認した。培地の一部をLDSサンプルバッファー(Invitrogen)と混合し70°Cにて10分間加熱したのち、4-12%NuPAGE Novex Bis-Triゲル(Invitrogen)により分画後、ニトロセルロース膜に転写した。ウサギ抗アメロジェニン抗体(ペンシルバニア大学、C. Gibson博士より供与)およびマウス抗c-Myc抗体(BD biosciences)を1次抗体として、HRP標識2次抗体および発光基質はSuperSignal West Femto kit(Thermo Fisher Scientific)を用い、冷却CCDカメラ(Alpha Imager, Alpha Innotech)にてアメロジェニン蛋白を検出した。その後、M180含有培地、LRAP含有培地、コントロール培地は限外濾過膜(3,000 MWCO, Vivaspin20, Sartorius)を用いて8000g、4°Cにて5-8時間遠心し、15倍に濃縮した状態で使用時まで-20°Cにて保存した。

(3) 細胞培養

本研究では、骨芽細胞系細胞株MC3T3-E1と、軟骨細胞系細胞株ATDC5(RIKEN Cell Bank)

を用いた。MC3T3-E1 は 10% 牛胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) 含有 α -MEM 培地 (Invitrogen)、ATDC5 は 5%FBS 含有 DMEM/F12 培地 (Invitrogen) を用いて、37°C で 5%CO₂ 環境下にてサブコンフルエントで培養・維持した。なお、実験に用いたのは継代数が 2-4 回までの細胞であった。

-MC3T3-E1

24 穴マルチウェルプレートに 2.5×10⁴/well で細胞を播種した翌日に、10%FBS、50 μ g/ml ascorbic acid、10mM β -glycerophosphate 含有 α -MEM 培地に対して、M180 含有濃縮培地、LRAP 含有濃縮培地、もしくはコントロール濃縮培地が、それぞれ 1:1 (Low Conc.群)、1:10 (High Conc.群) となる割合の濃度で加えた培地を用い、分化誘導を開始した。分化誘導開始後 10、20 日でアルカリフォスファターゼ染色、もしくはアリザリンレッド染色を行い、20 日目に total RNA を抽出 (RNeasy Mini Kit, Invitrogen) した。

-ATDC5

24 穴マルチウェルプレートに 2.5×10⁴/well で細胞を播種した翌日に、5%FBS、5 μ g/ml インシュリン・5 μ g/ml トランスフェリン・5 ng/ml 亜セレン酸 (ITS, Becton, Dickinson and Company) 含有 DMEM/F12 培地に対して、M180 含有 15 倍濃縮培地、LRAP 含有 15 倍濃縮培地、もしくはコントロール 15 倍濃縮培地が、それぞれ 1:1、1:10 となる割合の濃度で加えた培地を用い、分化誘導を開始した。誘導開始後、14、28 日で ALP 染色、Alcian blue 染色、total RNA 抽出を行った。

(4) アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色
細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (和光純薬) にて 10 分間固定し、再度 PBS にて洗浄した後、Fast Blue BB salt (Fluka)、Naphthol AS-MX phosphate (SIGMA) 含有 5% N,N-dimethylformamide Tris 緩衝液 (pH9.2) を加え、37°C にて 30 分間インキュベートして染色した。染色したプレートは、蒸留水 (DW) で洗浄後、EPSON Scan ES-2000 (SEIKO EPSON Corp.) を用いてスキャンした。

(5) アリザリンレッド (Alizarin red) 染色
細胞を PBS で洗浄後、60%Isopropanol で 1 分間固定し、DW にて 3 分間室温放置して脱水をもどした後、1%Alizarin Red S (Sigma) にて染色した。染色したプレートは、DW で洗浄後、EPSON Scan ES-2000 (SEIKO EPSON Corp., Nagano, Japan) を用いてスキャンした。また、染色後のプレートに 5% SDS 含有 0.5NHCL を加え、室温にて 30 分間色素を溶出し (Kostenuik et al., 1997)、405nm における吸光度を分光吸光度計 (MULTISKAN JX, Thermo ELECTRON) にて測定した。

(6) アルシアンブルー (Alcian blue) 染色
細胞を PBS で洗浄後、3%酢酸にて 3 分間固

定し、Alcian Blue 液 (和光純薬) にて 30 分間染色した。染色したプレートは、DW で洗浄後、EPSON Scan ES-2000 を用いてスキャンした。また、染色後のプレートに 4M guanidine HCL を加え、4°C、16 時間インキュベートして色素を溶出し、630nm における吸光度を分光吸光度計 (MULTISKAN JX, Thermo ELECTRON) にて測定した。

(7) Real time PCR

RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて各細胞から total RNA の抽出を行った後、逆転写酵素 (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen) を用いて cDNA を合成した。これを鋳型とし、QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) および Rotor-Gene 6000 サーマルサイクラー (Corbett Life Science) を用いて、Real time PCR 法による遺伝子発現量の解析を行った。MC3T3-E1 細胞については、Cbfa1 (Runx2)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、骨シアロプロテイン (BSP)、オステオポンチン (OPN)、ATDC5 細胞については Runx2、ALP、OPN、Sox9、II 型コラーゲン (Col2a1)、X 型コラーゲン (Col10a1)、Aggrecan 遺伝子の発現量を、検量線を用いた相対定量にて比較した。全てのサンプルの発現量はハウスキーピング遺伝子 (HPRT) によって補正した。Real time PCR は QuantiFast SYBR Green PCR Kit 推奨のプロトコルに従った。PCR に用いたプライマー配列のうち、Cbfa1 (Runx2)、ALP、BSP、OPN の配列は Primer Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) より得た。また、Sox9、Col2a1、Col10a1、Aggrecan の配列は MacVector (MacVector, Inc.) によってデザインした。

(8) 統計

定量的データは、1 元配置分散分析 (1-way ANOVA) もしくは 2 元配置分散分析 (2-way ANOVA) をおこなった後、コントロール群との比較を Bonferroni の多重比較検定にておこなった。グラフは平均値 \pm SD 値を表す。また P<0.05 を統計学的に有意と判定した。

4. 研究成果

(1) M180 と LRAP タンパクの発現と活性の確認

293-F 細胞に発現ベクターをトランスフェクションした結果、培地中に M180 と LRAP が存在することを、抗アメロジュニン抗体を用いた Western Blotting 法にて確認した。ただし、予測されたサイズ (それぞれ約 24.5kD および 10.9 kD) よりも僅かに大きな分子量をもつバンドがそれぞれのサンプルにおいて確認された。Mock ベクターを用いた培地からは全くバンドが検出されなかった。同様の結果は、抗 c-Myc 抗体を用いても観察されたことから、目的の M180 および LRAP は、c-Myc との融合タンパクとして培地中に分泌され

ていることがわかった。

つぎに、M180 と LRAP タンパクの活性の確認を行うため、骨芽細胞への分化培地に対して M180、LRAP 含有濃縮培地、もしくはコントロール培地が等量 (1:1) 含まれるよう調整した培地 (Low conc.群) と、10 倍 (1:10) 含まれるように調整した培地(High conc.群)を用い、MC3T3-E1 細胞への M180 と LRAP の効果を調べた。その結果、High conc.群においてコントロール培地で骨芽細胞への著しい分化抑制がみられたが、Low conc.群ではコントロール培地による分化抑制がみられなかった。よって、High conc.群において M180、LRAP の効果を判断することができないため、MC3T3-E1 細胞においては Low conc.群のみを用いて以後の評価を行うこととした。Low conc.群では、培養 10 日目において M180 添加群、LRAP 添加群ともコントロール群と比較して ALP 活性が上昇していた (図 1B, ALP)。また、培養 20 日目において AR 染色を行ったところ、M180 添加群、LRAP 添加群ともコントロール群と比較して細胞の石灰化が亢進していた。これらを定量的に解析するため、石灰化度を分光吸光度計にて測定したところ、コントロール群と比較して有意に M180 添加群および LRAP 添加群で石灰化度が上昇していることが確認された。

(2) MC3T3-E1 細胞において、M180 と LRAP は骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を上昇させる

さらに、アメロジェニンの活性を確認するため骨芽細胞分化に関連するとされる代表的なマーカーである Runx2、ALP、BSP、OPN の遺伝子発現変化を、MC3T3-E1 細胞の分化誘導後 20 日目のサンプルを用いて Real time-PCR にて確認した。Runx2 はコントロール群と比較して、M180 と LRAP 群において有意に発現が上昇していた。一方、ALP の発現は各群間で有意な差がみられなかった。BSP は、コントロール群と比較して、M180 添加群において有意に発現が上昇していたが、LRAP 添加群では有意な変化がみられなかった。OPN の発現は、コントロール群と比較して、M180 と LRAP 群において有意に発現が上昇していた。

(3) M180 と LRAP は ATDC5 細胞の ALP 活性、軟骨基質分泌を促進する

次に、軟骨細胞分化培地に対して M180、LRAP 含有濃縮培地、もしくはコントロール培地が等量 (1:1) 含まれるよう調整した培地 (Low conc.群) と、10 倍 (1:10) 含まれるように調整した培地(High conc.群)を用い、ATDC5 細胞への M180 と LRAP の効果を調べた。その結果、MC3T3-E1 細胞とは異なり、コントロール培地において Low conc.群、High

conc.群ともに、分化を抑制することはなかった。また、コントロール培地の濃度による軟骨細胞への分化の違いも特にみられなかった。分化開始後 14 日目に ALP 活性を比較したところ、Low conc. 群では明らかな違いは認められなかったものの、High conc.群の M180 および LRAP 添加群において ALP の上昇が観察された。また、分化開始後 28 日目に、細胞からの軟骨基質分泌を調べるためアルシアンブルー染色を行った結果、ALP と同様に Low Conc.群では明らかな違いは認められなかったものの、High Conc.群の M180 および LRAP 添加群ではコントロール群と比較してアルシアンブルーに対する染色性の上昇が観察された。High conc.群において、分化誘導 14 日目のアルシアンブルー染色性を定量したところ、コントロール群と比較して有意に LRAP 添加群の染色性が高かった。

(4) ATDC5 細胞において、M180 と LRAP は軟骨細胞分化マーカーの遺伝子発現を上昇させる

次に、軟骨細胞分化に関連するとされる代表的なマーカーである Runx2、ALP、Sox9、Col2a1、Col10a1、Aggrecan、OPN の遺伝子発現変化を、ATDC5 細胞の分化誘導 14 日後、28 日後の High Conc.群サンプルを用いて Real time-PCR にて調べた。

ALP、Runx2、Sox9、Col2a1 の発現は全体として 14 日後よりも 28 日後の方が低下する傾向が見られたが、Col10a1、Aggrecan、OPN の発現は、全体として 14 日後よりも 28 日後の方が上昇する傾向が見られた (2-way ANOVA, #; P<0.05)。ALP は、14 日後においては M180 添加群、28 日後においては M180 および LRAP 添加群で、コントロールと比較して有意に発現が高かった。Runx2 では、14 日後において各群間で発現量に有意差は認められず、28 日後の M180 添加群ではコントロールと比較して有意に低く、LRAP 添加群では変化がみられなかった。Sox9 は、14 日後ではコントロールと比較して M180 添加群において発現が有意に高く、28 日においては反対に M180 添加群において発現が有意に低く LRAP 添加群において発現が有意に高かった。Col2a1 の発現は、14 日後において各群間で発現量に有意差は認められず、28 日後では LRAP 添加群において Col2a1 の発現が有意に高かった。Col10a1 の発現は、14 日後においてコントロールと比較して LRAP 添加群において有意に発現量が高く、28 日後においては、M180 添加群・LRAP 添加群ともに有意な発現上昇がみられた。Aggrecan の発現は、14 日後において M180 添加群で高い値を示し、28 日後では M180 および LRAP 添加群共にコントロール群と比較して発現が有意に高かった。OPN の発現は、Aggrecan と同様の発現レベル

の変化様相を示し、14日後においてM180添加群で高い値を示し、28日後ではM180およびLRAP添加群共にコントロール群と比較して発現が有意に高かった。

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1件)

Mitani K, Haruyama N, Hatakeyama J, Igarashi K. Amelogenin splice isoforms stimulate chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. Oral Diseases 2013;19(2):169-179.

DOI: 10.1111/j.1601-0825.2012.01967.x., 査読有

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

八幡 薫子 (YAHATA KAORUKO)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号: 50585312

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号: