

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861595

研究課題名(和文) インテグリン結合RGD配列の近傍切断によるシグナル増強と歯髄組織創傷治癒誘導

研究課題名(英文) The cleavage of peptide bond close to the RGD domain enhances integrin-mediated signaling and induces the wound healing of dental pulp tissue

研究代表者

鈴木 茂樹 (Suzuki, Shigeki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：30549762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、硬組織細胞外基質に存在するインテグリン結合配列RGD motifを持つタンパク質が、骨においてはリモデリングにより、歯牙においてはう蝕や酸蝕による脱灰により溶出し、歯髄、象牙芽、骨芽細胞膜状のインテグリン受容体を刺激し、細胞接着、増殖、遊走、分化等を誘導することで組織の創傷治癒・再生に寄与している可能性を検討することである。我々は、歯髄・象牙質細胞外基質タンパクであるDPPが、そのRGD motif近傍で切断を受けると、細胞刺激活性が大きく上昇することを見出した。さらにADAMsやCathepsin群に属するプロテアーゼがin vitroにおいてDPPを切断することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Hard tissues such as bone and teeth contain abundant non-collagenous proteins. Some of them contain the RGD motif, which is the ligand of integrin receptors. It has been thought that these proteins are exposed during bone remodeling and tooth decalcification by caries or tooth wear diseases. Exposed proteins then stimulate the cellular adhesion, proliferation, migration, and differentiation of neighbouring cells such as osteoblasts, dental pulp cells, and odontoblasts to induce tissue wound healing and regeneration. In this study, we found that DPP, which is the most abundant RGD-containing proteins in dentin, possessed potent cell-stimulating ability when the peptide bond close to the RGD motif was cleaved. Some of the proteases belong to the ADAMs and Cathepsin family were able to cleave DPP in vitro. We are still investigating whether these proteases are responsible for cleavage-dependent strong capacity of DPP RGD.

研究分野：歯学

キーワード：歯髄 DSPP インテグリン

1. 研究開始当初の背景

インテグリンは我々体内のほぼ全ての細胞が発現しており、 α と β 鎖2本のサブユニット鎖のヘテロ2量体からなり、 α と β 鎖それぞれ異なったタイプが存在し、その組み合わせから20種類以上のインテグリンがこれまでに同定されている。象牙質、歯髄組織、骨の細胞外基質は主に Type I collagen からなるが、我々がこれまで着目してきた Dentin phosphophoryn (DPP) の他、Dentin matrix protein-1 (DMP-1), Bone sialoprotein (BSP), Osteopontin(OPN), Fibronectin などの非コラーゲンタンパク質も多数存在し、組織の恒常性維持や再生時の細胞刺激因子としての役割を担っている。これら細胞外基質タンパク質はインテグリン結合配列 RGD motif (アルギニン-グリシン-アスパラギン酸: Arg-Gly-Asp) を持ち、インテグリンを介して細胞周囲環境の変化を細胞に伝達し、細胞の接着、増殖、分化、遊走等を制御している。これまで、様々な細胞外基質の組み換えタンパク質を、骨再生や直接覆髄時の歯髄組織再生等に应用するための基礎的研究が進められているものの、増殖因子と比較すると、スキャフォールドとしての有意性はあるが、細胞刺激因子としての活性が弱く臨床応用には至っていない。また、細胞外基質タンパク質は分泌された後に Matrix metalloproteinases (MMPs) などの細胞外プロテアーゼによる切断・分解により活性型になることが癌研究等で明らかにされている。我々は最近、DPP の細胞刺激活性が RGD motif 近傍の特定アミノ酸部位での切断で増強されることを見出した。そこでこの切断部位および責任プロテアーゼを同定し、その組み換えタンパク質を作製・応用することで、DPP を含めた RGD motif を持つ細胞外基質タンパク質の細胞刺激因子としての潜在的な活性の増強を利用した、歯髄や象牙質及び骨の創傷治癒及び再生誘導材の開発が現実的期待を持てるものとなる。

2. 研究の目的

象牙質や骨といった硬組織細胞外基質には、インテグリン結合配列 RGD motif (アルギニン-グリシン-アスパラギン酸: Arg-Gly-Asp) を持つタンパク質が存在し、歯髄、象牙芽、骨芽細胞膜上のインテグリン受容体を介し、細胞接着、増殖、遊走、分化等を誘導し、組織の創傷治癒・再生に寄与している。我々は、歯髄・象牙質細胞外基質タンパクである Dentin phosphophoryn (DPP) が、その RGD motif 近傍で切断を受けると、DPP による細胞刺激活性が大きく上昇することを見出した。そこで本研究では、1. この切断を担うプロテアーゼの同定、2. 同定したプロテアーゼが DPP 以外の細胞外基質中の RGD motif 近傍を切断し得るか、3. それら細胞外基質

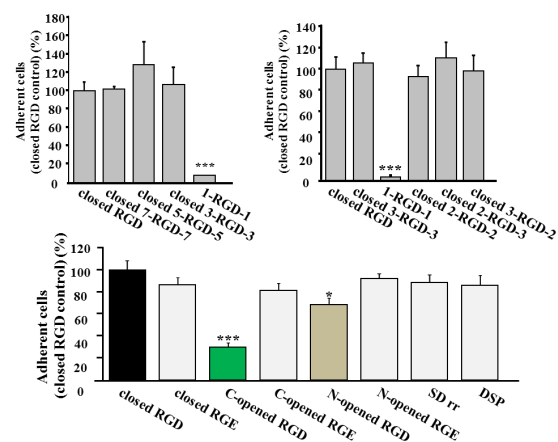
の細胞刺激活性を増強し得るかを明らかにすることで、新規に同定されたプロテアーゼを、歯冠破折後の歯髄組織創傷治癒誘導や将来的な歯髄組織再生療法に応用し得るかを検討することを目的としている。

3. 研究の方法

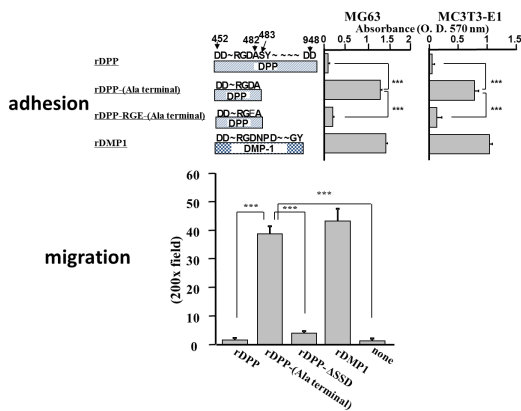
RGD motif 近傍切断による活性上昇と責任プロテアーゼの探索 これまでの実験結果から、DPP は RGD motif 近傍のペプチド結合が切断されると、その生物活性が増強する。そこで、切断部位ごとの活性を引くし、さらに同定したプロテアーゼ切断部位を認識する責任プロテアーゼを同定する。同定したプロテアーゼによる DPP 切断の有無の検討 同定したプロテアーゼによる DPP 切断活性を検討するため、各プロテアーゼと DPP を至適条件で反応させ切断の有無を Stains all によるゲル染色で検討する。また新規性が高く活性を持つ組み換えタンパクが購入できない際は DPP 同様の哺乳類細胞組み換えタンパク産生系での作成およびその活性検討を行う。新規同定プロテアーゼが歯髄細胞の接着、増殖、分化、遊走に及ぼす影響の検討 切断型 DPP および非切断型 DPP の細胞刺激因子としての活性を同様の方法で作製した組み換え DMP-1 を用いて比較検討する。

4. 研究成果

まず、DPP の RGD 近傍のどの peptide bond の切断が RGD 活性出現に必須である



かを明らかにするために、図 (PLoS One. (2014) Nov 14;9(11):e112490 より) に示すように各種 DPP RGD ペプチドにて MG63 細胞を前処理した後に、vitronectin コートウェルに播種し、各ペプチドの細胞接着阻害能を評価した結果、RGD に続く Ala-Ser bond における切断により DPP RGD の活性出現が起こることが明らかとなった。これは、Ala で切断された組み換えタンパク質 rDPP-(Ala terminal) (下図: (PLoS One. (2014) Nov 14;9(11):e112490 より)) が細胞接着や Haptotaxis migration を誘導することからも明らかとなった。そこで、次にペプチドデータベース MEROPS によ



る切断候補プロテアーゼの探索を行った。DPP RGD の 3' 側に存在する Ala-Ser bond 同様の Ala-Ser bond の切断が過去に報告されたことがあるプロテアーゼを探索した。MEROPS による検索で約 70 種類の候補プロテアーゼが同定された。その中で、歯髄組織などの結合組織に存在が報告されているプロテアーゼに着目すると、ADAMs (a disintegrin and metalloprotease) に属する ADAM-8, 9, 10, 19 が候補として同定された。これらプロテアーゼが DPP の Ala-Ser bond を切断しうるかを検討するためには活性を持つ組み換えタンパク質が必要であるため、DPP に用いた組み換えタンパク質作製と同様の方法でこれら ADAMs タンパク質を、哺乳類細胞を用いて作製することとした。これらプロテアーゼを組み換えタンパク質産生細胞の細胞上清中に分泌されるような発現ベクターを用いたが、産生細胞の増殖効率が総じて著しく低かった。ADAMs は高いプロテアーゼ活性を持つことから、分泌された組み換えプロテアーゼの量・活性が高いために細胞傷害性があると考えられた。そこで、産生細胞の培養上清中に可逆的な ADAMs の活性抑制剤を添加すると細胞の増殖が回復した。次に、この培養条件で細胞を培養し回収した上清から ADAMs 組み換えタンパク質の精製を行った。こうして得られた各 ADAMs 組み換えタンパク質と DPP を至適条件で反応させると、複数の ADAMs との反応で DPP の切断が Stains all 染色により認められた。現在その切断部位が想定された部位であるかの解析を行っている。さらに MEROPS による探索により ADAMs のみならず Cathepsin L, B, S, などの Cathepsin 群が候補として見出された。これらプロテアーゼの至適条件で DPP を切断すると、DPP 切断活性を持つものが見られた。しかしながら Cathepsin 群による切断において、分解後の DPP タンパクを Stains-all で検討すると、バンドが複数見られたことから Ala-Ser bond のみならず複数のサイトで切断されていることが示唆された。歯髄組織においていくつかの Cathepsin や ADAMs が発現していること

がすでに報告されているが、実際の歯髄組織内でこれらプロテアーゼによる DPP 切断が、その活性出現に寄与しているかは今後の検討課題である。

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 5 件)

1. Kobuke S, *Suzuki S, Hoshino H, Haruyama N, Nishimura F, Shiba, H Relationship between length variations in Ser/Asp-rich repeats in phosphophoryn and in vitro precipitation of calcium phosphate. Arch Oral Biol. 2015 Jun 6;60(9):1263-1272. 査読有り
2. Hunter DJ, Bardet C, Mouraret S, Suzuki S, Wnt Acts as a Pro-Survival Signal to Enhance Dentin Regeneration. J Bone Miner Res. 2015 Jul;30(7):1150-9. 16 年 12 番目 査読有り
3. *Suzuki S, Kobuke S, Haruyama N, Hoshino H, Kulkarni AB, and Nishimura F. Adhesive and migratory effects of phosphophoryn are modulated by flanking peptides of the integrin binding motif. PLoS One. (2014) Nov 14;9(11):e112490. 査読有り
4. *鈴木茂樹、永安慎太郎、星野博昭、小武家誠司、本山智得、西村英紀：Matrix trioxide aggregate (MTA) の歯髄細胞接着・増殖・アポトーシスに及ぼす効果の検討。日本歯科保存学会誌。57: 547-554, 2014. 査読有り
5. *鈴木茂樹 バイオリジカルな歯髄創傷治癒誘導-SIBLING ファミリー- 歯界展望 124:100-103, 2014. 査読無し

[学会発表](計 1 件)

招待講演 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 サテライトシンポジウム 12「Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) を形態と機能から考える」講演タイトル：改変型組み換え DPP タンパク質を利用した硬組織再生における有用性 鈴木茂樹, 2015 年 9 月 11 ~ 13 日, 朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)

[図書](計 0 件)

[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

6．研究組織

(1)研究代表者

鈴木 茂樹 (SUZUKI SHIGEKI)

広島大学・大学院医歯薬学保健学研究院・

助教

研究者番号：30549762

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：