

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792451

研究課題名(和文) ヒト副甲状腺ホルモン受容体の機能異常による骨・軟骨異常

研究課題名(英文) Abnormality of bone and cartilage by functional disorder of receptor mechanism in human 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Jansen型変異PTH/PTHrP受容体(以下Jansen型PTH-R)の機能異常、特に骨・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、まずはin vitroにおいてJansen型PTH-Rの機能を確認した後、Jansen型PTH-R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、Jansen型PTH-R変異型マウスの骨・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 H223R mutation (Jansen type PTH-R), which is overexpressed in murine bone and cartilage. Transgenic mice carrying Jansen type PTH-R were generated and histologically analyzed. As a consequence, the histological phenotype of bone and cartilage of Jansen type PTH-R transgenic mice was similar to the knockout mice of PTHrP or PTH-R.

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

歯の正常な萌出には、歯胚形成に呼応した歯周組織と歯槽骨の改変が必須であり、組織学的に基質改変機構が重要となる。しかし、歯科臨床的には、全身性疾患に付随する歯の萌出異常、すなわち、顎骨の骨改造異常に伴う歯の萌出遅延や形成異常が深刻な問題となる。特に、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 (New Engl J Med, 1996; Science, 1995)。骨・軟骨異形成症は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・臨床的に重要と考えられる。

これまでの研究で、「Blomstrand 型骨・軟骨異形成症を発症させる変異型 PTH-R タンパクの細胞内局在とシグナリング経路の解析」(平成 17, 18 年度・科学研究費補助金にて研究成果 Shimomura et al., 2008)において、Blomstrand 型骨・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、受容体タンパクの局在異常にも起因する可能性を見いだした(Shimomura et al., Biomedical Research, 2008)。さらに前回の科研費(若手研究 B)にて、type II collagen promoter/enhancer cassette に野生型および Blomstrand 型 PTH-R 遺伝子を組み込んだ vector を構築し、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し、野生型および Blomstrand 型 PTH-R トランスジェニックマウスを作製した(平成 19-22 年度・科学研究費補助金にて研究成果の論文作成中)。このような研究経緯をふまえて、本研究をさらに発展させたいと考え、type II collagen promoter/enhancer cassette (Ueno et al., J Cell Biol, 2001) に Jansen 型骨幹端軟骨異形成症の原因となる変異型 PTH-R 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作製する構想・準備を行った。期間としては、平成 23 年度より 3 年間にわたり本研究を実行したいと考えており、その解析内容については、Jansen 型 PTH-R トランスジェニックマウスの組織異常所見および軟骨細胞の分化マーカーや調節因子を real time PCR などにより解析することにより、変異型 PTH-R の異常作用を解析する予定であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、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-R)の恒常活性を示す Jansen 型変異 PTH-R によって誘導される分子病理、特に骨・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する。

## 3. 研究の方法

(1)野生型 PTH-R および Jansen 型変異 PTH-R (以下 PTH1R<sup>H223R</sup>)遺伝子発現ベクターの C 末にそれぞれ Flag および HA タグを付けたものを、lipofection 法にて HEK293T 細胞に遺伝子導入し、各 PTH-R を強発現させた。その後、Flag および HA に特異的な抗体を用いた免疫染色、細胞から抽出した蛋白を用いた Western blot および免疫沈降、さらに PTH-R の ligand である human PTH(1-34)添加による cAMP 産生について Cre-luc ベクターを用いた luciferase assay を行った。

(2)Type II collagen promoter/enhancer cassette (長崎大学・小守教授よりご供与)に PTH-R<sup>H223R</sup> 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した。

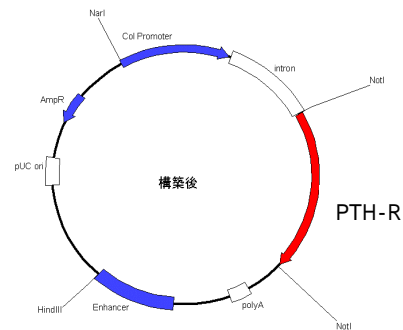


図 1 : ベクター構築

(3)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、研究委託をした。

(4)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した。

(4)組織切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (H-E)染色による組織学的検討を行った。

## 4. 研究成果

(1)各 PTH-R を強発現させた HEK293T 細胞から抽出した蛋白を用いた Western blot を行ったところ、PNGaseF 処理前は、野生型 PTH-R と PTH-R<sup>H223R</sup> とで異なるバンドのパターン(特に 80kDa 付近)を示すのに対し、PNGaseF 処理後は同様のバンドパターンを示した(図 2)。

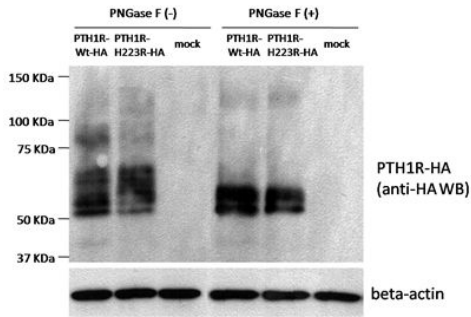


図2: Western blot によるPNGaseF処理の有無での比較

(2)また、還元処理の有無で比較したところ、非還元処理では 130 KDa 付近のバンドが認められたのに対し、還元処理後では消失していた(図3)

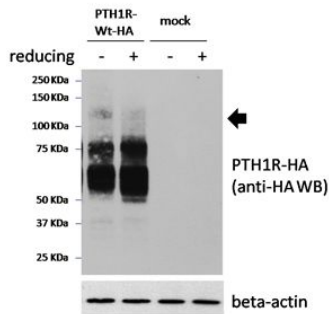


図3: Western blotによる還元処理の有無での比較

(3)次に Co-immunoprecipitation を行ったところ、野生型 PTH-R 同士および野生型 PTH-R と PTH-R<sup>H223R</sup> が互いに dimer を形成していることが強く示唆された(図4)

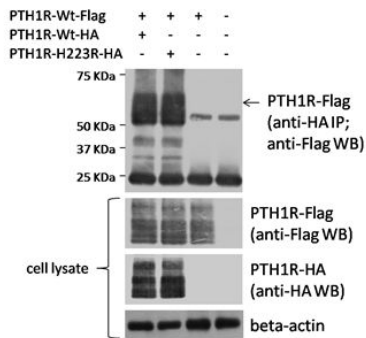


図4: Co-immunoprecipitation によるdimer形成の検討

(4)さらに免疫染色より、野生型 PTH-R を導入した HEK293T 細胞では細胞膜上に受容体の発現を認めたが、PTH-R<sup>H223R</sup> を導入した HEK293T 細胞では細胞膜上への均等な発現が認められなかった(図5)

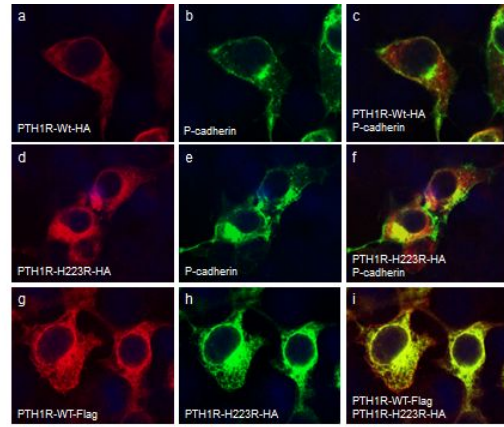


図5: anti-HA および anti-Flag 抗体を用いた免疫染色

(5)luciferase assay では、PTH-R<sup>H223R</sup> は PTH 無添加の状態でも恒常活性を持っていたが、野生型 PTH-R と共発現させた場合、luciferase activity が有意に低下した(図6)

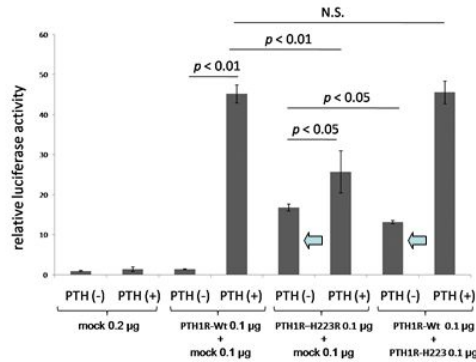


図6: HEK293T細胞に強発現させた際のcAMP活性変化

(6) マウス軟骨細胞の primary culture に作製した PTH-R<sup>H223R</sup> 発現ベクターをマウス軟骨細胞の primary culture に transfection し、anti-HA 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<sup>H223R</sup> 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7)

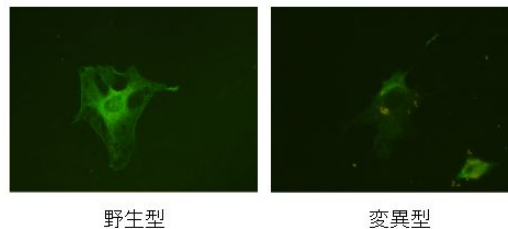


図7: anti-HA抗体による免疫染色

(7) 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。

採卵用メスマウス(C57BL/6)の卵管膨大部より採卵する。

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。

インジェクトした受精卵を1昼夜インキュベート(37℃, 5%CO<sub>2</sub>)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。

(8) 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、2/19の確率で陽性を示した。陽性を示したマウスをPTH-R<sup>H223R</sup>遺伝子が組み込まれたTGマウスとして解析に用いた。

(9) PTH-R<sup>H223R</sup>遺伝子が組み込まれたTGマウス胎子の外観はPTH-R<sup>H223R</sup>遺伝子が組み込まれていないControlのマウス胎子と比較して四肢が短かった(図8)。



図8: 胎生18日齢マウス胎子の表現系

(10) H-E染色を行った結果、PTH-R<sup>P132L</sup>TGマウス胎子では骨端軟骨の異形成が観察された。また、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<sup>H223R</sup>TGマウス胎子では、controlマウス胎子と同様に、低形成を示しながらも軟骨基質はtype II collagen陽性を示した。

#### 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 12件)

1. Kuroki H, Miyagawa Y, Shimomura-Kuroki J, Endo T, Shimomura H., Identification of marker proteins by orthodontic treatment: relationship of RANKL in the gingival crevicular fluid and of amylase in whole

saliva with orthodontic treatment, Odontology, DOI

10.1007/s10266-013-0121-6.

2. Matsuda K., Haga-Tsujimura M., Yoshie S., Shimomura-Kuroki J.:

Characteristics of alveolar bone associated with physiological movement of molar in mice: a histological and histochemical study, Odontology, 102: 98-104, 2014, DOI 10.1007/s10266-012-0093-y.

3. Junko Shimomura-Kuroki, Kie

Yamshita-Matsuda, Yukio Miyagawa, Shohachi Shimooka: Prevalence of Cariogenic and Periodontopathic Bacteria in Japanese Children in the Primary and Mixed Dentitions, the Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 36: 31-36, 2011.

4. 松田貴絵, 竜佑宗, 下村 黒木淳子:

本学小児歯科における過去4年間の口腔外傷に関する実態調査, 小児歯科学雑誌, 51(1):8-20, 2013.

5. 黒木淳子: 第51回日本小児歯科学会女性小児歯科医委員会企画シンポジウム

「子どもの心」によせて, 小児歯科臨床, 18巻8号; 35頁, 2013年.

6. 馬場篤子, 渥美信子, 林 - 坂井幸子,

平野慶子, 人美さよ子, 小田訓子, 下村 - 黒木淳子, 仲野道代, 朝田芳信, 井上美津子, 斎藤秀子, 森榮, 吉田昊哲, 高野博子; 日本小児歯科学会に属する女性小児歯科医への本音アンケート結果, 小児歯誌, 50巻, 383-392頁, 2012年.

7. 下村 黒木淳子: 研究を咀嚼する第2回,

口腔疾患発症メカニズムの解明を目指して - 小児の歯周疾患とリスクファクター -, 小児歯科臨床第17巻1号: 65-71頁, 2012年.

8. 下村 黒木淳子, 松田貴絵: 研究を咀嚼する第3回, 口腔疾患発症メカニズムの

解明を目指して - 小児における口腔疾患発症リスクの評価 - , 小児歯科臨床第 17 巻 2 号:47-53 頁, 2012 年.

9. 村中由紀子, 荻野美佐子, 岡本雅子, 宮本信也, **黒木淳子**: 第 51 回日本小児歯科学会女性小児歯科医委員会企画シンポジウム「子どもの心」総合討論, 小児歯科臨床, 18 巻 8 号:31-34 頁, 2013 年.
10. **下村 黒木淳子**: 思春期の小児と歯周病予防への対応, 歯学 春期特集号, 98: 172-177, 2011.
11. **下村 黒木淳子**: 歯科健診の現場で求められる“気づき”(2), 口腔軟組織に関する異常からの気づき, 小児歯科臨床第 16 巻 11 号:25-32 頁, 2011 年.
12. **下村 黒木淳子**: 研究を咀嚼する第 1 回, 口腔疾患発症メカニズムの解明を目指して, 小児歯科臨床第 16 巻 12 号:65-70 頁, 2011 年.

[学会発表](計 12 件)

1. Miyuki Shimada, Sachie Warita-Naoi, **Junko Shimomura-Kuroki**, Mitsuko Inoue, Yoshinobu Asada, Hiroko Takano: A research on lifestyles of female dentists In Japanese society of pediatric dentistry – part 1. The present situation of Japanese female pediatric dentists, 24<sup>th</sup> Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, Seoul, Korea, 12-15 June, 2013, International Journal of Paediatric Dentistry, 23 ( Suppl 1): 170, 2013.
2. 竜佑宗, 田中聖至, 松田貴絵, **下村 黒木淳子**: 日本歯科大学新潟病院障害児・者歯科センターの齲蝕罹患似ついで, 平成 24 年度小児歯科学会北日本地方会大会, 平成 24 年 10 月 20 日, 岩手, 小児歯科学雑誌, 51 巻 1 号:47-48 頁, 2013.
3. 松田貴絵, 竜佑宗, 田中聖至, **下村 黒木淳子**, 本学小児歯科における過去 4 年間の口腔外傷に関する実態調査, 第 51

回日本小児歯科学会大会, 岐阜, 2013 年 5 月 23-24 日, 日本小児歯科学雑誌, 51(2):260, 2013.

4. 竜佑宗, 三上正人, 葛城啓彰, **下村 黒木淳子**, Fusobacterium nucleatum と Streptococcus mutans の共凝集におけるクオラムセンシングの関与について, 第 51 回日本小児歯科学会大会, 岐阜, 2013 年 5 月 23-24 日, 日本小児歯科学雑誌, 51(2):280, 2013.
5. **下村-黒木淳子**, 竜佑宗, 梨田智子, 小児における齲蝕と遺伝的要因についての検討, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013 年 9 月 20-22 日, 岡山 J. Oral Biosci. Suppl., 191, 2013.
6. 竜佑宗, 三上正人, 葛城啓彰, **下村-黒木淳子**, Streptococcus mutans と Fusobacterium nucleatum との共凝集におけるクオラムセンシングの関与について, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013 年 9 月 20-22 日, 岡山 J. Oral Biosci. Suppl., 167, 2013.
7. 齋藤珠美, 駿河由利子, 浅川麻美, 青山有子, 加川千鶴世, 林 - 坂井幸子, 佐野富子, 庄内喜久子, 土岐志麻, 福井亜美, 芳野素子, **下村 - 黒木淳子**: 日本小児歯科学会北日本地方会に所属する女性小児歯科医の本音トークアンケート結果 - 女性の私生活と仕事に関する調査 - , 第 29 回日本小児歯科学会北日本地方会大会および総会, 平成 23 年 10 月 29 日, 北海道, 小児歯科学雑誌, 50 巻 1 号:72-73 頁, 2012 年.
8. **下村 - 黒木淳子**, 松田貴絵, 竜佑宗, 田中聖至: PTH/PTHrP 受容体遺伝子変異による機能異常の解析, 第 50 回日本小児歯科学会大会, 平成 24 年 5 月 12 日, 東京, 小児歯科学雑誌, 50 巻 2 号:163 頁, 2012 年.



9. 下村 - 黒木淳子, 竜 佑宗, 松田貴絵, 田中聖至, 織田公光, 網塚憲生: Jansen 型 PTH/PTHrP 受容体の機能異常の解析, 第 54 回 歯科基礎医学会 学術大会 ならびに 総会, 平成 24 年 9 月 14-16 日, 郡山, Journal of Oral Biosciences Suppl., 2012, p165.
10. 竜 佑宗, 三上正人, 葛城啓彰, 下村 - 黒木淳子: Fusobacterium nucleatum と Streptococcus mutans との共凝集におけるクオラムセンシングの関与について, 第 54 回 歯科基礎医学会 学術大会 ならびに 総会, 平成 24 年 9 月 14-16 日, 郡山, Journal of Oral Biosciences Suppl., 2012, p117.
11. 松田貴絵, 羽下麻衣子, 金城光也, 吉江紀夫, 下村 - 黒木淳子: マウス臼歯の生理的遠心移動に伴う歯槽骨の組織化学的検索, 第 49 回 日本小児歯科学会大会, 平成 23 年 11 月 28-29 日, 岩手, 日本小児歯科学雑誌, 49 巻 4 号: 420 頁, 2011 年.
12. 松田貴絵, 羽下麻衣子, 吉江紀夫, 下村 - 黒木淳子: マウス臼歯の生理的遠心移動に伴う歯槽骨の免疫組織化学的検討, 第 53 回 歯科基礎医学会 学術大会 ならびに 総会, 平成 23 年 9 月 30 日 - 10 月 2 日, 岐阜, Journal of Oral Biosciences, 53(Suppl):149, 2011.

〔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