

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20469

研究課題名(和文) 歯髄細胞のグリコームシフトに着目した修復象牙質形成機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of reparative dentin formation focusing on glycome-shift in human dental pulp cells

研究代表者

室町 幸一郎 (MUROMACHI, Koichiro)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50637072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、BMP-1存在下のヒト歯髄培養細胞においてlectin arrayによる網羅的解析から明らかになった糖鎖構造の変化すなわちグリコームシフトに焦点を当て検討を行い、細胞膜画分におけるN-acetylgalactosamine修飾が亢進する一方で、2,6-sialic acid修飾が減少することを明らかにした。以上の結果は、歯髄・象牙質複合体においてBMP-1がプロテアーゼとしてcollagenや象牙質特異的なタンパク質の成熟に関与するのみならず、細胞膜上のタンパク質の糖鎖修飾にも関与することを示唆しており、糖鎖を標的とした新規覆髄剤の開発に寄与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：BMP-1 has been well investigated as a catalytic enzyme of procollagen I-III and dentin-specific non-collagenous proteins; however, how BMP-1 affects cell surface molecules remains unclear. In this study, we focused on changes in glycan structure, ie, glycome-shift by BMP-1, which was clarified from a comprehensive analysis by lectin microarray in human dental pulp cells. We found that the N-acetylgalactosamine modification was slightly increased, while the 2,6-sialic acid modification was decreased in insoluble fractions from human dental pulp cells. These results suggest that BMP-1 is involved not only in the maturation of collagen and dentin-specific proteins as protease but also in glyco-alteration of membrane proteins in human dental pulp cells.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯髄 歯髄・象牙質複合体 BMP-1 糖鎖 グリコーム

1. 研究開始当初の背景

Bone morphogenetic protein (BMP) -1 は dentin sialophosphoprotein (DSPP) や dentin matrix protein-1 (DMP-1)、I 型 collagen の成熟に関与することで象牙質の基質形成に関与するメタロプロテアーゼであり、BMP-1 のコンディショナルノックアウトマウスでは象牙質の形成量が低下することが知られている。

研究代表者はこれまでの研究から、齲蝕罹患歯において象牙芽細胞様細胞および修復象牙質に BMP -1 の発現が亢進し、BMP-1 がヒト歯髄培養細胞において骨形成に関与する分泌タンパク質である CCN family member 2 / connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) の発現を促進することを明らかにしている。また CCN2/CTGF の発現は BMP-1 のプロテアーゼ活性非依存的に促進され、その際に BMP-1 が dynamin 依存性のエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれることも明らかにしている。

しかしながら、BMP-1 が細胞膜上のどのような分子と会合してこのような働きをするのかについては不明であった。

一方で網羅的な解析から、ヒト歯髄培養細胞において BMP-1 が細胞膜糖鎖プロファイリングに高い有意差をもって作用することを見出していた。細胞膜上のタンパク質の多くは翻訳後修飾により糖鎖が付加されており、細胞の分化度に応じて糖鎖構造の変化(グライコームシフト)を生じることが知られている。齲蝕などの病的な条件下で糖鎖構造にどのような変化が生じているかは未だ明らかでなく、BMP-1 がタンパク質の糖鎖修飾に関与するとの報告も見当たらない。

このことから、糖鎖修飾を指標として歯髄・象牙質複合体における BMP-1 の役割を評価するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト歯髄培養細胞において BMP-1 により変化する細胞膜タンパク質の糖鎖修飾の本態を明らかにするとともに、その機序を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 細胞培養：治療目的で抜歯予定の患者に研究のインフォームドコンセントを行い、同意を得た後に抜去された健全歯から歯髄を抽出したのち、3 代継代培養した細胞をヒト歯髄培養細胞として実験に用いた。なお本研究は神奈川歯科大学倫理委員会の承認を得て行った(承認番号：277)。

2) 細胞膜画分の抽出：recombinant human BMP-1 (500 ng/ml) で刺激したのちに、Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit を用いて細胞膜画分を抽出した。

3) Lectin-probed western blot：膜画分サンプルを SDS-PAGE にて展開後、ニトロセルロース膜へ転写し、N-acetylgalactosamine (GalNAc) 特異的に結合する lectin である Helix Pomatia agglutinin (HPA, HRP-conjugated) および α 2,6-sialic acid (α 2,6-Sia) 特異的に結合する lectin である Sambucus nigra agglutinin (SNA, HRP-conjugated) を用いて lectin blotting を行い糖鎖修飾の変化を確認した。

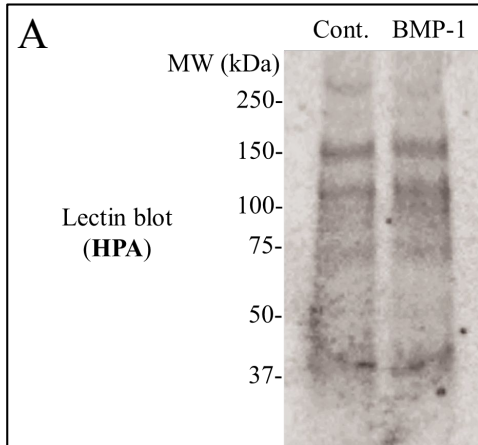
4) Sialidase 処理：末端 sialic acid 残基のグリコシド結合を特異的に加水分解する sialidase (α 2-3,6,8 neuraminidase) 処理を行った際のバンドシグナルの変化を検討した。

5) Real-time PCR：ヒト歯髄培養細胞を rhBMP-1 で刺激したのちに total RNA を抽出し、GalNAc の糖転移酵素である N-acetylgalactosaminyltransferase の 20 種類のアイソザイム、および α 2,6-Sia の糖転移酵素である α 2-6 sialyltransferases の 2 種類のアイソザイムの遺伝子発現の変化を検討した。

4. 研究成果

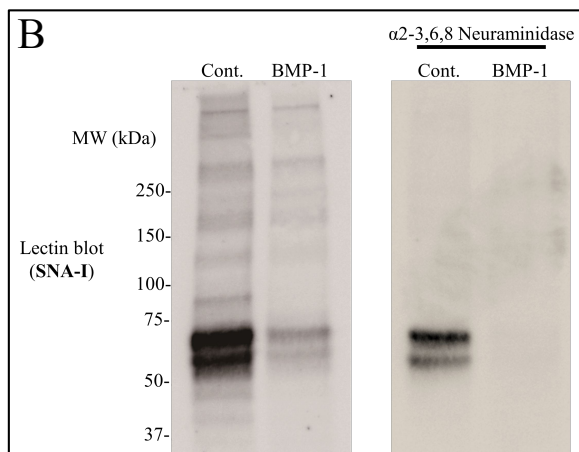
(1) BMP-1 による GalNAc 修飾の亢進

Control 群と比較して rhBMP-1 群のヒト歯髄培養細胞の膜画分において、GalNAc の発現がわずかに増加していることを確認した (図 A)。



(2) BMP-1 による α 2,6-Sia 修飾の減少

Control 群と比較して rhBMP-1 群のヒト歯髄培養細胞の膜画分において、 α 2,6-Sia の発現が減少していることを確認した。また、 α 2-3,6,8 neuraminidase 処理によってバンドシグナルが減少したことから、実際に α 2,6-Sia 修飾がバンドの本態であることを確認した (図 B)。



(3) 糖転移酵素の mRNA 発現の変化

GalNAc および α 2,6-Sia の糖転移酵素の遺伝子 GALNT-1, 2, 3, ..., 20 および ST6Gal-1, 2 の mRNA 発現を Control 群と rhBMP-1 群のヒト歯髄培養細胞において

検討したが、有意な結果は得られなかった。

以上の結果から、ヒト歯髄培養細胞の細胞膜において BMP-1 により GalNAc 修飾は亢進する一方で、 α 2,6-Sia 修飾は減少し、その調節は糖転移酵素の遺伝子発現に非依存的であることを明らかにした。

本研究は、修復象牙質形成に關与する BMP-1 がヒト歯髄の細胞において細胞膜上のタンパク質の糖鎖修飾にも影響をおよぼすことを見出した点で大きな意義を有している。加えて、糖鎖修飾が修復象牙質形成の指標になり得る可能性があり、新規覆髄剤の開発に寄与するものと考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

室町幸一郎, 石井信之: BMP-1 によるヒト歯髄培養細胞の α 2,6-シアル酸修飾の抑制. 第9回日本CCNファミリー研究会, 岡山, 2017年8月26日.

室町幸一郎, 石井信之: BMP-1 によるヒト歯髄培養細胞の mucin 様糖鎖修飾. 日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会(第145回), 長野, 2016年10月27-28日.

室町幸一郎, 石井信之: BMP-1 によるヒト歯髄培養細胞の糖鎖修飾. 第8回日本CCNファミリー研究会, 岡山, 2016年8月27日.

[図書](計 2 件)

Stephen Creanor 著(武藤徳子, 室町幸一郎 共訳, CHAPTER 5 歯髄-象牙質複合体), 南

江堂, オーラルバイオロジー -病態から学ぶ
歯科基礎医学- 2018年

Muromachi K, Sugiya H, Tani-Ishii N:
Springer, Methods in Molecular Biology
“CCN Proteins” (Chapter 23: Cell
Biological Assays for Measuring
Odontogenic Activities of CCN Proteins.)
2017

〔産業財産権〕

なし

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室町 幸一郎 (MUROMACHI Koichiro)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50637072

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし