

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390409

研究課題名(和文) 超微構造解析から探るDMP1による生体内石灰化機構の解明

研究課題名(英文) Ultramicrostructural analysis of biomineralization processes of DMP1

## 研究代表者

豊澤 悟 (Toyosawa, Satoru)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30243249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨の非コラーゲン性基質蛋白質であるDMP1(dentin matrix protein 1)は、骨基質に埋まった骨細胞により産生され、リン酸化されてマイナス荷電体となり、Ca<sup>2+</sup>結合能を獲得して骨の石灰化に関与すると考えられている。本研究では、超微構造解析により、DMP1は類骨における初期石灰化には関与しないことが示唆された。免疫組織化学的解析から、DMP1は分泌後に切断され、N末端断片は骨小腔周囲基質に、C末端断片は骨細管周囲基質に分布する傾向を認めた。また、C端断片は高度にリン酸化されており、マイナス荷電体となるため、骨細管周囲基質でCa<sup>2+</sup>を補足して骨の石灰化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：DMP1 (dentin matrix protein 1) is a non-collagenous matrix protein produced by osteocytes buried in bone matrix. DMP1 has a large number of phosphorylation sites and these regions become highly negative-charged domain after phosphorylation. The highly phosphorylated, negative-charged DMP1 may play an important role in the bone mineralization by recruiting Ca<sup>2+</sup> and subsequent mineral deposition. In this study, ultramicrostructural analysis suggested DMP1 did not participate in initial calcification in the osteoid. Immunohistochemical analysis suggested after post-translational cleavage, DMP1 had a tendency to be localized at perilacunar matrix as an NH<sub>2</sub>-terminal fragment and at pericanalicular matrix as a COOH-terminal fragment. Further, COOH-terminal fragment at pericanalicular matrix was demonstrated to be highly phosphorylated. Therefore, highly phosphorylated, negative-charged COOH-terminal fragment at pericanalicular matrix may play an important role in the bone mineralization.

研究分野：口腔病理学

キーワード：生体内石灰化 dentin matrix protein 1 翻訳後修飾 超微構造 骨細胞

### 1. 研究開始当初の背景

骨の非コラーゲン性基質蛋白質である DMP1(dentin matrix protein 1)は、骨基質に埋まった骨細胞により特異的に産生される。骨細胞から産生された DMP1 は、分泌後に高度なマイナス荷電体となり、強力な  $Ca^{2+}$  結合能を獲得して骨の石灰化に関与すると考えられている。その過程で、DMP1 は切断されて 37kDa と 57kDa 断片へと分かれ、高度にリン酸化される等の翻訳後修飾を受けると考えられているが、これらの DMP1 の翻訳後修飾と骨の石灰化との関係は明らかではない。

### 2. 研究の目的

骨組織において、酸性リン蛋白質は負に荷電することにより  $Ca^{2+}$  結合能を獲得して骨の石灰化に関与すると考えられている。本研究では、酸性リン蛋白質の1つである DMP1 の翻訳後修飾という蛋白分子レベルの現象が、骨の石灰化に果たす役割を、超微構造解析により明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 非脱灰骨組織の電顕観察

雄性 Wistar ラットの脛骨を、2.5% グルタルアルデヒド含有 2% パラホルムアルデヒドにて固定した。DMP1 を特異的に発現する骨細胞と初期石灰化現象との関係を検討するため、非脱灰の脛骨サンプルは陰圧状態で長時間放置してエポキシ樹脂を十分に浸透させた後、重合を行った。超薄切片作製時、初期石灰化結晶が可及的に溶解しないよう、50%アルコール水溶液にて超薄切片を作製した。これらの超薄切片を透過型電子顕微鏡にて、約 700 nm 厚切片を超高圧電子顕微鏡(加速電圧: 3.0 MV)を用いて観察した。

#### (2) *in situ* hybridization

4% パラホルムアルデヒド固定したラット脛骨を 10% EDTA にて低温脱灰した後にパラフィン包埋した試料を用いた。ラットの DMP1 RNA プローブは、全長 DMP1 cDNA を鋳型にして digoxigenin (DIG)-UTP で標識して合成した。合成 RNA プローブは約 150 bp にアルカリ加水分解後、切片に滴下して hybridization を行ない、アルカリホスファターゼ発色にて検出した。上記の全行程を RNase free 環境下にて行った。

#### (3) 免疫組織化学的染色

ラット DMP1 C 末端断片ペプチド (FRRSRVSEEDDRGE) と N 末端断片ペプチド (SGDDTFGDEDNGPGEER- QWGG) およびヒト Fam20C に対するウサギポリクローナル抗体と、ヒト DMP1 C 末端断片、ホスホセリン、ラット GM130 (ゴルジ体のマーカー) に対するマウスモノクローナル抗体を一次抗体として切片に滴下した。各一次抗体との免疫反応部位は、sABC (streptavidin-biotin

complex)法を用いて DAB 発色にて検出した。蛍光二重染色には、二種の動物種の一次抗体を同一切片に滴下・反応後、各々の一次抗体を認識する二種の蛍光標識二次抗体と反応させ、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて二種の蛍光発色部位を観察した。

#### (4) 包埋後免疫電顕

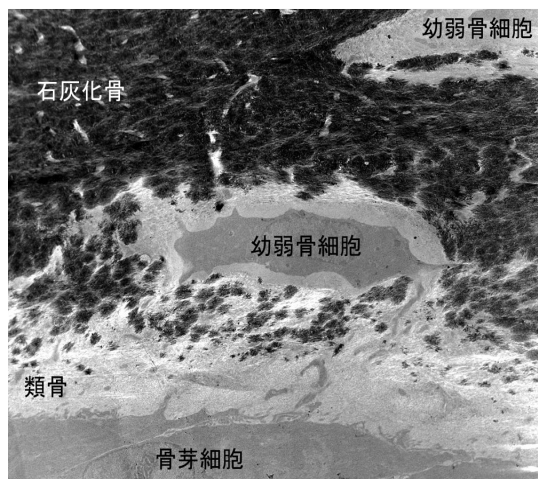
水溶性樹脂包埋試料から超薄切片を作製して、免疫組織化学的染色による二重染色を行った。同一切片に抗ラット DMP1 C 末端断片ペプチド抗体と抗ホスホセリン抗体を滴下・反応後、各々の一次抗体を認識する 20 nm と 10 nm の金粒子標識二次抗体と反応させ、透過型電子顕微鏡(加速電圧: 80 kV)を用いて金粒子の局在部位を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 非脱灰骨組織の超微構造解析

ラット皮質骨の類骨～石灰化骨にかけて電顕観察を行った結果、初期石灰化は、DMP1 を特異的に産生する骨細胞を中心に進行するのではなく、骨芽細胞層からある一定の類骨幅を保って石灰化が起きていることが分かった(図1)。この石灰化現象を超高圧電子顕微鏡を用いて 2 $\mu$ m の厚みのある切片において三次元的にも確認した。骨細胞の周囲ではむしろ石灰化は抑制され、骨細胞周囲に形態学的にプロテオグリカンと考えられる細胞外基質の分布が認められ、このスペース確保が骨細胞が完全に石灰化骨内に埋入した後の骨小腔になると考えられた。

<図1:非脱灰超薄切片における初期石灰化部位>

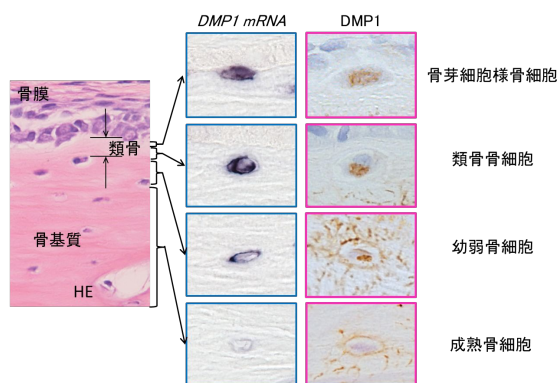


#### (2) 皮質骨における DMP1 産生

ラット皮質骨における DMP1 mRNA 発現は、類骨に分布する骨芽細胞様骨細胞と類骨骨細胞で強発現していたが、石灰化骨に分布する幼若骨細胞では DMP1 mRNA 発現が低下し、成熟骨細胞ではその発現は殆ど認められなかった。また、免疫組織化学的染色の結果から、DMP1 は、骨芽細胞様骨細胞、類骨骨細胞、幼若骨細胞内のゴルジ領域に認められると共に、石灰化骨に分布する幼若骨細胞や成熟

骨細胞の骨細管や骨小腔周囲にその局在が認められた。以上から、骨表層付近の未成熟な骨細胞は DMP1 を産生するが、骨深部に分布する成熟骨細胞は DMP1 を殆ど産生しておらず、幼若骨細胞が産生し、細胞外に分泌された DMP1 は、骨細管や骨小腔周囲に安定して分布し続けるものと考えられた ( 図 2 )。

<図 2 : 皮質骨における DMP1 mRNA 発現と蛋白分布>



### ( 3 ) DMP1 の翻訳後修飾の検討

DMP1 の翻訳後修飾について、蛍光 2 重免疫染色により検討した。まず、37kDa の N 端断片と 57kDa の C 端断片を捉える抗体を用いて検討した結果、N 端断片は骨小腔周囲基質に分布するのに対し、C 端断片は骨細管周囲の基質に分布する傾向があることが分かった。次に、高度にリン酸化されていると報告のある 57kDa の C 端断片のリン酸化状態を、Dmp1 の C 端断片とホスホセリンの蛍光二重染色および免疫電顕の二重染色から検討した結果、DMP1 の C 端断片とホスホセリンの共局在が認められ、リン酸化された DMP1 C 端断片は骨細管周囲の骨基質に分布することが分かった。

### ( 4 ) DMP1 がリン酸化を受ける部位の検討

分泌蛋白質をリン酸化する Fam20C が、最近発見され、Fam20C の免疫染色を行った結果、Fam20C は骨細胞に高発現していることが分かった。in vitro では DMP1 をリン酸化することが報告された事から、骨細胞が特異的に産生する DMP1 は、骨細胞が高発現する Fam20C によりリン酸化されることが推測された。そこで、Fam20C と DMP1 の蛍光二重染色を実施した結果、骨芽細胞様骨細胞、類骨骨細胞、幼若骨細胞ではゴルジ領域に Fam20C と DMP1 の共局在が認められ、DMP1 はゴルジ装置で Fam20C によりリン酸化されることが示唆された。

## 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 8 件 )

Yamazaki D, Funato Y, Miura J, Sato S, Toyosawa S, Furutani K, Kurachi Y,

Omori Y, Furukawa T, Tsuda T, Kuwabata S, Mizukami S, Kikuchi K, Miki H. Basolateral Mg<sup>(2+)</sup> Extrusion via CNNM4 Mediates Transcellular Mg<sup>(2+)</sup> Transport across Epithelia: A Mouse Model. PLoS Genet. 査読有. 9:e1003983, 2013.

Yonekura T, Homma H, Sakurai A, Moriguchi M, Miake Y, Toyosawa S, Shintani S. Identification, characterization, and expression of dentin matrix protein 1 gene in *Xenopus laevis*. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 査読有. 320:525-537, 2013.

Sato S, Hashimoto J, Usami Y, Ohyama K, Isogai Y, Hagiwara Y, Maruyama N, Komori T, Kuroda T, Toyosawa S. Novel sandwich ELISAs for rat DMP1: Age-related decrease of circulatory DMP1 levels in male rats. Bone. 査読有. 57:429-36, 2013.

Sasaki M, Hasegawa T, Yamada T, Hongo H, de Freitas PH, Suzuki R, Yamamoto T, Tabata C, Toyosawa S, Yamamoto T, Oda K, Li M, Inoue N, Amizuka N. Altered distribution of bone matrix proteins and defective bone mineralization in klotho-deficient mice. Bone. 査読有. 57:206-19, 2013.

Usami Y, Ishida K, Sato S, Kishino M, Kiryu M, Ogawa Y, Okura M, Fukuda Y, Toyosawa S. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. Int J Cancer. 査読有. 133:568-578, 2013.

Akiyama H, Otani M, Sato S, Toyosawa S, Furukawa S, Wakisaka S, Maeda T. A novel adipokine C1q/TNF-related protein 1 (CTRP1) regulates chondrocyte proliferation and maturation through the ERK1/2 signaling pathway. Mol Cell Endocrinol. 査読有. 369:63-71, 2013.

Guttenberg M, Candela ME, Ohta Y, Yasuhara R, Kondo N, Sgariglia F, Asai S, Zhang X, Qin L, Hecht JT, Chen D, Yamamoto M, Toyosawa S, Dormans JP, Esko JD, Yamaguchi Y, Iwamoto M, Pacifici M, Enomoto-Iwamoto M. Loss of  $\beta$ -Catenin Induces Multifocal Periosteal Chondroma-Like Masses in Mice. Am J Pathol. 査読有. 182:917-927, 2013.

Kagawa R, Kishino M, Sato S, Ishida K, Ogawa Y, Ikebe K, Oya K, Ishimoto T, Nakano T, Maeda Y, Komori T, Toyosawa S. Chronological histological changes during bone regeneration on a

non-crosslinked atelocollagen matrix.  
J Bone Miner Metab. 査読有.30:638-650,  
2012.

〔学会発表〕(計 10 件)

大家香織、佐藤 淳、宇佐美悠、岸野万伸、野田百合、廣瀬勝俊、小川裕三、小守壽文、豊澤 悟：DMP1 の翻訳後修飾に関する形態学的変化 第 56 回歯科基礎医学学会学術大会・総会、2014 年 9 月 25-27 日、福岡

佐藤 淳、宇佐美悠、大家香織、岸野万伸、野田百合、廣瀬勝俊、小川裕三、小守壽文、豊澤 悟：ラットの血中 DMP1 値の加齢に伴う変化 第 56 回歯科基礎医学学会学術大会・総会、2014 年 9 月 25-27 日、福岡

Oya K, Sato S, Toyosawa S: Morphological analysis of Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) phosphorylation by Fam20C in the bone, ASBMR 2014 Annual Meeting September 12-15, 2014, Texas, USA.

大家香織、佐藤 淳、小守壽文、豊澤 悟：分泌型リン酸化酵素 FAM20C による DMP1 リン酸化の形態学的検討 第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7 月 24-26 日、大阪

佐藤 淳、橋本 淳、大家香織、磯谷幸宏、小守壽文、黒田龍彦、豊澤 悟：ラット DMP1-ELISA にて測定した加齢に伴う血中 DMP1 測定値の変化 第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7 月 24-26 日、大阪

佐藤 淳、岸野万伸、豊澤 悟：ラット DMP1 に対する新規 ELISA の開発：加齢に伴う血液中 DMP1 量の減少 第 68 回 NPO 法人日本口腔科学学会学術集会、2014 年 5 月 7-9 日、東京

大家香織、佐藤 淳、野田百合、石田健、宇佐美悠、岸野万伸、小川裕三、小守壽文、豊澤 悟：骨細胞の各分化ステージにおける DMP1 の発現・分布について。第 54 回 歯科基礎医学学会学術大会、2013 年 9 月 21 日、岡山

Oya K, Sato S, Usami Y, Kishino M, Ogawa Y, Toyosawa S: DMP1 expression during osteoblast-to-osteocyte transition. The 6th Korea-China-Japan Graduate student Forum, September 5, 2013, Daejeon, Korea.

大家香織、石田健、佐藤淳、宇佐美悠、岸野万伸、小川裕三、豊澤悟：骨細胞の各分化段階を識別する分子マーカーについて 第 54 回 歯科基礎医学学会学術大会、2012 年 9 月 14-16 日、福島

佐藤淳、石田健、宇佐美悠、岸野万伸、小川裕三、豊澤悟：石灰化培養実験における DMP1 のリン酸化について 第 54 回歯科基礎医学学会学術大会、2012 年 9 月

14-16 日、福島

〔図書〕(計 5 件)

豊澤 悟. DMP1. 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典 (編集：日本骨代謝学会), 羊土社, p105-106. 2015.

豊澤 悟. 石灰化嚢胞性歯原性腫瘍・象牙質形成性幻影細胞腫. 頭頸部腫瘍. (編集：森永正二郎、高田隆、長尾俊孝), 文光堂, p148-153. 2015.

豊澤 悟、村上秀明、宇佐美悠. 顎骨の線維-骨性病変 - 歯原性腫瘍との鑑別点を含めて - 病理と臨床 31: 527-534, 2013.

Toyosawa S, Murakami S, Kishino M, Sato S, Kogo M. A brief review: characteristics of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) from the viewpoint of pathology. Oral Radiol 29:105-110, 2013.

豊澤 悟、岸野万伸、佐藤 淳. Fibrous dysplasia 再訪. リウマチ病セミナーXX (監修：七川歡次) 永井書店, 大阪, p49-56. 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊澤 悟 (TOYOSAWA SATORU)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：30243249

(2) 研究分担者

保田 英洋 (YASUDA HIDEHIRO)  
大阪大学・学内共同利用施設・教授  
研究者番号：60210259

三浦 治郎 (MIURA ICHIROU)  
大阪大学・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：70437383

石本 卓也 (ISHIMOTO TAKUYA)  
大阪大学・工学研究科・助教  
研究者番号：50508835

佐伯 万騎男 (SAEKI MAKIO)  
大阪大学・工学研究科・助教  
研究者番号：30273692

宇佐美 悠 (USA YU)  
大阪大学・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：80444579

(3) 連携研究者

香川 良介 (KAGAWA RYOUSUKE)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：40448147