

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862045

研究課題名(和文) スモ化システムの歯周組織再生医療への応用

研究課題名(英文) Effects of sumoylation on periodontal regeneration therapy

研究代表者

北垣 次郎太 (Kitagaki, Jirouta)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90570292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、タンパク修飾システムの一つであるスモ化システムの歯周組織再生への役割を解明することを目的としている。スモ化システムと他のタンパク修飾システムとのクロストークを検討したところ、スモ化システムとユビキチン化システムがクロストークすることを見出した。そこで次に、ユビキチン化システムの歯周組織再生への役割を検討したところ、ユビキチン化システム阻害剤ボルテゾミブは、Wntシグナルを介して歯根膜細胞の石灰化誘導を促進させること、BMP-2誘導性の歯根膜細胞の石灰化誘導を相乗的に促進させることを明らかにした。以上のことから、ボルテゾミブは、歯周組織再生に有効な化合物であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify the effects of sumoylation, which is one of the protein modification systems, on periodontal regeneration therapy. We identified the crosstalk between sumoylation and other protein modification systems ubiquitination. Therefore, we analyzed the role of ubiquitination on cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells. Bortezomib, one of the proteasome inhibitors, clearly induced the cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells through induction of Wnt signaling. Moreover, bortezomib enhanced the BMP-2-induced cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells. These data indicates that bortezomib might be an useful compound for periodontal regeneration therapy.

研究分野：歯周再生医学

キーワード：スモ化システム ユビキチン化システム 歯周組織再生 ボルテゾミブ 歯根膜細胞 Wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

歯周病の進行に伴い失われた歯周組織を元の形態に回復させることは、歯周治療学における最終目標の一つである。そのため、有効かつ安全な新規歯周組織再生医療の確立は、依然として喫緊の重要研究課題として残されている。

2000年のヒトゲノム解読終了後、ゲノム解読の時代からポストゲノムの時代へと突入している。その中で、mRNAが翻訳されタンパクが生成される過程で、タンパク質の発現調節を司る新しい翻訳後修飾システムの概念が提唱され、ユビキチン化、スモ化、アセチル化などの単一アミノ基修飾システムが、タンパク修飾システムの代表として挙げられるようになった。

その中で、スモ化システムは近年見出されたタンパク修飾システムの一つである。すなわち小分子スモが標的タンパクに結合することにより、そのタンパクの機能を調節するシステムである。スモ化システムの機能は、転写制御、アポトーシス、細胞周期、タンパクの細胞内局在ならびに分解の調節などを司ることが知られている。

このようにスモ化システムの機能は多岐にわたるにもかかわらず、スモ化システムの硬組織・歯周組織代謝への関わりを報告するような研究は全くなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、スモ化システムと他のタンパク修飾システムのクロストークを検討すると同時に、スモ化システムを中心とした、タンパク修飾システムの骨代謝ならびに歯周組織再生における役割を細胞生物学、分子生物学を軸とした *in vitro* にて解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) スモ化システムと他のタンパク修飾システムのクロストークの検討

スモ化システムとタンパク質の翻訳後修飾システムの一つであるユビキチン化システムとのクロストークを検討することを目的として、HA-ubiquitinならびに pyo-sumo1 を Lipofectamine 2000 を用いて過剰発現させたヒト子宮頸ガン細胞株 HeLa 細胞に、スモ化システム調節遺伝子 Gam1 を共発現させ、HA-ubiquitin ならびに pyo-sumo1 の発現をウエスタンブロットングにより検討した。

(2) タンパク修飾システムの歯根膜細胞の増殖・分化に対する効果の検討

実験には、本研究室で樹立されたマウス歯根膜細胞株 MPDL22 (Yamada S et al., J Biol Chem, 2007)、ならびにヒト歯根膜細胞株 HPDL を供した。

スモ化システムとのクロストークが認められたユビキチン化システムの歯根膜細胞の増殖・分化に対する効果を検討するために、ユビキチン化システム阻害剤ボルテゾミブを用いた。

歯根膜細胞における、ボルテゾミブの細胞増殖に対する効果ならびに細胞毒性の検討には、WST-1 アッセイならびにトリパンブルー染色を用いた。ボルテゾミブの歯根膜細胞におけるタンパク質分解抑制効果を検討するために、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロットングを行った。ボルテゾミブの歯根膜細胞の分化に対する効果の検討には、歯根膜細胞を石灰化誘導培地 (α MEM 培地に、 β グリセロリン酸 5 mM とアスコルビン酸 50 μ g/ml を添加) にて長期培養し、アルカリフォスファターゼ (ALPase)、骨関連タンパク質 (BSP、オステオポンチン)、骨分化の指標となる転写因子 (Runx2) の発現をリアルタイム PCR にて、石灰化ノジュール形成をアリザリンレッド染色にて検討した。

(3) ユビキチン化システムの歯根膜細胞分化誘導メカニズムの解析

ボルテゾミブによる Wnt シグナルの制御機構を検討するために、Wnt シグナル下流因子 β -カテニンの発現をウエスタンブロットングにより検討した。また、Wnt シグナルのターゲット遺伝子である BMP-2 の発現をリアルタイム PCR により検討した。

4. 研究成果

(1) スモ化システムと他のタンパク修飾システムのクロストークの検討

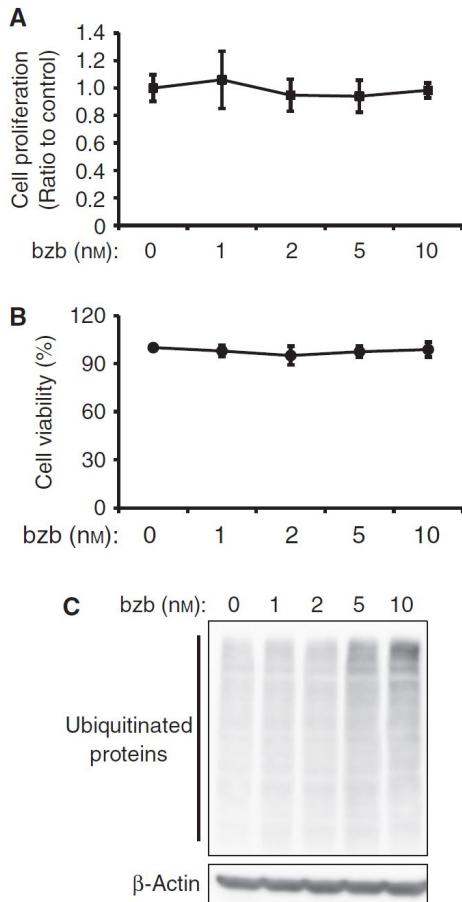
スモ化システムとユビキチン化システムのクロストークを検討するために、pyo-sumo1 ならびに HA-ubiquitin を過剰発現させた後に、スモ化システム調節遺伝子 Gam1 を共発現させた。その結果、Gam1 遺伝子は pyo-sumo1 の発現を減少させたのに対し、Gam1 遺伝子は HA-ubiquitin の発現を著しく上昇させた。このように、Gam1 遺伝子によりスモ化を抑制させると、ユビキチン化システムが著しく上昇することから、スモ化システムとユビキチン化システムがクロストークしていることが明らかとなった。

(2) ユビキチン化システムの歯根膜細胞の増殖・分化に対する効果の検討

スモ化システムとユビキチン化システムのクロストークが明らかとなったため、次にユビキチン化システムの歯根膜細胞の増殖・分化に対する効果を検討した。MPDL22 にユビキチン化システム阻害剤ボルテゾミブを添加し、ボルテゾミブの細胞増殖に対する影響ならびに細胞毒性を WST-1 アッセイならびにトリパンブルー染色により検討した。その結果、濃度 10 nM まではボルテゾミブは培養細胞の増殖に影響を及ぼさず、細胞

毒性も認めなかった(図1-A, B)。

ボルテゾミブの標的タンパク質の分解抑制効果について検討したところ、ボルテゾミブは濃度依存的に標的タンパク質を蓄積させた(図1-C)。以上のことから、ボルテゾミブ 10 nM を至適濃度として、以下の実験を行うこととした。



(図1) 歯根膜細胞におけるボルテゾミブの細胞増殖に対する効果ならびに細胞毒性の検討

(A, B) MPDL22 に 1-10 nM のボルテゾミブを添加し、24 時間培養後、ボルテゾミブの MPDL22 の細胞増殖に対する効果ならびに細胞毒性を WST-1 アッセイ (A) ならびにトリパンプルー染色 (B) を用いて検討した。

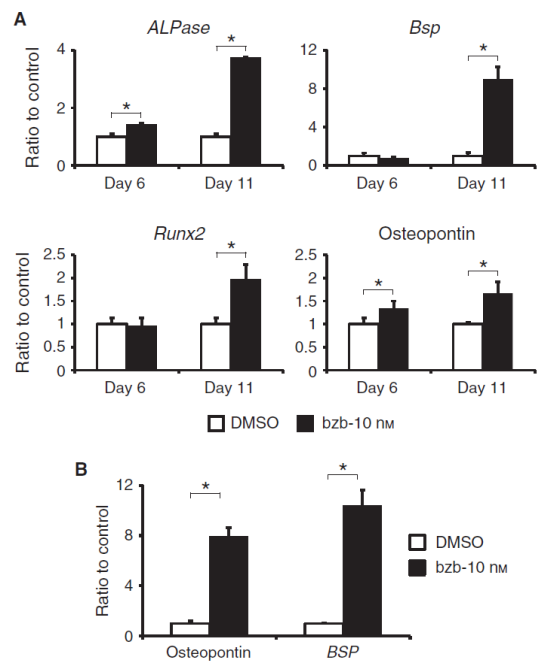
(C) MPDL22 に 1-10 nM のボルテゾミブを添加した。5 日間培養後、ボルテゾミブの MPDL22 における標的タンパク分解抑制効果を、抗ユビキチン抗体ならびに抗 β -アクチン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検討した。(bzb: ボルテゾミブ)

(3) ボルテゾミブの歯根膜細胞分化に対する効果の検討

次に、ボルテゾミブの歯根膜細胞の分化に対する効果を検討するために、MPDL22 にボルテゾミブを添加し、アルカリフォスファターゼ (ALPase)、骨関連タンパク質 (BSP、オステオポンチン)、骨分化の指標となる転写因子 (Runx2) の発現をリアルタイム PCR にて検討した。その結果、ボルテゾミブは

ALPase、BSP、オステオポンチン、Runx2 の発現を上昇させた(図2-A)。さらに、ボルテゾミブの歯根膜細胞の分化に対する効果を確認するために、ヒト歯根膜細胞 HPDL を用いて同様の実験を行ったところ、ボルテゾミブは HPDL においても BSP とオステオポンチンの発現を上昇させた(図2-B)。

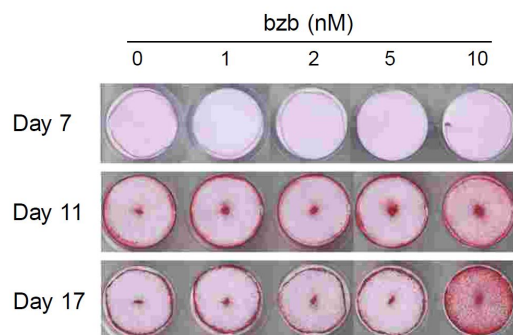
ボルテゾミブの歯根膜細胞における石灰化ノジュール形成能を検討するために、アリザリンレッド染色を行ったところ、ボルテゾミブは濃度依存的に、MPDL22 の石灰化ノジュール形成を促進させることが明らかとなった(図3)。以上のことから、ボルテゾミブは歯根膜細胞の分化を促進させることが明らかとなった。



(図2) ボルテゾミブの歯根膜細胞の分化に対する効果の検討

(A) MPDL22 に 10 nM のボルテゾミブを添加し、6、11 日間培養後、ボルテゾミブの ALPase、BSP、オステオポンチン、Runx2 の発現に対する効果を、リアルタイム PCR を用いて検討した。(*: $p < 0.05$)

(B) HPDL に 10 nM のボルテゾミブを添加し、25 日間培養後、ボルテゾミブの BSP、オステオポンチンの発現に対する効果を、リアルタイム PCR を用いて検討した。(*: $p < 0.05$)



(図3) ボルテゾミブの歯根膜細胞の石灰化

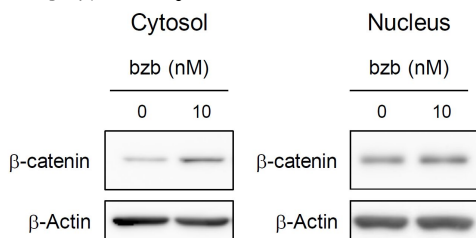
に対する効果の検討

MPDL22 に 1-10 nM のボルテゾミブを添加し、7、11、17 日間培養後、ボルテゾミブの石灰化ノジュール形成に対する効果をアリザリンレッド染色により検討した。

(4) ボルテゾミブの歯根膜細胞分化誘導メカニズムの検討

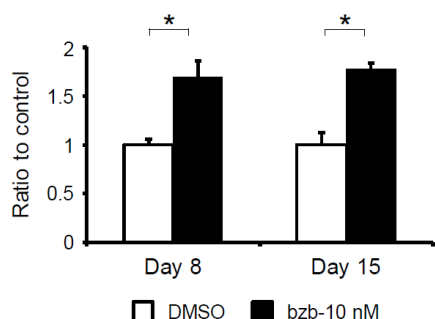
Wnt シグナルは、骨芽細胞の石灰化調節を司っていること、さらには Wnt シグナルの下流因子β-カテニンがユビキチン化システムにより分解されることから、ボルテゾミブの歯根膜細胞の石灰化誘導に Wnt シグナルが関与していると推測した。そこで、歯根膜細胞においてボルテゾミブが Wnt シグナルを調節しているかを検討するために、歯根膜細胞にボルテゾミブを添加し、β-カテニンの発現を検討した。その結果、ボルテゾミブは核内ならびに細胞質内のβ-カテニンの発現を上昇させた(図4)。このことから、ボルテゾミブはβ-カテニンの分解を抑制することにより、Wnt シグナルを促進させることが示唆された。さらに、ボルテゾミブは Wnt シグナルのターゲット遺伝子で、硬組織形成を促進する BMP-2 の発現を上昇させた(図5)。

以上のことから、ボルテゾミブは、歯根膜細胞において、Wnt シグナルを活性化させることに伴い、BMP-2 の発現を誘導させることが明らかとなった。さらに、ボルテゾミブにより誘導された BMP-2 が、歯根膜細胞の分化を促進させることが明らかとなった。これらのことから、ボルテゾミブは歯周組織再生治療において有効な化合物の一つであることが示唆された。



(図4) ボルテゾミブの歯根膜細胞の石灰化誘導メカニズムの解析

MPDL22 に 10 nM のボルテゾミブを添加し、5 日間培養後、核内ならびに細胞質内におけるβ-カテニンならびにβ-アクチンの発現を、抗β-カテニン抗体ならびに抗β-アクチン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検討した。



(図5) ボルテゾミブによる BMP-2 誘導能の検討

MPDL22 に 10 nM のボルテゾミブを添加し、8、15 日後に RNA を回収し、BMP-2 の発現を、リアルタイム PCR により検討した。
(*: p<0.05)

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2件)

J Kitagaki, S Miyauchi, C Xie, M Yamashita, S Yamada, M Kitamura, S Murakami.

Effects of proteasome inhibitor bortezomib on cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells

J Periodont Res, 2015;50(2):248-55.

doi: 10.1111/jre.12202.

(査読有り)

J Kitagaki, G Shi, S Miyauchi, S Murakami, Y Yang

Cyclic depsipeptides as potential cancer therapeutics

Anticancer Drugs, 2015;26(3):259-71.

doi: 10.1097/CAD.000000000000183.

(査読有り)

[学会発表](計4件)

北垣次郎太、謝成婕、中村友美、栗田敏仁、森健太、久保田実木子、阪下裕美、山本智美、池上久仁子、小笹匡雄、竹立匡秀、柳田学、山下元三、山田聡、村上伸也

プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの歯根膜細胞の石灰化制御

第138回 日本歯科保存学会 2013年度 春季学術大会

福岡国際会議場(福岡)

2013年6月27日

JC Xie, J Kitagaki, S Miyauchi, M Yamashita, S Yamada, M Kitamura, S Murakami

Role of proteasome inhibitor bortezomib on periodontal ligament cell differentiation

2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region

Plaza Athenee (Bangkok, Thailand)

Aug/21/2013

J Kitagaki, S Miyauchi, M Yamashita, S Yamada, M Kitamura, S Murakami

Effects of proteasome inhibitor bortezomib on cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells

2014 Kyungpook-Osaka University International Symposium

Kyungpook National University School of
Dentistry (Daegu, Korea)
May/16/2014

S Miyauchi, J Kitagaki, M Yamashita, Y
Yamada, M Kitamura, S Murakami.

Effects of proteasome inhibitor bortezomib
on periodontal ligament cell differentiation
62nd Japanese Association of Dental
Research

KKR ホテル大阪 (大阪)

2014年12月4日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北垣 次郎太 (Kitagaki, Jirouta)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号 : 90570292