

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463169

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによるGPCR転写制御マップの作成と骨再生遺伝子治療

研究課題名(英文)GPCR transcriptional map creation using NGS and bone regenerative medicine

研究代表者

渡 一平 (Ippei, Watari)

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の中でもセクレチン型であるGPCRクラスBに着目し、骨代謝に関連する受容体とその機能に関して検討を行った。GPCRクラスBに属するインクレチン受容体(GLP-1受容体、GIP受容体)は膵細胞に存在し、上部消化管から分泌されるインクレチン(GLP-1,GIP)と結合しインスリン分泌を促すことが知られている。我々はこのインクレチン受容体が骨芽細胞培養株上に発現し、BMP2存在/非存在下において培養液中糖濃度依存的に骨芽細胞機能に影響を及ぼすことを明らかにし、さらにこれらインクレチン受容体が口腔内他臓器(唾液腺、舌味蕾)にも発現していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In our study we have focused on G protein-coupled receptors in respect to their functions related to bone metabolism. We have revealed that incretin receptors belonging to the GPCR class B (GLP-1 receptor and GIP receptor) are expressed in osteoblastic cell line, MC3T3-E1, rat salivary glands and taste buds. The studies related to their exact function of incretin receptors in oral region are ongoing, at present we are implementing the comprehensive analysis of the transcription factors related to the incretin signals.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：GPCR RNA seq 次世代シーケンサー 骨再生 インクレチン 唾液腺 バイオインフォマティクス
核酸医療

1. 研究開始当初の背景

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、先行研究においてPTHの連続投与による骨量の低下に代表されるように、各種のGPCR-Bを介したシグナルの一部は骨形成の抑制作用を持つと考えられており、糖代謝や摂食エネルギー調節に関わるシグナルの一部が受容体を介して骨形成に抑制的に作用することが報告されている。応募者はこれまでにインクレチン受容体(GIP、GLP-1)をはじめ各種GPCRの顎口腔内での発現や顎骨・歯槽骨代謝に及ぼす効果を検討してきたが、翻訳過程での選択的スプライスにより臓器/組織間での受容体発現にバリエーションがあり、また定量PCRやマイクロアレイにおいて検出限界やBLUST検索等をもとに設計したプライマーやプローブのハイブリダイズ精度の問題等により骨再生の標的となる新規遺伝子や転写産物の特定には至っていない。

そこで本研究では、骨芽細胞のRNAシーケンス(RNA seq)を行って得られた出力データの中からGPCR-B遺伝子に関連した転写産物に注目して転写制御マップを作成し、GPCR-Bを介して骨形成を制御する因子(群)を同定、その後これらの因子(群)のRNA発現を最新のRNA工学を応用して制御することで新たな骨再生法の樹立をめざす。

2. 研究の目的

顎骨・歯槽骨の再生において、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工学(次世代シーケンサーとバイオインフォマティクスツールの活用)を用いた骨再生遺伝子治療について唾液腺を標的臓器として実践することが本研究の具体的な目標である。

3. 研究の方法

培養骨芽細胞に対して骨形成誘導因子やGPCR-Bアゴニストを作用させ、次世代シーケンサーを用いた転写産物の網羅的解析(RNAシーケンス)を行いGPCR-B遺伝子の転写制御ネットワークマップの作成を行う。このマップを参考に骨形成候補転写産物を選定し、選定された因子の発現制御に伴う骨再生能を生化学的解析によって評価する。

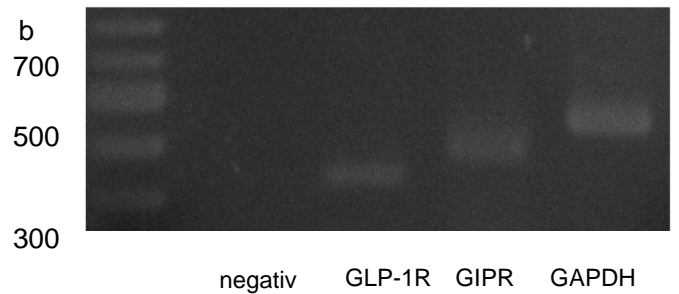
4. 研究成果

培養骨芽細胞網上のGPCR-B受容体発現とBMP-2およびグルコース濃度による影響

GPCR-B受容体の中で、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)の骨芽細胞での同時発現を初めて確認した。

またその発現量が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。また培養骨芽細胞のRNA seqに向けて現在準備中である。

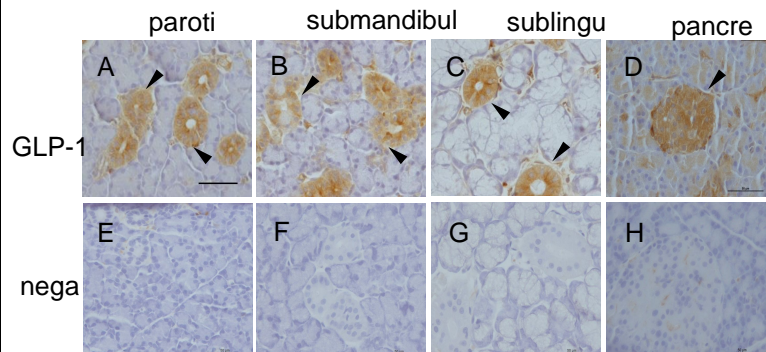
mRNA expression of incretin receptors in MC3T3-E1 cell



口腔内各臓器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

GPCR-B受容体の中で、糖代謝および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発現解析を行った。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、GLP-1およびその受容体であるGIPR、GLP-1Rの発現が認められ、また成長に伴い発現量が変化することや歯の喪失など口腔環境の変化によって発現量が変動することが確認された。また口腔内において呼吸、嚥下、発音、咀嚼などさまざまな機能にとって重要な臓器である舌の各乳頭(有隔乳頭、葉状乳頭)においても、GLP-1およびその受容体であるGLP-1Rの発現が確認され、現在その機能について詳細な検討を行っている。

GLP-1R expression in rat salivary gland



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)

- 1) Ono R, Watari I, Kubono-Mizumachi M, Ono T. GLP-1R expression in the major salivary glands of rats. J Oral Biosci. in press.
- 2) Abbassy MA, Watari I, Bakry AS, Hamba H, Hassan AH, Tagami J, Ono T. Diabetes detrimental effects on enamel and dentine formation. J Dent. 43;589-96:2015 査読有
- 3) Terasawa K, Rajapakshe AR, Podyma-Inoue KA, Mishima-Tsumagari C, Yanagishita M, Hara-Yokoyama M. Preferential recognition of isocitrate dehydrogenase by a rabbit monoclonal antibody (ab124797) against the C-terminal peptide of RANKL. J Immunol Methods. 420;1-10:2015. 査読有
- 4) Rajapakshe AR, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Hasegawa K, Namba T, Kumei Y, Yanagishita M, Hara-Yokoyama M. Lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) regulate intracellular positioning of mitochondria in MC3T3-E1 cells. Exp Cell Res. 331;211-22:2015. 査読有
- 5) Hsu JC, Watari I, Ono R, Privatnanupunt J, Mizumachi-Kubono M, Honda K, Ishida Y, Ono T. Degeneration of fungiform and circumvallate papillae following molar extraction in rats. Acta Odontol Scand. 72;880-6:2014. 査読有
- 6) Watari I, Privatnanupunt J, Hsu JC, Podyma-Inoue KA, Ono T. The influence of gestational diabetes in craniofacial growth of newborn. J Soc Wom Health Sci Res. 3;57-62:2014. 査読無
- 7) Aoyama E, Watari I, Podyma-Inoue KA, Yanagishita M, Ono T. 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. 34;475-82:2014. 査読有
- 8) Privatnanupunt J, Watari I, Podyma-Inoue KA, Kubono M, Ono T. Expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its receptor in the rat major salivary glands. Acta Histochem. 116;545-50:2014. 査読有

[学会発表](計 5 件)

- 1) Watari I, Podyma-Inoue KA, Yonemitsu I., Miyazaki M., Ono T, Altered craniofacial morphogenesis in offspring of rats with gestational diabetes. 91th European Orthodontic Society Venice, Italy, 13-18 June 2015

- 2) Watari I, Aoyama-Wakasugi E, Podyma-Inoue KA, Yanagishita M, Ono T. Changes in the expression of incretin receptors in a mouse osteoblastic cell line in response to various glucose concentrations. 17th International Symposium on Molecular Medicine, Athens, Oct 9-11 2014

- 3) 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. マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 におけるインクレチン受容体の発現はグルコース濃度の影響を受ける. 第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20-22 日、千葉(幕張メッセ)

- 4) 渡一平、パイワッタナヌパンジュティポーン、許瑞瑾、井上カタジナアンナ、小野卓史. 妊娠糖尿病が新生児の頭蓋顎顔面成長発育に与える影響について. 第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20-22 日、千葉(幕張メッセ).

- 5) 渡一平、若杉絵美奈、パイワッタナヌパンジュティポーン、許瑞瑾、井上カタジナアンナ、小野卓史. 妊娠糖尿病はラット新生児の頭蓋顎顔面領域の形態形成に影響を与える. 第 30 回日本糖尿病・妊娠学会、2014 年 11 月 28-29 日、長崎(長崎ブリックホール). [図書](計 1 件)

Watari I, Abbassy MA, Podyma-Inoue KA, Ono T. Complication of Type 1 Diabetes in Craniofacial and Dental Hard Tissue. Type 1 Diabetes - Current Management INTECH ISBN 978-953-51-4234-8

[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

<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 医歯学総合研究科
助教

研究者番号 : 10431941

(2)研究分担者

KA 井上 (PODYMA-INOUE K.A.)

東京医科歯科大学 医歯学総合研究科
助教

研究者番号 : 90302877

(3)連携研究者

篠村多摩之 (SHINOMURA Tamayuki)

東京医科歯科大学 医歯学総合研究科
准教授

研究者番号 : 70206118