

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K11032

研究課題名(和文) エナメル基質のロイシンリッチプロテインは破骨細胞分化に関わるか

研究課題名(英文) Is the leucine rich protein derived from enamel matrices concerned with osteoclastogenesis?

研究代表者

畠山 雄次 (Hatakeyama, Yuji)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：40302161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アメロジェニンはエナメル質基質タンパクであるが、破骨細胞分化を抑制すると報告されている。しかしその詳細な機序は不明である。そこでマウスアメロジェニンスプライシングアイソフォームの一つであるロイシンリッチアメロジェニンペプチド(LRAP)の破骨細胞分化に与える影響を検討した。化学合成LRAPは骨芽細胞増殖を抑制したが、アメロジェニン結合タンパクであるLAMP-1に対する抗体存在下ではコントロール群と有意な差が認められなかった。またLRAPは直接、破骨細胞分化に影響を与えなかったが、アメロジェニン結合タンパクGrp78は歯周組織分化とともに歯根膜細胞における発現が上昇する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでアメロジェニンの破骨細胞分化について詳細な機序を明らかにした知見は少ない。本研究はアメロジェニンのスプライシングアイソフォームの一つであるLRAPを化学合成により作成し、破骨細胞分化に与える影響について検討した。その結果、化学合成LRAPは直接破骨細胞分化に影響を与えないが、骨芽細胞の細胞動態に影響を与えたことは、LRAPの破骨細胞分化制御は骨芽細胞経路であるとともにLAMP-1が関与する可能性を新たに示唆した。さらに、歯周組織分化とともにGrp78の歯根膜細胞における発現上昇は、歯周組織におけるGrp78発現はLRAPによる破骨細胞分化制御に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Amelogenin is one of proteins of enamel matrices and may play a key role in the maintenance of periodontal tissues. It has been still unknown the mechanism of suppressing osteoclastogenesis with amelogenin. Our study shows that chemical synthesized LRAP, one of amelogenin splicing isoforms suppressed the osteoblast cell proliferation but there is no difference between the control and the presence of LAMP-1 antibody. LRPA have no apparent effect on osteoclastogenesis but the expression of Grp78, one of amelogenin binding protein, was increased in periodontal ligament cell during periodontal tissues development.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：アメロジェニン 破骨細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アメロジェニン(amelogenin)はエナメル質形成初期にみられるエナメルマトリックスプロテインの1つであるが、アメロジェニン遺伝子は9つのエクソンから構成され、いくつかのスプライシングアイソフォームが存在することが知られている。我々はアメロジェニンの異なるスプライシングアイソフォームの破骨細胞分化における機能の差異について以下のことを報告してきている。すなわち、エクソン4および6の一部欠如による leucine rich amelogenin peptide (LRAP)、およびエクソン4のみ欠如による M180 は歯根膜に発現している。また LRAP および M180 を含むすべてのスプライシングアイソフォームの発現が欠如したマウス(アメロジェニンノックアウトマウス)では、歯根膜における破骨細胞数が増加し歯根吸収が見られ、セメント芽細胞における receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)の発現が上昇していた。これらの破骨細胞分化制御に関して、我々はシグナル伝達因子としてのアメロジェニンについて検討してきた。その結果、次のことを報告、または知見を得た。in vitro において LRAP および M180 は歯根膜線維芽細胞および間葉細胞の増殖および細胞遊走を促進した。LRAP は歯根膜由来線維芽細胞と共培養の環境下で破骨細胞分化を抑制した。さらに Fmoc 基ペプチド固相合成法(Fmoc 固相合成法)によりリコンビナントマウス LRAP を作成し、軟骨細胞株 ATDC5 の細胞増殖を促進した。また、我々はアメロジェニンノックアウトマウスの歯根膜における破骨細胞の出現は、歯根完成と同時にみられることを見いだしている。さらに免疫組織学的検索により LAMP-1 は歯根形成開始から歯根完成まで継続して歯根膜に発現していることを報告した。これらのことは歯根膜組織に存在しているアメロジェニンスプライシングアイソフォーム、特に LRAP は RANKL の発現に関与し、破骨または破骨細胞分化または細胞動態を制御している可能性を示唆している。

### 2. 研究の目的

これまで、アメロジェニンスプライシングアイソフォームが間葉由来細胞にさまざまな機能を持つことが報告されているが、どのような作用機序でもって機能するかは明らかにされていない。さらにアメロジェニンスプライシングアイソフォームの間葉由来細胞による破骨細胞分化抑制機序は不明である。近年、LRAP が4回膜貫通型受容体 lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1) および LAMP3 と結合することが報告された。LAMP1 および LAMP3 はリソソームで産生され、細胞内では細胞内小胞として存在する。また LAMP1 および LAMP3 は細胞膜表面に移動しエンドサイトーシスに関与することが知られている。さらに2013年に Fukuda らにより小胞体中存在するタンパクである glucose-related protein 78 (Grp78/Bip)がアメロジェニン受容体である可能性を示唆している(Fukuda T, et al., PLoS One, 2013;8(10) e78129)。そこで本研究の目的は、LRAP による破骨細胞分化抑制は、LRAP が間葉由来細胞膜表面に存在する LAMP-1 および LAMP-3 に結合し、細胞内に取り込まれた LRAP によるとともに、同じくアメロジェニン受容体の報告がある Grp78 の関与を検討することである。

### 3. 研究の方法

- (1) 4週齢マウスの脛骨骨端を摘出しパラフォルムアルデヒド溶液にて固定、脱灰、およびパラフィン切片を作成した。パラフィン切片に LAMP1, LAMP3、および Grp78 の抗体を用いた免疫染色をおこなった。
- (2) マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞細胞増殖培地にて実験に供与できる細胞数まで増加後、LAMP1 に対する免疫染色、および化学合成 LRAP による細胞増殖能について検討した。細胞増殖能はホルマザン色素に対する吸光度を用いた。また LAMP1 抗体存在下における細胞増殖能を検討した。
- (3) 胎生15日齢マウス頭部および生後4週齢下顎骨を摘出し、パラフォルムアルデヒド溶液にて固定、脱灰、およびパラフィン切片を作成した。パラフィン切片に Grp78 の抗体を用いたを行った。
- (4) マウスマクロファージ由来 RAW264 細胞を可溶性 Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (sRANKL) 添加した水溶性溶媒添加群および LRAP 添加群に分けて培養し、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色により観察した。
- (5) マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて、無添加群、水溶性溶媒添加群、化学合成 LRAP 添加群に分けて培養し、それぞれの total mRNA を用いて RT-PCR 法により遺伝子発現を検討した。

### 4. 研究成果

- (1) 間葉由来細胞において LAMP1、LAMP3、および Grp78 の発現を検討した。その結果、H-E 染色で認められる新生骨上の骨芽細胞 (Fig.A, arrow) にそれぞれの抗体陽性反応が認められたが、LAMP3 (Fig.C) の反応は LAMP1 (Fig.B) および Grp78 (Fig.D) と比較して弱かった。これらのことは破骨細胞分化に重要な役割を果たす RANKL は骨芽細胞に発現が認められるが、生体

の骨芽細胞においてアメリロジェニン結合タンパクが発現している可能性が示唆しており、骨芽細胞はアメリロジェニンによる破骨細胞分化制御に関与しうる可能性が示唆された。

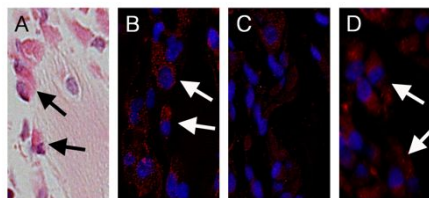
- (2)骨芽細胞株における LAMP1 の発現および LRAP による細胞増殖能を検討した結果、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞において、生体と同様に LAMP1 の発現が認められた(写真)。また、化学合成 LRAP 添加群 (csLRAP) ではコントロール群(Control)と比較して有意に細胞増殖を抑制したが、LAMP1 抗体添加群 (csLRAP+Ab) ではコントロール群 (Control) と比較して差は認められなかった。これらのことは LRAP は骨芽細胞増殖を制御するが、LAMP1 はその機序に関与する可能性を示唆された。

- (3)歯根膜組織に存在している LRAP は RANKL 発現に関与することから、歯周組織形成過程における Grp78 の発現を検討した。その結果、胎生 15 日齢マウスにおける歯小囊細胞 (Fig.A, asterisk) において Grp78 抗体に対する陽性反応は弱かった (Fig.B, asterisk)。一方、骨芽細胞 (Fig. A, arrowhead) は陽性反応が認められた (Fig.B, arrowhead)。4 週齢マウスの歯根膜 (Fig.C, double arrowhead) において、Grp78 の抗体に対する陽性反応が認められた (Fig.D, double arrowhead)。これらのことは歯根膜細胞の分化とともにアメリロジェニン結合タンパクの一つである Grp78 の発現が上昇する可能性を示唆している。

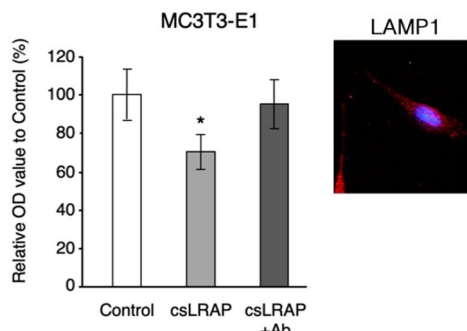
- (4)RAW264 細胞を用いて化学合成 LRAP の破骨細胞分化に与える影響を検討した。その結果、sRANKL を添加した水溶性溶媒添加群 (Fig. A) では、TRAP 染色陽性反応が認められる多核細胞が出現した。また化学合成 LRAP (csLRAP) 添加群においても同様に TRAP 陽性多核細胞が認められたが (Fig.B)、陽性細胞数に差は認められなかった。このことは化学合成 LRAP は破骨細胞分化に直接影響を与えない可能性が示唆された。

- (5)化学合成 LRAP の骨芽細胞の RANKL 発現に与える影響について検討した。その結果、化学合成 LRAP 添加群 (csLRAP) では、水溶性溶媒添加群 (Carrier Control) と比較して RANKL 遺伝子発現が減少し、無添加群 (Control) と同レベルの遺伝子発現だった。このことは、化学合成 LRAP は骨芽細胞を介した破骨細胞分化に関与する可能性が示唆された。

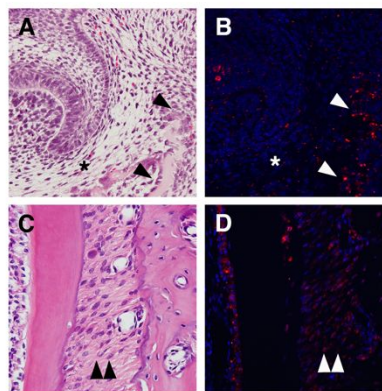
研究成果(1)



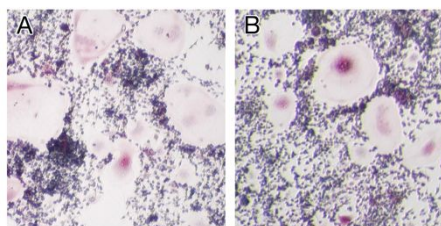
研究成果(2)



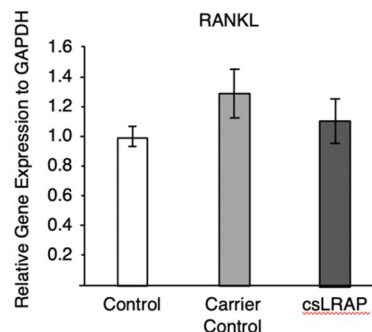
研究成果(3)



研究成果(4)



研究成果(5)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Otaawa-Kamogashira N, Matsuda Y, Takezaki M, Hatakeyama Y, Tamaoki S, Ishikawa H	4. 巻 37(2)
2. 論文標題 Immunohistochemical study of amelogenin binding proteins in an amelogenin point mutation mouse.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Morphol.	6. 最初と最後の頁 522-532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Y, Hatakeyama Y, Nakashima K, Kamogashira N, Hatakeyama J, Tamaoki S, Sawa Y, Ishikawa H	4. 巻 26(1)
2. 論文標題 Effects of chemically synthesized Leucine-Rich Amelogenin Peptide (csLRAP) on chondrogenic and osteogenic cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 51-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Y, Kamogashira N, Hatakeyama Y, Mikami T, Nakashima K, Hatakeyama J, Tamaoki S, Sawa Y, Ishikawa H	4. 巻 2(1)
2. 論文標題 Distinct Role of Transforming Growth Factor-Beta 1 and Fibroblast Growth Factors in Human Ameloblastoma Epithelial Cell Proliferation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11648/j.bmb.20170201.11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田裕子、鴨頭奈央子、畠山雄次、沢禎彦、玉置幸雄、石川博之
2. 発表標題 化学合成ロイシンリッチアメロジェニンペプチドの 骨芽細胞および軟骨細胞動態に与える影響
3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鴨頭奈央子、松田裕子、畠山雄次、石川博之
2. 発表標題 アメリゲニン変異マウスのエナメル芽細胞分化過程におけるLAMP-1局在の組織学的検討
3. 学会等名 第44回福岡歯科大学総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 畠山雄次、畠山純子、岡暁子、稲井哲一朗、沢禎彦
2. 発表標題 歯周組織形成過程における Lysosome-associated membrane proteins (LAMPs)の免疫組織学的局在の検討
3. 学会等名 第23回日本歯科医学総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松田裕子、畠山雄次、中島一記、鴨頭奈央子、畠山純子、玉置幸雄、沢禎彦、石川博之
2. 発表標題 LAMP1は化学合成されたロイシンリッチアメリゲニンペプチドの骨芽細胞分化に関与する。
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松田裕子、畠山雄次、中島一記、鴨頭奈央子、畠山純子、沢禎彦、石川博之
2. 発表標題 ペプチド固相合成法(F-moc法)により作製されたLRAPの軟骨および骨形成に与える影響
3. 学会等名 第57回歯科基礎医学会
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----