様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月　 ６ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３７９２４８０
研究課題名（和文）新規エナメル基質蛋白会合分子を標的とした歯周組織再生のプロテオーム創薬

研究課題名（英文）Identification of novel amelogenin-binding proteins by proteomics analysis

研究代表者
福田　隆男（Fukuda, Takao）

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：８０５０７７８１
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）：　歯周組織の再生にエナメル基質タンパク質（EMD : Emdogain® Gel ）が用いられ良好な結果が報告されているが、その作用機序についてシグナル伝達分子レベルでの統一的な見解は得られていない。
本研究はEMDの主要蛋白であるアメロジェニンに注目して、同分子が歯周組織再生に果たす役割を機序の面から解明するためにプロテオーム解析を行い、新規アメロジェニン会合分子群の同定を世界で初めて報告した。さらにその中で、アメロジェニン会合蛋白群の中において、Grp78が骨芽細胞のアメロジェニン取り込みと細胞増殖に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Amelogenin, the major component of enamel matrix derivative (Straumann® Emdogain), is a suggested bioactive candidate for promoting the regeneration of bone and periodontal tissues. In this study, we combined affinity chromatography and proteomic analysis to characterize amelogenin-binding proteins in an osteoblast cell line. Among the identified amelogenin-interacting proteins, we validated the biological interaction of amelogenin with Grp78, which was identified in both cytosolic and membrane-enriched fractions. We demonstrated that the interaction of amelogenin with Grp78 contributed to cell proliferation, rather than correlate with the osteogenesis in SaOS-2 cells.
These findings suggest that the differential effects of amelogenin-derived osteoblast activation could be of potential clinical significance for understanding the cellular and molecular bases of amelogenin-induced periodontal tissue regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：アメロジェニン　歯周組織　再生医学　歯学　プロテーム

１．研究開始当初の背景

(1) 近年の歯周病治療において、歯周組織の再生を目的とした再生治療が精力的に行われるようになり一定の成果を上げている。中でも国内で高頻度に応用されているのが、幼若豚の歯胚から抽出されたエナメル基質タンパク質(enamel matrix derivative: EMD)である。

(2) 既に、EMD は Emdogain® Gel という名称で商品化されており、現状で増殖因子を初めとする生理活性タンパク質を利用した歯周組織再生用材料の中で唯一、厚生労働省の認可を得ている。しかし、長年 EMD の作用機序の解明を試みる研究が続けられてはいるにもかかわらず、歯周組織再生・歯肉上皮の down growth 阻害・抗炎症作用なに対するシグナル伝達分子レベルでの統一的な見は得られていない。さらに本製品はブタ歯胚由来の異種蛋白であるため、未知のウイルスの混入やアレルギー反応の可能性などの問題点を残している。

(3) アメロジェニンは細胞外基質蛋白(ECM: extracellular matrix protein)の一種で EMD の 90%以上を占める主要成分であり、EMD による歯周組織再生の中心的な分子である。医科領域においても ECM の創傷治癒・再生療法への応用は実用化されており、海外でアメロジェニンは Xelma®の商品名で難治性褥瘡治療に使用されている。

(4) アメロジェニンの歯周組織再生への応用は、歯の発生環境の生物学的模倣を基盤として開発された。アメロジェニンは歯胚形成期のエナメル芽細胞より分泌され、象牙質への沈着を介してセメント質を始めとする歯周組織形成に関与するとされる。

(5) 今までのアメロジェニンに関連する研究は、発生学的理由でエナメル芽細胞によるエナメル質形成の機能解析を対象としたものであり、アメロジェニンと歯周組織再生時に遊走し修復に関連する骨誘導担当細胞群との分子間相互作用についての研究はほとんど進んでいないのが現状である。よって歯周組織再生に重要である歯根膜細胞や骨芽細胞などにおけるアメロジェニン会合分子の同定は、その分子基盤を確立するうえで必須の検討課題であった。

２．研究の目的

(1) 本研究では、アメロジェニンとその会合分子の組換えタンパク質を原料とした、歯周組織再生のシグナルをより効果的に誘導する安全性の高い分子標的再生療法の開発を目的とする。

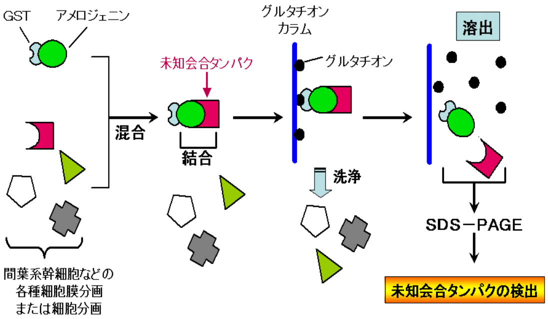
(2) そのために EMD の 90%以上を占める主要成分であるアメロジェニンに注目してプロテオーム解析を行うことにより、新規アメロジェニン会合分子の同定を行い、その会合タンパク質による歯周組織再生機序の可能性を検討した。

３．研究の方法

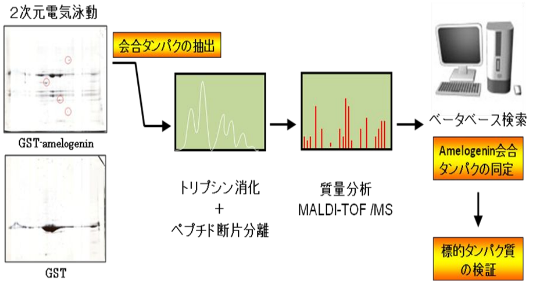
(1) 胎生マウス cDNA から GST 融合アメロジェニンの作成および、アメロジェニン(GST タグなし)を精製した。

(2) 組み換えアメロジェニンの骨芽細胞内への経時的な取り込みを、共焦点蛍光顕微鏡により観察した。

(3) GST pull down assay により SaOS-2 ヒト骨芽細胞様細胞の可溶性分画・膜分画におけるアメロジェニン会合蛋白を 2 次元電気泳動(2D-PAGE)により分離し、CBB 染色により検出した。



(4) 2D-PAGE で得られたアメロジェニン会合蛋白スポットをタンパク質質量分析(MALDI-TOF MS)により同定し、さらに骨芽細胞の可溶性分画・膜分画における会合蛋白の比較を行った。



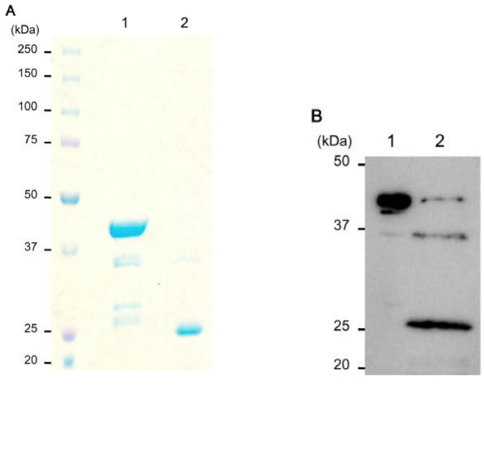
(5) アメロジェニンとアメロジェニン会合蛋白の細胞内における共局在を、共焦点蛍光顕微鏡により観察した。

(6) アメロジェニン会合蛋白を siRNA でノックダウンし、アメロジェニン刺激時の細胞動態変化について細胞増殖(WST-8 assay)および骨分化マーカー遺伝子群の発現をリアルタイム PCR で比較検討した。

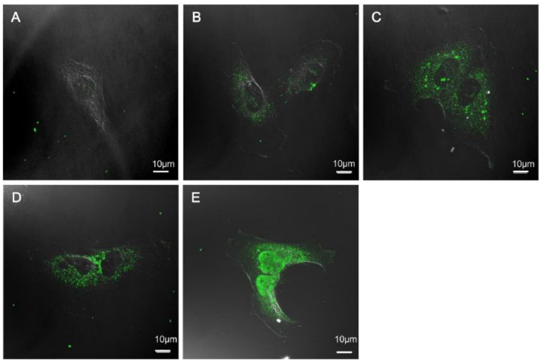
４．研究成果

(1) SaOS-2 骨芽細胞において、アメロジェニンが経時的に細胞膜から核近傍へ集積して取り込まれる様子を確認した。

①アメロジェニンの精製の CBB 染色(A)と Western blot での確認

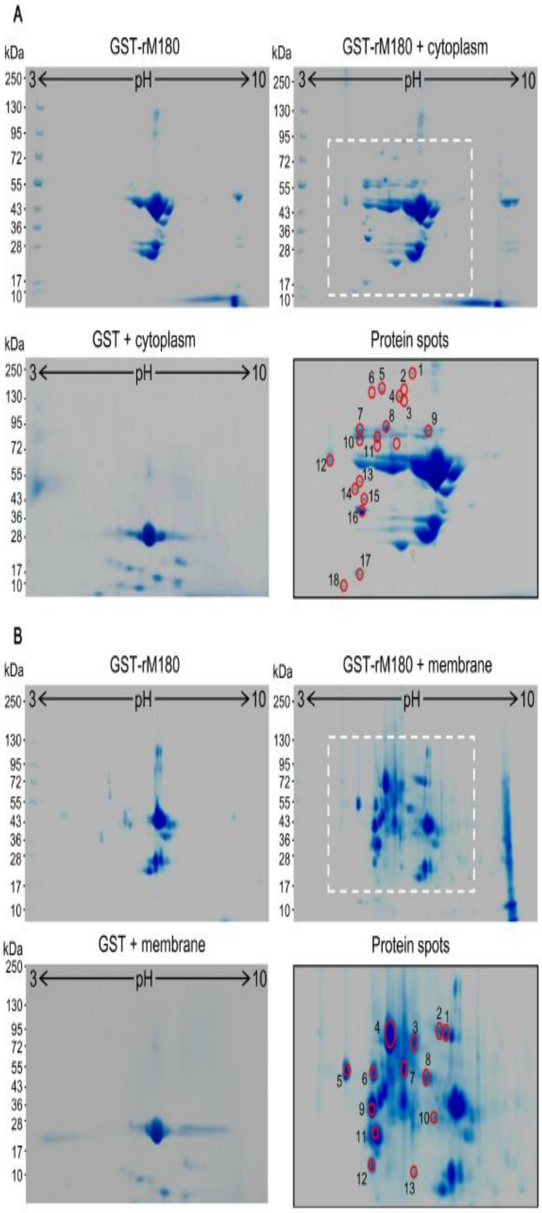


②蛍光標識したアメロジェニンの細胞内取り込み画像



(2) SaOS-2 骨芽細胞において、アメロジェニン会合蛋白を可溶分画に 16 個、膜分画に 12 個同定した。その中で、小胞体関連シャペロン蛋白である Grp78 のみが唯一、両分画に存在していた。

①SaOS-2 骨芽細胞の可溶性分画(A)と膜分画(B) におけるアメロジェニン会合分子スポットの２次元泳動による確認



②SaOS-2 骨芽細胞の可溶性分画におけるアメロジェニン会合分子の一覧表

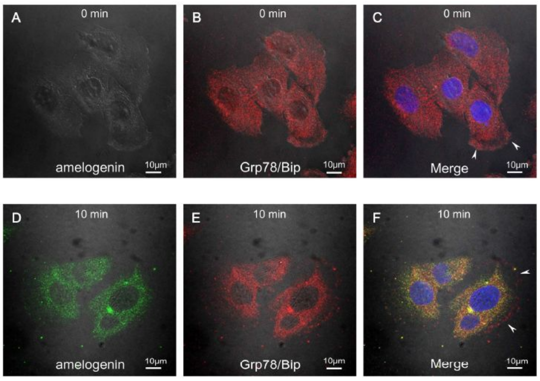
Spot protein identified[a]		Accession number[b]	Protein parameters (Theo.)[c]		Mascot score[d]
			Mo.wt (kDa)	pI	
1	gelsolin isoform b	gi|38044288	80.88	5.58	64
2	MTHSP75	gi|292059	74.02	5.97	75
3	No significant hits				
4	heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1	gi|5729877	71.08	5.37	149
5	Grp78/BiP precursor	gi|386758	72.16	5.07	327
6	molecular chaperone DnaK (*Escherichia coli*)				
7	tubulin alpha-1B chain	gi|34740335	50.80	4.94	214
8	vimentin	gi|340219	53.74	5.03	100
9	tubulin alpha-1B chain	gi|34740335	50.80	4.94	207
10	beta-tubulin	gi|338695	50.24	4.75	132
11	tubulin, beta 2C, isoform CRA_b	gi|338695	49.25	4.88	165
12	actin, cytoplasmic 1	gi|4501885	42.05	5.29	172
13	tropomyosin alpha-4 chain isoform 2	gi|4507651	42.05	5.29	172
14	outer membrane protein F [*Escherichia coli* M605]				
15	No significant hits				
16	No significant hits				
17	myosin regulatory light chain 12A	gi|5453740	19.84	4.67	179
18	sialic acid binding Ig-like lectin 10	gi|119592421	47.74	9.41	54
19	ATPase beta	gi|226371	50.23	4.86	138
20	No significant hits				

a. The numbers correspond to those illustrated in Figure 2A.
b. NCBI accession, accession number from the NCBI database of matched proteins
c. Theo. Mr (kDa)/pI, the theoretical molecular mass and isoelectric point based on the amino acid sequence of the identified protein
d. Mascot score, score obtained from Mascot for each match proteins
doi: 10.1371/journal.pone.0078129.t002

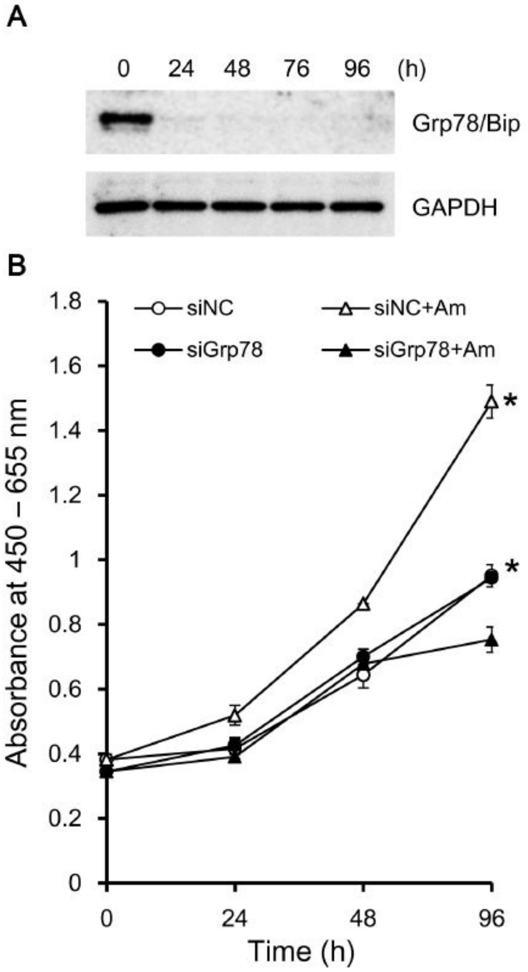
②SaOS-2 骨芽細胞の膜分画におけるアメロジェニン会合分子の一覧表

Spot protein identified[a]		Accession number[b]	Protein parameters (Theo.)[c]		Mascot score[d]
			Mo.wt (kDa)	pI	
1	caldesmon	gi|179830	62.72	6.18	102
2	unnamed protein product	gi|189054178	66.15	7.62	131
3	MTHSP75	gi|292059	74.02	5.97	86
4	Grp78/BiP	gi|6470150	71.00	5.23	187
5	calreticulin	gi|119604736	48.10	4.30	90
6	protein disulfide-isomerase precursor	gi|20070125	57.48	4.76	127
7	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	gi|31542947	61.19	5.70	93
8	Chain A, TapasinERP57 HETERODIMER	gi|220702506	54.54	5.61	160
9	unnamed protein product	gi|16552261	47.52	5.01	136
10	Chia A, Crystal Structure Of Human Grp78/Bip	gi|320089786	42.28	6.00	103
11	nucleophosmin isoform 2	gi|40353734	29.62	4.47	121
12	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase subunit	gi|344339629	29.62	4.47	104
13	prohibitin	gi|46360168	29.86	5.57	237

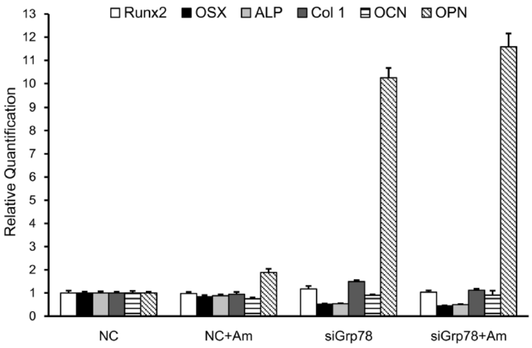
(3) Grp78 は細胞内でユビキタスに発現していたが、アメロジェニン取り込み時には核近傍への共局在が確認された。



(4) アメロジェニン刺激時に SaOS-2 骨芽細胞の有意な細胞増殖の亢進が確認されたが、Grp78 ノックダウンによりアメロジェニンの細胞増殖効果は消失した。



(5) アメロジェニン添加により Osteopontin のみ発現が上昇したが、その他の骨分化マーカー遺伝子群は減少傾向を示した。SaOS-2 骨芽細胞の Grp78 ノックダウンにより、Runx2, Osterix, ALP の発現が低下したが、Osteopontin の著明な増加が認められた。



(6) プロテオーム解析によりアメロジェニン会合分子として同定された Grp78 は、アメロジェニンの取り込みに関与しているとみられる。両者の会合による細胞増殖への影響が強く示されたが、骨分化においては初期の影響は少なく、後期の石灰化への関与が示唆された。EMD が分化度の低い骨芽細胞系細胞には増殖を促進するのに対し、より分化度の高い骨芽細胞では増殖を抑制し、分化を促進するとの報告がある。Grp78 を介したアメロジェニンの骨芽細胞への影響について、今後は骨芽細胞の分化度に注目しての更なる検討が必要とみられる。

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　1　件）

① Fukuda T., Sanui T., Toyoda K., Tanaka U., Taketomi T., Uchiumi T., and Nishimura F. Identification of novel amelogenin-binding proteins by proteomics analysis. *PLoS One.* 査読（有）8 (10)巻、2013:e78129

〔学会発表〕（計　31　件）

① 福田隆男、プロテオーム解析によるアメロジェニン会合分子の検討、第 139 回 日本歯科保存学会 秋季学術大会、2013 年 11 月、秋田
② 福田隆男、Grp78 mediates endocytosis of amelogenin. 10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, 2013.09.03. Nara, Japan
③ 福田隆男、The effect of Grp78 on cellular uptake of amelogenin. 2nd meeting of IADR-APR, 2013.08.21. Bangkok, Thailand
④ 福田隆男、Proteomic approach to understanding amelogenin binding proteins. 91nd General Session & Exhibition of the IADR, 2013.03.22. Seattle, Wash., USA
⑤ 福田隆男、Y-box 結合タンパク質の骨芽細胞における動態解析、第 22 回日本歯科医学会総会・2012 年 11 月、大阪
⑥ 福田隆男、Knockdown of YB-1 protein induces osteoblastic differentiation. Pan Europe Region / International Association for Dental Research (PER/IADR) Meeting, 2012.09.14. Helsinki, Finland.

⑦　福田隆男、ヒト Y-box 結合蛋白（YB-1）の骨芽細胞における細胞動態解析、第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会･2011 年､9 月、下関
〔図書〕（計　3　件）
①　福田隆男、田中麗、豊田敬介、讃井 彰一、武富 孝治、後村亮、濱地貴文、前田勝正、西村英紀. 医歯薬出版株式会社、「Y-box 結合タンパク質の骨芽細胞における動態解析」、歯界展望　特別号 2013, 2013.05.
②　田中麗、豊田敬介、福田隆男、讃井 彰一、後村亮、濱地貴文、前田 勝正、医歯薬出版株式会社、「歯周組織細胞群における新規アメロジェニン結合タンパク質のプロテオーム解析」、歯界展望　特別号 2013, 2013.05.
③　讃井彰一、田中麗、豊田敬介、福田隆男、後村亮、濱地 貴文、前田 勝正、医歯薬出版株式会社「bFGF シグナルのアンタゴニストを標的とした歯周組織再生療法の開発」、歯界展望　特別号 2013, 2013.05.

〔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　　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
http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/perio/

６．研究組織
(1)研究代表者
福田　隆男（FUKUDA　TAKAO）
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：80507781
研究者番号：

(2)研究分担者
(　　　)

研究者番号：

(3)連携研究者
(　　　)

研究者番号：