

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792421

研究課題名(和文) RNAサイレンシングによるGPCRクラスB発現調節と骨再生への新戦略

研究課題名(英文) New strategy for bone regeneration based on RNA silencing of GPCR-B

研究代表者

渡 一平 (WATARI, IPPEI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10431941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：セクレチン型のGPCRクラスB (GPCR-classB: GPCR-B)を介した新規骨再生治療法開発を目的に、骨芽細胞に発現するGPCR-Bの検索を行った。In vitroにおける骨芽細胞培養系のモデルとしてMC3T3-E1を使用しGPCR-Bの中でもインクレチン受容体として知られるGIPR, GLP-1Rについて検討を行ったところ、その発現が認められ、またqPCRによる定量評価を行ったところBMP-2添加によってその発現が増強することが確認された。現在、骨芽細胞におけるインクレチン受容体を介した骨代謝制御メカニズムを検討中である

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to explore the possible implementation of GPCR-B signaling in a new treatment method for bone diseases using an in vitro approach. Incretin receptors, GLP-1 receptor (GLP-1R) and GIP receptor (GIPR), belong to GPCR-B family and are suggested to play an important role in bone metabolism. The osteoblastic cell line, MC3T3-E1 was found to express both GIPR and GLP-1R. The quantitative PCR analysis showed that expression of both receptors was upregulated after stimulation with BMP-2. Determination of molecular mechanisms involved in regulation of bone metabolism by incretin receptors-related signaling will help to developed effective strategy for bone regeneration.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：小児・矯正

キーワード：GPCR class B GLP-1 GIP 骨再生 RNAサイレンシング 唾液腺遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

先天異常、外傷、歯周病、腫瘍摘出時の顎骨切除などにより欠損した歯槽骨の再生については、様々な方法が試みられているが、現在までの手法としては、骨形成促進因子を外来性に投与あるいは発現させ、骨形成を促すものがほとんどである。しかしこの場合、外来物の投与による副作用や強制発現させた因子による持続的な影響が無視できないことが多く、臨床応用に際して大きな壁となることが多い。そこでこれらの難題を解決するため、応募者は最新の RNA 工学を応用して、内因性の骨形成抑制因子を特異的に阻害し、限られた一定の時間に効率的かつ副作用なく歯槽骨を再生する方法を探ることを目的として研究計画を立案した。

内因性の骨形成抑制因子の候補として、G タンパク質共役型受容体クラス B (G-protein coupled receptor class B: GPCR-B)に着目する。GPCR-B はセクレチンに代表される GPCR のファミリーで、その中には、副甲状腺ホルモン(PTH)、カルシトニン受容体などのカルシウム代謝に関する受容体や、グルカゴン、GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide)、GLP-1 (glucagon-like peptide-1)受容体など糖代謝に関する受容体、CRFR (corticotropin releasing factor receptor)、GHRHR (growth hormone releasing hormone receptor)や、VIPR (vasoactive intestinal peptide)など各種ホルモンや神経ペプチド等、様々な生理機能を持つアゴニストに対する受容体が存在し、薬剤標的受容体としての重要性から多数の GPCR-B 関連薬が市販されている。骨芽細胞上にも各種 GPCR-B の発現が確認されており、海外では、骨疾患治療薬として PTH やカルシトニン受容体のアゴニストが臨床応用されているが、副作用や投与期間の制限など解決すべき問題はまだまだ多く存在している。一方、国内では未承認薬である PTH の基礎/臨床研究をはじめ、新たな骨疾患治療法の開発が期待されている。このような背景のもと応募者は、高い標的特異性と効果持続時間の限定が副作用のない新規骨疾患治療薬の開発につながると考え、骨形成に対して抑制的に働く GPCR-B を特定し、骨芽細胞上での GPCR-B 発現を転写・翻訳レベルで調節することが、歯槽骨再生の新規治療戦略として最適であると考えた。以上が本研究の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

7 回膜貫通型受容体である G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR)には 4 つのファミリーが存在するが、セクレチン型の GPCR クラス B (GPCR-classB: GPCR-B)には骨代謝制御に関わる受容体が数多く存在することが知られている。現在、骨疾患治療薬の標的受容体として最も研究が展開されている GPCR-B

を介した安全で効果の高い新規骨再生治療法の開発を研究の全体構想として掲げ、『骨芽細胞に存在する GPCR-B の発現調節機構を解明し、骨形成に対して抑制的に作用する GPCR-B 遺伝子をターゲットに最新の RNA 操作技術を用いて GPCR-B 遺伝子をノックダウンすることで、部位特異的に効率的、かつ副作用なく歯槽骨再生を目指す』ことを本研究の具体的な目標として遂行を行った。また、新規骨再生治療法の開発を目指し、これまでに骨芽細胞上への発現が確認されていない GPCR class B に注目することとし、さらに今後の臨床応用を踏まえて実験動物を用いた in vivo の実験系を確立することを目標として行った。

3. 研究の方法

(1)骨芽細胞に存在する新規 GPCR-B の探索

内因性骨代謝関連受容体として、骨芽細胞上に発現が認められる新規 GPCR-B の探索を行う。具体的にはセクレチンに代表される GPCR-B に関して NCBI および BLAST サイトを参考に mRNA の発現を PCR により確認を行い、さまざまな刺激に対する発現量の変化を qPCR、ウエスタンブロッティング、蛍光染色により検討を行う。

(2)GPCR-B が骨芽細胞に与える影響の検討

骨芽細胞の GPCR-B 発現に対する RNAi

各 GPCR-B 遺伝子に対する合成 siRNA を作製し、骨芽細胞(MC3T3-E1, KUSA)に導入する。細胞質内の RNAi に関しては、リポフェクション法を用いる。

骨芽細胞の GPCR-B サイレンシングの確認

siRNA 導入後、GPCR-B に対するノックダウン効果を判定するため、qPCR 法およびウエスタンブロッティング法を用いてサイレンシングの評価を行う。

骨芽細胞の機能解析

RNAi 効果が確認された骨芽細胞において、siRNA 投与前後のアルカリフォスファターゼ、1 型コラーゲン、core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) の発現を qPCR を用いて検討する。

GPCR-B 遺伝子のダブルノックダウン効果の判定

GPCR-B 遺伝子に対し 2 種類の siRNA を組み合わせ骨芽細胞に投与し、それぞれの受容体発現に対するサイレンシング効果および骨形成能の評価を qPCR を用いて検討する。

(3)唾液腺における新規 GPCR-B 発現の有無

将来的な臨床応用(唾液腺遺伝子治療)を見据えて候補に挙げた新規 GPCR-B とそのアゴニストに関して、唾液腺での発現と各種刺激に対する発現量の違いについて生化学的に検討を行った。

4. 研究成果

(1) MC3T3-E1 細胞上のインクレチン受容体発現とグルコース濃度による影響

骨芽細胞 (MC3T3-E1) において GIPR, GLP-1R の両インクレチン受容体の発現が確認された。その発現量は BMP-2 添加培地においてグルコース濃度の上昇とともに増加した。GLP-1R の細胞内局在は BMP-2 やグルコース濃度の影響を受けなかった。現在は骨芽細胞におけるインクレチン受容体の機能の詳細について検討中である。

(2) RNA サイレンシングによる骨芽細胞上インクレチン受容体発現の変化

骨代謝への関連が示唆されるインクレチン受容体 (GIPR, GLP-1R) の骨芽細胞での発現は BMP-2 およびグルコース濃度により影響を受けることが確認された。現在は siRNA やアンチセンスオリゴ等を用いた RNA サイレンシングによるインクレチン受容体発現量の変化と骨形成関連遺伝子の発現変化について詳細に検討中である。

(3) 唾液腺におけるインクレチンおよびインクレチン受容体発現の有無

骨代謝への関連が示唆されるインクレチン受容体とそのアゴニストに関して、将来的な臨床応用標的臓器として最も有望と考えられる唾液腺 (顎下腺、舌下腺、耳下腺) での発現を PCR および免疫染色にて確認したところ、ラット唾液腺 (顎下腺、舌下腺、耳下腺) での GIP および GIPR 発現が認められ、また成長に伴い発現量が変化することも確認された。現在 GLP-1R やその他 GPCR-B についても詳細な検討を行っている。

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 6 件) 査読有り

1. Ippei Watari, Jutiporn Privatananupunt, Hsu Jui-Chin, Katarzyna Anna Podyma-Inoue, Takashi Ono. The influence of gestational diabetes in craniofacial growth of newborn. J Soc Wom Health Sci Res. 3(1):57-62, 2014

2. Hsu JC, Watari I, Ono R, Privatananupunt J, Mizumachi-Kubono M, Honda K, Ishida Y, Ono T. Degeneration of fungiform and circumvallate papillae following molar extraction in rats. Acta Odontol Scand. In press 2014

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hsu+HC+Watari+Ippei+2014>

3. Emina Aoyama, Ippei Watari, Katarzyna Anna Podyma-Inoue, Masaki Yanagishita, Takashi Ono. Expression of glucagon-like peptide-1 receptor and glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor is regulated by the glucose concentration in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. Int J

Mol Med. in press 2014

DOI: 10.3892/ijmm.2014.1787.

4. Jutiporn Privatananupunt, Ippei Watari, Katarzyna Anna Podyma-Inoue, Mariko Kubono, Takashi Ono. Expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its receptor in the rat major salivary glands. Acta Histochem. 116(4): 545-50, 2014

DOI: 10.1016/j.acthis.2013.11.007.

5. Mariko Mizumachi-Kubono, Ippei Watari, Yuji Ishida, Takashi Ono. Unilateral maxillary molar extraction influences AQP5 expression and distribution in the rat submandibular salivary gland. Arch Oral Biol. 57:877-83, 2012

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.02.006.

6. Kure-Hattori I, Watari I, Ishida Y, Yonemitsu I, Ono T. Effect of functional shift of the mandible on lubrication of the temporomandibular joint. Arch Oral Biol. 57:987-94, 2012

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.01.006.

[学会発表](計 8 件)

1. 渡 一平、妊娠中の耐糖能低下が母体の口腔内および新生児の頭蓋顔面成長発育に及ぼす影響について 第4回女性健康科学研究会, 大阪, 2013年5月25日

2. Hsu JC., Watari I, Honda K., Mizumachi-Kubono M., Kure-Hattori I., Ishida Y., Ono T. Unilateral nasal obstruction affects the distribution of fungiform papillae in the rat tongue. 第72回日本矯正歯科学会大会, 松本, 2013年10月7-9日, 優秀発表賞受賞

3. Jutiporn Privatananupunt, Ippei Watari, Podyma-Inoue KA, Mariko Kubono, and Takashi Ono. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression in the rat major salivary gland. The 2nd Meeting of the International Association of Dental Research-Asia Pacific Region (IADR-APR), Bang Kong, Aug 21st-23rd 2013

4. 青山 絵美奈、渡 一平、井上 カタジナ アンナ、柳下 正樹、小野 卓史、MC3T3-E1 細胞におけるグルコース濃度依存性のインクレチン受容体の発現変化 第55回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013年9月21日

5. Hsu JC., Watari I, Honda K., Mizumachi-Kubono M., Kure-Hattori I., Ishida Y., Ono T. Molar extraction influences the distribution of fungiform papillae in the rat tongue. 第71回日本矯正歯科学会大会, 盛岡, 2012年9月26-28日, 優秀発表賞受賞

6. 小野 理恵子、渡 一平、窪野 真理子、石田 雄之、服部 育子、本田 康二、小野 卓史、唾液腺における GLP-1R 受容体の発現は咬合状態に影響される 第71回日本矯正歯科学会大会, 盛岡, 2012年9月26-28日, 優秀発表賞受賞

7. 渡 一平、井上 カタジナ アンナ、服部 育子、窪野 真理子、パイワッタナヌパン ジュティポーン、 妊娠中の耐糖能低下が母体の口腔内および新生児の頭蓋顎顔面成長発育に及ぼす影響について 第3回口ト製薬女性健康科学研究会, 東京, 2012年5月18日. 研究助成賞受賞

8. Abbassy MA., Watari I., Ono T. Diabetes Mellitus: Considerations during orthodontic treatment. 3rd International Conference of Faculty of Dentistry at King Abdulaziz University, Saudi Arabia, March 12nd-15th, 2012.

〔図書〕(計1件)

Type I Diabetes
edited by Alan P. Escher and Alice Li, ISBN 978-953-51-1017-0, InTech, February 2, 2013

〔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.tmd.ac.jp/dent/ort1/ort1-J.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡 一平 (WATARI, Ippei)

東京医科歯科大学 医歯(薬)学総合研究科 助教 研究者番号: 10431941