

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09587

研究課題名(和文)細胞膜上のシアル酸修飾を起点とした修復象牙質形成機序の解明

研究課題名(英文)Role of alfa2,6-sialylation of human dental pulp cells

研究代表者

室町 幸一郎 (MUROMACHI, Koichiro)

神奈川県大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：50637072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト歯髄培養細胞においてBMP-1存在下で減少する 2,6-sialic acid 修飾の本態となるタンパク質の同定と機能解析を目的に研究を行った。Lectin columnによる精製と質量分析による解析の結果、6つの候補タンパク質を同定した。候補タンパク質のひとつであるglucosylceramidase (GCCase)がBMP-1の酵素活性依存的に核へ集積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 2,6-sia修飾を調節することでGCCaseの細胞内局在の制御に関与することを示唆しており、これら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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者はこれまでの研究から齲蝕罹患歯の象牙芽細胞様細胞および修復象牙質においてBMP-1の発現が亢進すること、ヒト歯髄培養細胞においてBMP-1により 2,6-sia修飾が減少することを明らかにしている。

本研究はBMP-1の新規標的因子としてGCCaseを同定し、その調節機構として 2,6-sia修飾とBMP-1の酵素活性が関与することを明らかにした点で学術的意義は大きい。

さらに、象牙質・歯髄複合体の創傷治癒機序の一端を明らかにしたことで新規覆髄剤の創薬へと展開する可能性を有しており、抜髄を回避して歯の生存率向上へと寄与し得る点でその社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify and analyze the function of the proteins responsible for the 2,6-sialic acid modification that is reduced in the presence of BMP-1 in human dental pulp cells.

6 candidate proteins were identified through purification by lectin column and analysis by mass spectrometry. Among them, we found that BMP-1 provokes nuclear accumulation of glucosylceramidase (GCCase) dependently on BMP-1 protease activity.

These results suggest that BMP-1 is involved in the regulation of subcellular localization of GCCase by modulating 2,6-sia modification in the pulp-dentin complex, which may contribute to the development of novel pulp-preserving agents targeting these proteins.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯髄・象牙質複合体 BMP-1 シアル酸 レクチン 質量分析

1. 研究開始当初の背景

齲蝕に罹患した歯において、傷害された既存の象牙芽細胞にかわって歯髄中の間葉系幹細胞から象牙芽細胞様細胞が分化し骨様の特徴を呈する修復象牙質を形成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、齲蝕罹患歯の象牙芽細胞様細胞および修復象牙質において bone morphogenetic protein (BMP) -1 の発現が亢進することを見出し、その役割に着目して研究を行ってきた。

BMP-1 は”BMP”と名は付くものの、astacin protease ファミリーに属するメタロプロテアーゼである。過去の研究はタンパク質分解酵素としての機能に焦点を当てたものが大半であり、BMP-1 が dentin sialophosphoprotein (DSPP) や dentin matrix protein-1 (DMP-1)、I 型 collagen などの象牙質を構成する細胞外マトリックスの成熟に関与することで象牙質形成に寄与することが知られていた。

一方で研究代表者は BMP-1 が象牙質基質の maturation のみならず、細胞に対しても作用を示すことを発見している (Muromachi *et al.*, 2015)。特に BMP-1 がヒト歯髄培養細胞 (以下、hDPCs) の不溶性画分の糖鎖プロファイリングに変化をもたらすことを明らかにし、その機序を解明して新規覆髄剤の開発へと展開すべく研究を継続してきた。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 (グリコームシフト) を生じることが知られている。また糖鎖修飾の有無や種類によってタンパク質の高次構造に変化が生じ、細胞内局在や機能が調節されることが明らかとなっている。しかしながら歯髄の創傷治癒過程における糖鎖修飾の役割は未だ明らかでなく、BMP-1 が糖鎖修飾を介して標的となるタンパク質の調整を行うとの報告も見当たらない。このことから、糖鎖解析の手法をもとに本態となるタンパク質を明らかにすることで、BMP-1 が歯髄中の細胞に及ぼす役割を解明するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、BMP-1 によるグリコームシフトのなかでも特に有意な変化を生じる α 2,6-linked sialic acid (α 2,6-sia) 修飾を有する糖タンパク質の精製、コアとなるタンパク質の同定、糖鎖構造の変化がタンパク質の機能に及ぼす影響を解明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、同意後に抜去された健全歯から歯髄を抽出したのち、1~3代継代培養した細胞を hDPCs 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) 可溶性/不溶性画分の抽出: hDPCs を recombinant human BMP-1 (500 ng/ml) で刺激したのちに、Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit を用いて可溶性画分および不溶性画分を抽出した。
- (3) 糖タンパク質の精製: α 2,6-sia 特異的に結合する lectin である sambucus nigra agglutinin (SNA) lectin column へサンプルを供し、競合糖である sialyl-lactose にて溶出することで α 2,6-sia 修飾された糖タンパク質を精製した。
- (4) Lectin-probed western blot: 精製後の糖タンパク質サンプルを SDS-PAGE にて展開後、ニトロ

セルロース膜へ転写し、HRP-conjugated-SNA を用いて lectin blotting を行い精製の確認を行った。

- (5) 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) : 精製後の糖タンパク質サンプルを amicon ultra を用いて脱塩・濃縮し、SDS-PAGE にて展開後に coomassie brilliant blue 染色を行い、3 つのバンドが確認できたことから質量分析に必要なタンパク質量 (0.1 ~ 1.0 mg/mL) は確保したものと判断した。切り出したバンドを LC-MS/MS 解析へ供した。
- (6) Western blot : 各タンパク質サンプルを SDS-PAGE にて展開後、ニトロセルロース膜へ転写し、glucosylceramidase (GCase)の発現量を anti-GCase 抗体を一次抗体に用いて解析した。
- (7) Immunofluorescence : hDPCs を chamber slide に播種し rhBMP-1 で刺激したのちに、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、anti-GCase 抗体を一次抗体として蛍光免疫染色を行い GCase の細胞内局在を解析した。
- (8) 核画分/細胞質画分の抽出:hDPCs を rhBMP-1 および BMP-1 阻害剤である UK383367 (44 nM) で刺激したのちに、CelLytic NuCLEAR Extraction Kit を用いて核画分および細胞質画分を抽出した。

4 . 研究成果

(1) BMP-1 によって α 2,6-sia 修飾が減少する糖タンパク質の同定

Lectin column 精製後のサンプルを LC-MS/MS 分析に供した結果、BMP-1 によって α 2,6-sia 修飾が減少する糖タンパク質の候補として、serotransferrin、serpin A12、GCase、keratin type II cytoskeletal 2 epidermal、InaD-like protein、pyruvate kinase が同定された。

(2) BMP-1 による GCase の可溶/不溶性の変化

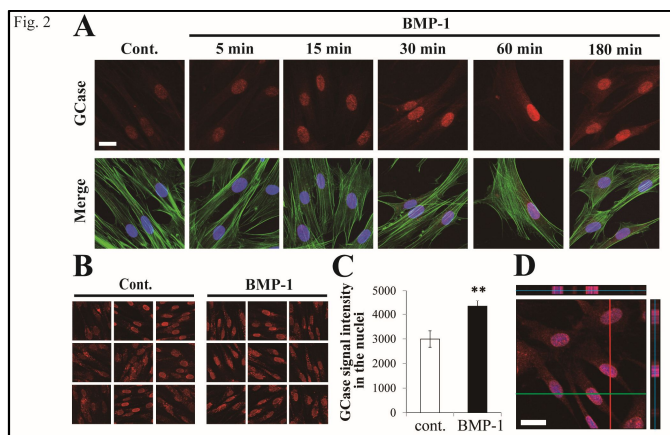
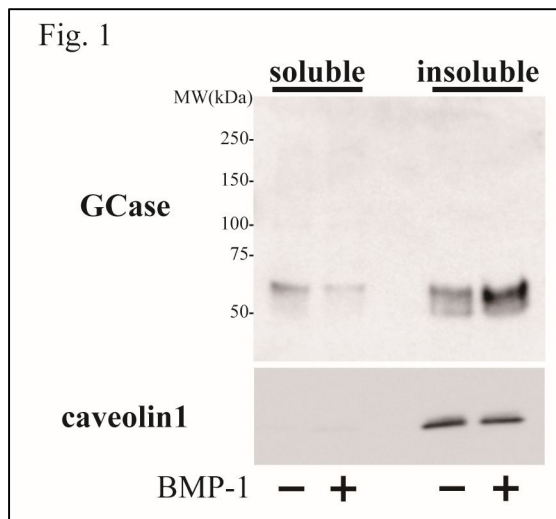
上記の候補タンパク質のうち、BMP-1 の存在下では可溶性画分における GCase が減少する一方で、不溶性画分の GCase は増加することを western blot にて確認した (Fig. 1)。

(3) BMP-1 による GCase の核への集積

BMP-1 によって時間依存的に GCase の核への集積が促進され (Fig. 2A) 有意差を認めた (Fig. 2B and C) 。また、GCase は核膜の

みならず核内にも認められた (Fig. 2D) 。

加えて、BMP-1 の阻害剤である UK383367 を用いたところ GCase の核への集積が抑制されたことから、GCase の核への集積は BMP-1 プロテアーゼ活性依存的であった (Fig. 3) 。



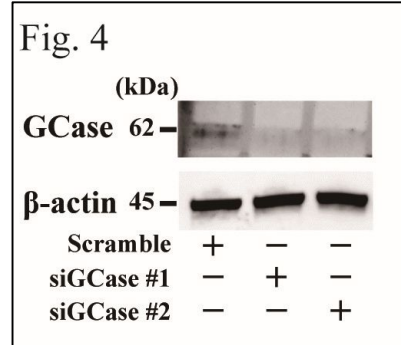
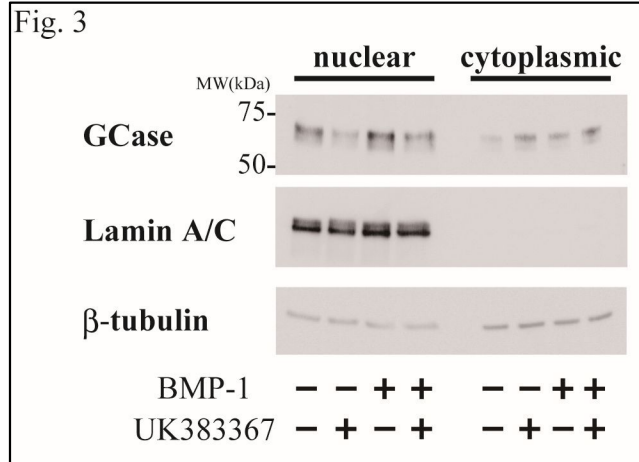
(4) GCCase ノックダウン系の確立

GCCase の機能解析を行うために siRNA を用いた GCCase ノックダウン系の確立を目指し条件検討を重ね、siRNA transfection から 24 時間後に GCCase 発現が抑制されることを確認した (Fig. 4)。

以上の結果から、ヒト歯髄培養細胞において BMP-1 は α 2,6-sia 修飾を介

して GCCase の不溶性を増大し、核内への集積を促進することが明らかとなった。また、GCCase の核への集積は BMP-1 プロテアーゼ活性依存的であった。加えて、ヒト歯髄培養細胞の GCCase ノックダウン系を確立したことで、今後の GCCase 機能解析に資するものと考えられた。

本研究は、BMP-1 が糖鎖修飾を介して GCCase の細胞内局在を変化させる新たな機能を明らかにしただけでなく、GCCase が核内において転写因子様の役割を果たしている可能性を見出した点で大きな意義を有していると考えられる。BMP-1、 α 2,6-sia、ならびに GCCase が象牙質・歯髄複合体の新たな創傷治癒マーカーとなり得る可能性もあり、生体に則した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

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 神尾 直人、渡邊 昂洋、葉山 朋美、深井 謙滋、小峯 千明、室町 幸一郎、松島 潔	4. 巻 41
2. 論文標題 歯髄炎におけるMIFによるCXCR4を介したPGE2産生調節	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 22 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20817/jeajournal.41.1_22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 室町幸一郎、中野令、吉垣純子、杉谷博士、石井信之
2. 発表標題 ヒト歯髄におけるBMP-1を起点としたGlcCeraseの細胞内局在と酵素活性の制御
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2020年度春季学術大会（第152回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 室町幸一郎、石井信之
2. 発表標題 ヒト歯髄におけるglucosylceramidaseに対するBMP-1の役割
3. 学会等名 第11回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichiro MUROMACHI, Nobuyuki TANI-ISHII
2. 発表標題 A comprehensive analysis of the effects of BMP-1 on glyco-alteration in human dental pulp cells.
3. 学会等名 The 11th World Endodontic Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 室町幸一郎、石井信之
2. 発表標題 BMP-1によりグライコームシフトを生じる歯髓細胞膜タンパク質の同定
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2018年度春季学術大会（第148回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 室町幸一郎、石井信之
2. 発表標題 ヒト歯髓においてBMP-1により 2,6-シアル酸修飾が抑制されるタンパク質の同定
3. 学会等名 第10回 日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 片倉 朗、里村 一人、木本 茂成	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 182
3. 書名 オーラルバイオロジー	

〔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
研究 分担者	石井 信之 (TANI-ISHII Nobuyuki) (20163610)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授 (32703)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------