

令和元年6月19日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11815

研究課題名(和文) 副甲状腺ホルモン受容体の歯槽骨における作用機序と歯の萌出機構解明

研究課題名(英文) Analysis of the rule of the parathyroid hormone receptor in alveolar bone and tooth eruption

研究代表者

下村 淳子 (Shimomura, Junko)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：00386286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン・副甲状腺ホルモン関連ペプチドの受容体(以下PTH1R)は骨代謝だけでなく、歯の萌出に重要な役割を持つ。本研究では、Jansen型PTH1Rの分子病理について解明し、歯槽骨におけるPTH1Rの作用を解明するとともに、PTH1Rの関与する歯の萌出機構を明らかにすることを目的とした。本研究の結果、変異型PTH1Rの機能異常は、野生型PTH1Rと構造上の違い、およびその細胞内局在が異なることに起因し、タンパク質の糖鎖修飾の相違がその原因であると考えられた。さらに、この機能異常により、*in vivo*において軟骨内及び膜内骨化異常が生じ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

申請者は小児歯科医であり、歯科臨床においては、骨・軟骨異常に伴い顎顔面や口腔内にも歯の萌出異常を含め、様々な異常を生じる疾患と遭遇する機会がある。これら骨・軟骨異常疾患を持つ患者への歯科的な対応としては、今のところ対症的治療しか行えない現実があるため、その度に少しでも苦痛を軽減させてあげられるような処置(特に対象が低年齢児であるほど)ができないものか考えさせられる。本研究により局所的な遺伝子治療、あるいは軟骨細胞や骨芽細胞を用いたテイスチュエンジニアリング等の応用が将来的に期待できるという学術的意義、さらに局所治療薬等の開発に役立つ情報が得られる社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Parathyroid hormone (PTH) and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), and its receptor (PTH1R) play an important role not only in differentiation of bone and cartilage in the developing stages, also in tooth eruption. In this study, we have attempted to examine skeletal and alveolar bone abnormalities in Jansen type metaphyseal cartilage dysplasia. From this research, functional abnormality of Jansen type PTH1R appears to be due to their abnormal intracellular localization, presumably caused by the altered molecular structures different from wild type PTH1R. Furthermore, it is suggested that this functional abnormality may cause intrachondral and intramural ossification abnormalities *in vivo*.

研究分野：小児歯科学

キーワード：点突然変異 歯槽骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の正常な萌出には、歯胚形成に呼応した歯周組織と歯槽骨の改変が必須であり、組織学的に基質改変機構が重要となる。申請者は、これまでに正常な骨改造やメカニカルストレスに対する破骨細胞の活性機序、ならびに骨芽細胞の機能調節や細胞分化における研究を進めてきた (Shimomura et al., J Cell Science, 2007; J Cell Physiol, 2003; J Bone Miner Res, 2001)。また、高代謝回転型の骨改造を示すオステオプロテジェリン(OPG: osteoprotegerin)欠損マウスにおける骨基質の微細構造的解析(Shimomura et al., J Bone Miner Metab, 2005; J Electron Microscopy, 2003)を行うなど、骨の細胞機能と局所的な基質改変に関する一貫した研究を行ってきた。

他方、歯科臨床的には、全身性疾患に付随する歯の萌出異常、すなわち、顎骨の骨改造異常に伴う歯の萌出遅延や形成異常が深刻な問題となる。特に、PTH1R (Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor) 遺伝子変異は、以前の研究から骨・軟骨異形成症を発症させることが明らかにされている (New Engl J Med, 1996; Science, 1995)。骨・軟骨異形成症は口腔や顔面組織においても歯の萌出異常を誘導すること、さらに、PTHrP 欠損マウスが歯の形成・萌出異常を招くことから、これら変異型 PTH1R のシグナリング経路と細胞分化異常を解明することは、学術的・臨床的に重要と考えられる。申請者はこれまでに、「Blomstrand 型骨・軟骨異形成症を発症させる変異型 PTH1R タンパクの細胞内局在とシグナリング経路の解析」(平成 17, 18 年度・科学研究費補助金)において、Blomstrand 型骨・軟骨異形成症の骨格異常が単にリガンド・受容体の結合能の欠如ばかりでなく、受容体タンパクの局在異常にも起因する可能性を見いだした(Shimomura et al., Biomedical Research, 2008)。さらに、type II collagen promoter/enhancer cassette に PTH1R 遺伝子を組み込んだ vector を構築し、野生型および Blomstrand 型 PTH1R トランスジェニックマウスを作製し、その研究成果を報告してきた(下村 黒木他, 小児歯科学会, 2010)。また平成 23-25 年度・科学研究費補助金(若手研究 B)にて、Jansen 型骨幹端軟骨異形成症の原因となる変異型 PTH1R を組み込んだ発現ベクター (PTH1R^{H223R}) を作製し、*in vitro* の系において野生型 PTH1R と PTH1R^{H223R} では糖鎖修飾に何らかの違いがあること、また PTH1R が dimer を形成する性質をもつ可能性を示した (Shimomura-Kuroki J, et al., Odontology, 2017)。

このような研究成果をふまえて、申請者は本研究をさらに発展させることと起した。本研究では、dentin matrix protein 1 (DMP1) promoter/enhancer cassette に PTH1R^{H223R} を組み込んだトランスジェニックマウス (以下 TG マウス) を作製する構想・準備を行った。このマウスを用い、軟骨・骨細胞、および歯槽骨における変異型 PTH1R の機能を解析した。その結果とこれまでに得られた Blomstrand 型骨・軟骨異形成症と Jansen 型骨幹端軟骨異形成症の分子病理的知見と統合することにより、PTH1R の関与する歯の萌出機構が総合的に解明できると考える。

2. 研究の目的

副甲状腺ホルモン(PTH)・副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)の受容体(以下 PTH1R)は骨代謝だけではなく、歯の萌出に重要な役割を持つ。本研究は、Jansen 型変異 PTH1R の分子病理、すなわちその誘導シグナリング経路と骨形成系細胞の分化に対する異常について解明するものである。これにより、歯槽骨における PTH1R の作用を解明するとともに、PTH1R の関与する歯の萌出機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DMP1 promoter/enhancer cassette に PTH1R^{H223R} 遺伝子を組み込んだ vector を作製した (図 1)

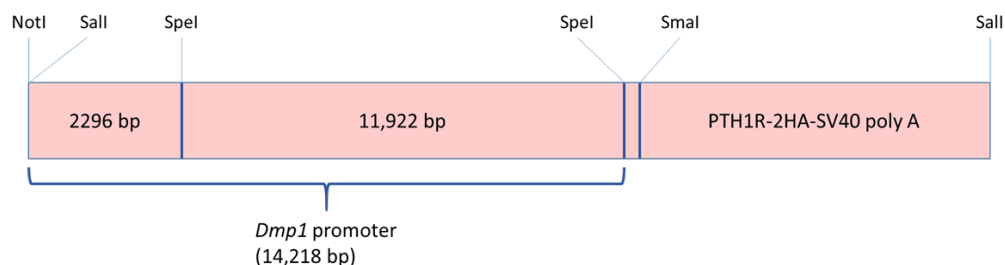


図 1: ベクター構築

Dmp1 promoter/enhancer 配列が組み込まれた pBlueScript に、PTH1R-2HA-SV40 polyA 配列を導入した。クローニング後、配列が正しいことをサンガー法にて確認した。

(2) 生後 3 日齢マウス頭蓋骨より採取した骨系細胞の primary culture に、作製したベクターを transfection し、一過性の発現を行い、免疫染色によりその機能を確認した。

(3) 採卵した受精卵に調整した DNA をインジェクション (顕鏡注入) し、インジェクションした受精卵を仮親の卵管に移植した。但し、この過程は専門技術を要するので、研究委託をした。

- (4) 胎生 18 日目で開腹により胎仔を得た後、尾からゲノムを抽出し、これを用いて、PCR 法により transgene が組み込まれたマウスをスクリーニングした。
 (5)胎仔は、4%PA で固定後、マイクロ CT 画像撮影を行った。その後、パラフィン包埋を行い、組織切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (H-E)染色による組織学的検討を行った。

4 . 研究成果

- (1) マウス骨系細胞の primary culture に、作製した PTH1R^{H223R} 発現ベクターを transfection し、anti-HA 抗体にて局在を確認したところ、野生型 PTH1R を強発現させた細胞では膜表面に発現を認めしたが、PTH1R^{H223R} を強発現させた細胞では膜表面への発現をほとんど認めなかった (図 2)。

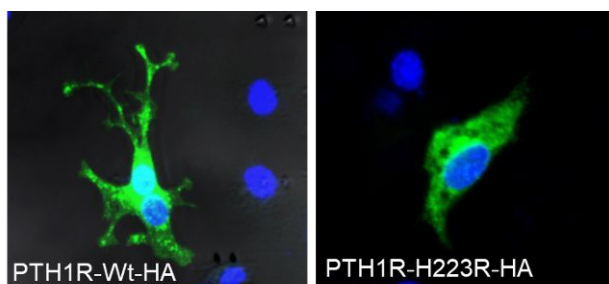


図 2 : anti-HA 抗体を用いた免疫染色

骨系細胞の primary culture での骨細胞特異的に発現するベクターの発現を免疫染色で確認したところ、野生型および変異型 PTH1R タンパクを共発現させた場合で、両者の局在の違いが認められた。

- (2) ジェノタイピングの結果、90 匹中 4 匹の TG 陽性マウスを得た。PCR によるジェノタイピングの結果を図 3 に示す。PTH1R^{H223R} 遺伝子が組み込まれた TG マウス胎仔の外観は Control のマウス胎仔と比較して四肢が短かった (図 4)。

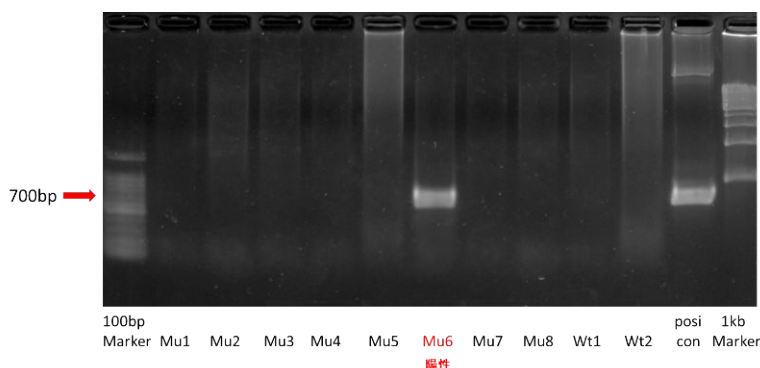


図 3 : ジェノタイピングの結果

700bp 付近に単一のバンドを認めた個体が遺伝子導入された TG マウスと判定した。

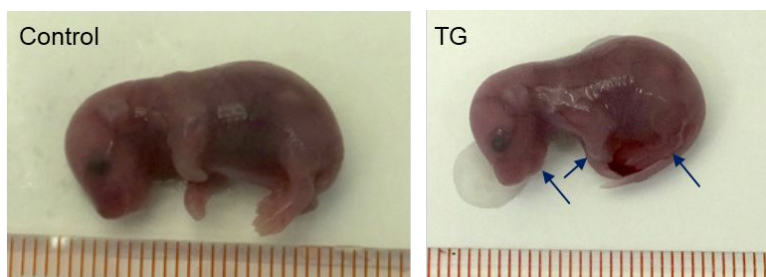


図 4 : 胎生 18 日齢マウス胎仔の表現系

TG マウスでは下顎の後退ならびに四肢の短縮が観察された (矢印)

- (3) マイクロ CT 画像解析 (TRI/BON 使用) を行ったところ、コントロールマウスと比較し、TG マウスでは頭蓋縫合部周囲の石灰化遅延を認めた (図 5-a,b)。

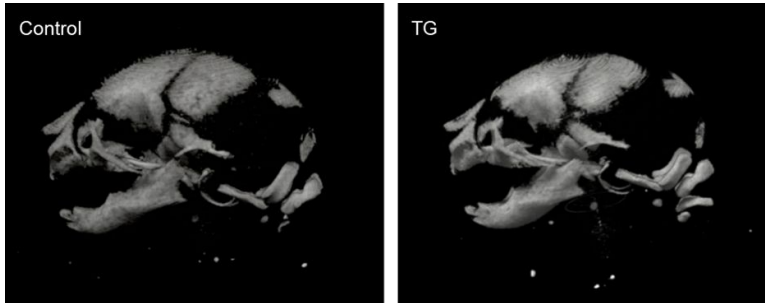


図 5-a : 頭蓋部 (側貌) のマイクロ CT 画像

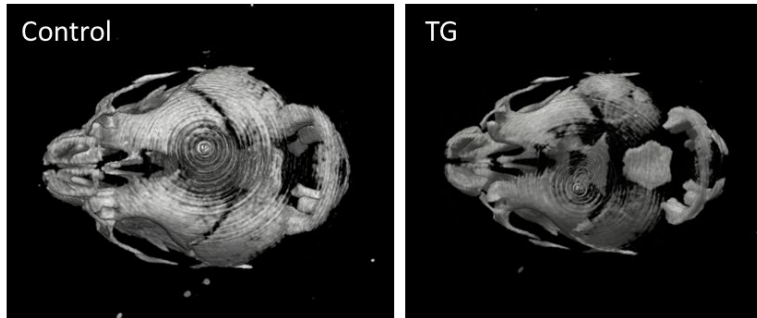


図 5-b : 頭蓋部 (頭頂方向) のマイクロ CT 画像

(4) 歯胚および周囲組織の H-E 染色による組織学的解析を行ったところ、コントロールマウスと比較し、TG マウスでは歯胚周囲歯槽骨の菲薄化 (矢印) を認めた (図 6)。

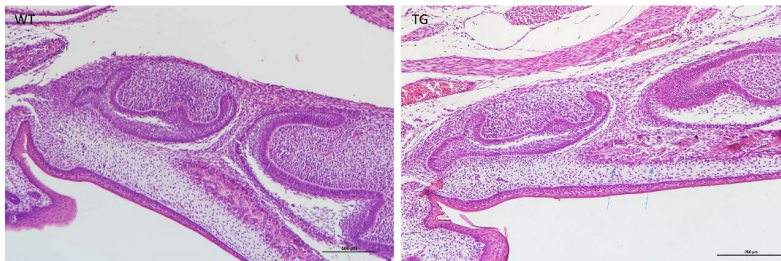


図 6 : 歯胚および周囲組織の H-E 染色像

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Hayashi-Sakai S, Sakamoto M, Hayashi T, Kondo T, Sugita K, Sakai J, Shimomura-Kuroki J, Ike M, Nikkuni Y, Nishiyama H: Evaluation of permanent and primary enamel and dentin mineral density using micro-computed tomography, *Oral Radiology*, 35: 29-34, 2019. doi.org/10.1007/s11282-018-0315-2. (査読有)

黒木淳子: わたしが守る・みんなで見守る子どものお口 , 小児の画像検査のポイント 口腔内写真・X線写真 , *Dental Diamond* , 43 巻 12 号 , 60-65 頁 , 2018 年 . (査読無)

Shimomura-Kuroki J*, Järvinen E*, Balic A*, Jussila M, Thesleff I: Mesenchymal Wnt/catenin signaling limits tooth number. *Development* 145: 1-12, 2018. dev158048, doi: 10.1242/dev.158048. (*Equal contribution) (査読有)

Nashida T, Shimomura-Kuroki J, Mizuhashi F, Haga-Tsujimura M, Yoshimura K, Hayashi-Sakai S., Presence of BPIFB1 in saliva from non-obese diabetic mice. *Odontology*, 106: 117-124, 2018. doi: 10.1007/s10266-017-0312-7. (査読有)

Shimomura-Kuroki S, Nashida T, Miyagawa Y, Sekimoto T, The Role of genetic factors in the outbreak mechanism of dental caries. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 42: 31-35, 2018, doi 10.17796/1053-4628-42.1.6. (査読有)

Shimomura-Kuroki J, Farooq M, Sekimoto T, Amizuka N, Shimomura Y. Characterization of a PTH1R missense mutation responsible for Jansen type metaphyseal chondrodysplasia. *Odontology*, 105:150-154, 2017, DOI 10.1007/s10266-016-0247-4. (査読有)

大野裕美, 下村 - 黒木淳子, なるほど! 工夫で解決できた日常臨床 保護者への対応法 保護者と歯科医師間の信頼関係を築く , *小児歯科臨床* , 22 巻 10 号 , 69-73 頁 , 2017 年 . (査読無)

下村 - 黒木淳子, 臨床の基礎編 - 後編 ~無痛治療を目指す~ 問診の取り方, 小児歯科臨床, 22 巻 8 号, 6-10 頁, 2017 年。(査読無)

坂井幸子, 坂本信, 林孝文, 坂井淳, 下村 - 黒木淳子, 梨田智子; マイクロ CT による脱落歯のミネラル密度評価 - 低フォスファターゼ症例への応用 -, 実験力学, 16(2): 122-126, 2016。(査読有)

Hayashi-Sakai S, Hayashi T, Sakamoto M, Sakai J, Shimomura-Kuroki J, Nishiyama H, Katsura K, Ike M, Nikkuni Y, Nakayama M, Soga M, Kobayashi T. Nondestructive Microcomputed Tomography Evaluation of Mineral Density in Exfoliated Teeth with Hypophosphatasia. Case Reports in Dentistry, Volume 2016, Article ID 4898456, 6 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4898456>。(査読有)

Nashida T, Yoshimura K, Yoshie S, Mizuhashi F, Shimomura-Kuroki J. Up-regulation of Bpifb1 expression in the parotid glands of non-obese diabetic mice. Oral Dis. 2016 Jan;22(1):46-52. doi: 10.1111/odi.12377。(査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

下村 - 黒木淳子, 梨田智子, 森田貴雄, 網塚憲生: 骨系細胞における Jansen 型 PTH/PTHrP 受容体の機能異常の解析, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018 年 9 月 7 日, 福岡市。

下村 - 黒木淳子, 梨田智子, 森田貴雄, 林 - 坂井幸子, 関本恒夫; 小児の唾液成分の RNA およびタンパク質解析による口腔疾患発症リスクの検討, 第 56 回日本小児歯科学会大会, 2018 年 5 月 11 日, 大阪市。

黒木淳子, 「おいしく食べるために」 - 小児歯科医の立場から -, 食育ボランティア研修会, 2017 年 12 月 1 日, 長岡市さいわいプラザ, 長岡市。

梨田智子, 森田貴雄, 水橋史, 下村-黒木淳子, 吉村建: マウス耳下腺における small membrane A-kinase anchoring protein (smAKAP) の発現。第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年 9 月 18 日, 松本歯科大学, 塩尻市。

梨田智子, 森田貴雄, 辻村麻衣子, 佐藤律子, 下村-黒木淳子, 吉村建: small membrane A-kinase anchoring protein (smAKAP) のマウス耳下腺における発現。第 58 回新潟生化学懇話会, 2017 年 6 月 24 日, 新潟大学, 新潟市。

黒木淳子, 美味しく食べるために 成長発育に応じた口の健康を食から考える, 長岡市歯科医師会, 長岡市健康課共催 『「歯」と「食」の健口ひろば』講演会, 2017 年 6 月 4 日, アオーレ長岡, 長岡市。

渥美信子, 馬場篤子, 下村 - 黒木淳子, 茂木瑞穂, 名生幸恵, 藤岡万里, 土岐志麻, 浜野美幸, 清水武彦, 朝田芳信, 井上美津子, 高野博子; 日本小児歯科学会大会における託児室利用状況 (第 1 報), 第 55 回日本小児歯科学会大会, 2017 年 5 月 25, 26 日, 北九州市。

下村 - 黒木淳子, 梨田智子, 島田路征, 林 - 坂井幸子, 関本恒夫; 小児の唾液流量とタンパク質解析によるバイオマーカーの検討, 2017 年, 第 55 回日本小児歯科学会大会, 2017 年 5 月 25, 26 日, 北九州市。

梨田智子, 水橋史, 下村 - 黒木淳子; 抗菌タンパク質 Bpifb1 の非肥満型糖尿病マウス唾液および口腔乾燥症患者唾液からの検出。平成 28 年度歯学会ウインターミーティング 2016 年 12 月 10 日, 日本歯科大学新潟生命歯学部, 新潟市。

佐藤律子, 梨田智子, 水橋史, 吉村建, 下村-黒木淳子; 2D-PAGE analysis of saliva from non-obese diabetic (NOD) mice and xerostomia patients, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年 8 月 26 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌市。

梨田智子, 辻村麻衣子, 吉村建, 下村-黒木淳子, 佐藤律子; NOD マウス耳下腺腺房細胞における aquaporin 5 と ezrin の局在変化, 第 57 回新潟生化学懇話会, 2016 年 6 月 25 日, 新潟。

Shimomura-Kuroki J, Järvinen E, Balic A, Jussila M, Thesleff I: Mesenchymal Wnt Signaling limits tooth numbers, The 12th Tooth Morphogenesis and Differentiation conference, 14-17th, June, 2016, Porvoo, Finland.

Shimomura-Kuroki J, Balic A, Jussila M, Thesleff I: Mesenchymal Wnt Signaling Inhibits Successional Tooth Formation, 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia in conjunction with 54th Annual Conference of the Japanese Society of Pediatric Dentistry, 27-28, May, 2016, Tokyo, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

関本恒夫, 黒木淳子: 第 9 章 小児への歯科的対応, 小児歯科学ベーシックテキスト第 2 版, p171-182, 永末書店, 2019.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ngt.ndu.ac.jp/guide/kouza/dental11.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中原 賢

ローマ字氏名：Ken Nakahara

所属研究機関名：日本歯科大学

部局名：新潟生命歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20610257

研究分担者氏名：梨田 智子

ローマ字氏名：Tomoko Nashida

所属研究機関名：日本歯科大学

部局名：新潟生命歯学部

職名：非常勤講師

研究者番号（8桁）：10133464

研究分担者氏名：下村 裕

ローマ字氏名：Yutaka Shimomura

所属研究機関名：山口大学

部局名：医学（系）研究科（研究院）

職名：教授

研究者番号（8桁）：70397107

(2)研究協力者

研究協力者氏名：網塚 憲生

ローマ字氏名：Norio Amizuka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。