

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791562
 研究課題名 (和文) シグナル伝達物質としてのアメロジェニンスプライシングアイソフォームの生物学的機能
 研究課題名 (英文) Biological functions of amelogenin' s splicing isoforms as a signaling molecule.
 研究代表者 春山 直人 (HARUYAMA NAOTO)
 東北大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：70359529

研究成果の概要：

歯のエナメル質が作られるときに重要な役割を持つとされるタンパク質(アメロジェニン)が、他にもいくつか役割を持つことが判明してきた。本研究では、その新たな役割を調べるために、ほ乳類細胞を使って人工的にアメロジェニンタンパク質を作り出すことに成功した。次にこの作り出したタンパク質が、具体的にどのような役割を持つか異なる性質を持つ培養細胞を用いて調べたところ、特に骨に近い性質を持つ細胞に影響を与え、細胞をより骨を作りやすい性格に変化させることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：歯科矯正学, アメロジェニン, エナメルタンパク, スプライスアイソフォーム

1. 研究開始当初の背景

2つの異なるアメロジェニンアイソフォームは、歯周、骨、その他の間葉系細胞において、本来の細胞外基質としての役割ではなく、むしろ細胞間のシグナル伝達物質としての役割を担っていると考えられる。そのうち、M180 と LRAP は主要なスプライスアイソフォームであるが、それらの機能の違いについては未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、異なる分化段階を持つ代

表的な間葉系細胞株に対するアメロジェニン蛋白アイソフォーム、特に M180 と LRAP の影響を解析することで、間葉系細胞分化に与えるシグナル伝達物質としてのアメロジェニンの機能を解明することである。本研究では、本来基質タンパクとして分泌されるタンパクのスプライスアイソフォームが、シグナル伝達物質として多種の細胞に作用するという生物学的に非常にユニークな現象を証明するだけでなく、本研究の結果から、矯正治療における病的歯根吸収のメカニズム、あるいは歯周病治療に用いられているブタ

エナメル蛋白抽出物であるエムドゲインの作用機序の一端が明らかになることが期待され、最終的に、新規歯周病治療薬開発や歯根吸収予防法など歯科臨床に貢献すると考えられる基礎的情報を得ることが目的である。

3. 研究の方法

- (1) マウスの歯より得られたRNAからM180とLRAPのcDNAをRT-PCR法により増幅し、ほ乳類用発現ベクターにサブクローニングして、タンパク発現ベクターを得る
 - (2) リコンビナントアメロジェニンを培養細胞からの回収し、精製する
 - (3) これらのタンパクを用いて、異なる分化段階を持つ多分化能を有する細胞株、C3H10T1/2、C2C12、3T3-L1、ATDC5、MC3T3E1に対する、リコンビナントアメロジェニンによる分化への影響の解析を解析する。それぞれの細胞の分化の違いを、培養開始1、7、14、28日後に、ALP活性やalizarin red、alcian blue、oil red染色によって確認する。また、培養開始後一定時間経過した細胞から、RNAとタンパク質を抽出し、骨や軟骨、脂肪細胞への分化段階に応じて特異的に発現するとされる指標遺伝子の発現レベル(I型collagen, II型collagen, Runx2, Sox9, Msx2, PPAR γ , MyoD, myogenin)や、特に骨組織の分化段階を反映する遺伝子の発現レベル(ALP, BSP, OC, MMP-9, MMP-13)をQ-PCRあるいはWestern blotting法を用いて検索する。
 - (4) アメロジェニン発現 C3H10T1/2、C2C12、3T3-L1、ATDC5、MC3T3E1細胞の作製する
 - (5) アメロジェニン発現 C3H10T1/2、C2C12、3T3-L1、ATDC5、MC3T3E1細胞をコラーゲンゲル混合物としてヌードマウス背部皮下へ移植し、1、4、8週間後に摘出。in vivoでの細胞分化能の変化を組織学的に解析する(HE染色、alcian blue染色、脂肪染色)。
- ### 4. 研究成果
- (1) まず、発現ベクターを作成後、異なる分化段階を持つ各種間葉系細胞へのアメロジェニン発現ベクターの遺伝子導入を試みたが、思うような発現量のコントロールができなかったため、現象に対する評価が困難であった。そこで、ほ乳類浮遊細胞を用いたタンパク大量発現型系からのM180とLRAPの回収と精製のみで切り替え、細胞移植については後の機会に検討することとした。
様々な発現ベクターとほ乳類タンパク発

現細胞の組み合わせの結果、pcDNA3.1Myc-hisベクターを用いFreestyle293 (Invitrogen)細胞が最も多量のリコンビナントタンパクを発現させられ

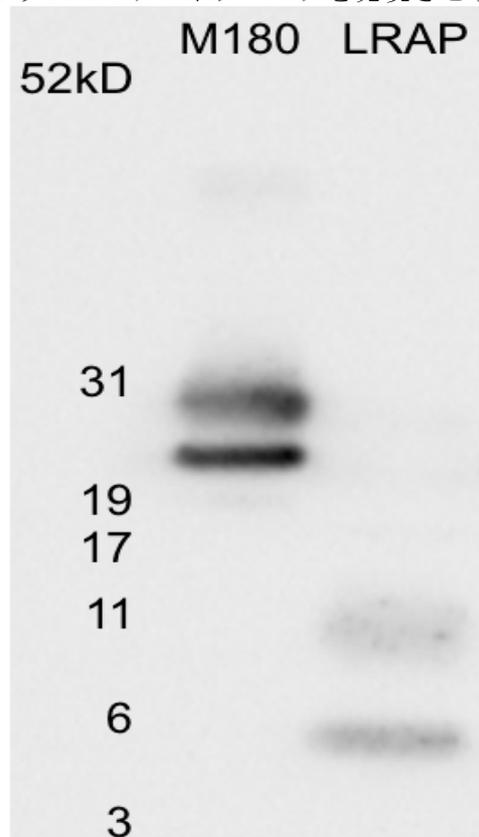


図1 リコンビナントアメロジェニン
(右レーン:LRAP, 左レーン:M180)

ることがわかった。発現させたタンパクをアメロジェニン特異的な抗体を用いてWestern Blotting法にて調べたところ、おそらく翻訳後修飾が異なる2つのサイズを持つM180とLRAPが発現していることがわかった(図1)。これらのタンパクを、Mycタグアフィニティーズを用いてそれぞれ回収することができた。
過去に報告されているリコンビナントアメロジェニンを使った実験では、主に大腸菌を用いて作成したアメロジェニンが用いられているが、これらタンパクにおいては翻訳後修飾おこらず、タンパクの性質がほ乳類由来タンパクと異なる可能性がある。本研究において、ほ乳類細胞からリコンビナントアメロジェニン産生に成功したということ自体が非常に画期的なことであるし、現在までにはほ乳類細胞を利用して作成・精製したアメロジェニンスプライスアイソフォームを用いて実験を行った例はないことから、今後これらのタンパクを使用することで、関連した様々な実験に発展させることができると考えている。

- (2) これらのタンパクを定量後、様々な分化段階を持つ間葉系細胞株培養系に添加し、遺伝

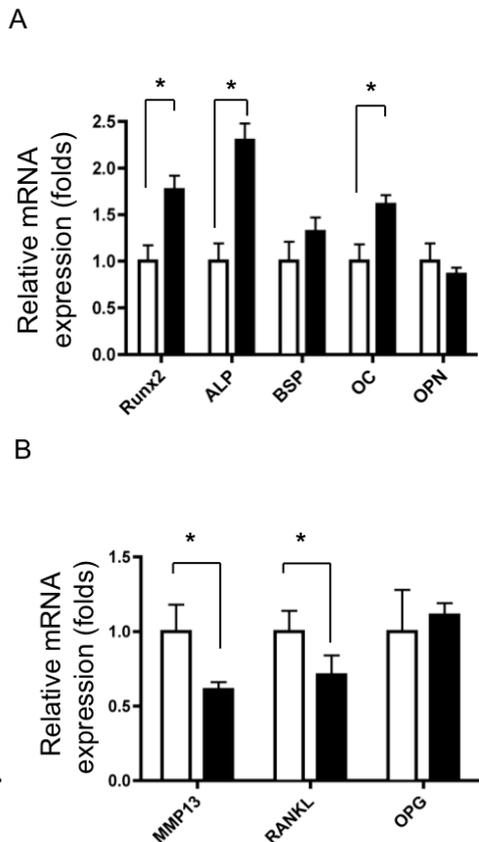


図2 骨系間葉細胞に対するLRAPの影響
(A: 骨形成マーカー, B: 骨吸収マーカー)

子発現の変化を解析するため RNA を抽出、リアルタイムPCRマシンを用いて評価を行った。結果解析は継続中の部分もあるが、特に骨芽細胞の分化マーカーに対してアメロジェニンが影響を与えることがわかった。

(3) また、細胞におけるタンパクの安定発現株の代わりに、骨においてM180とLRAPを発現するトランスジェニックマウスを入手し、マウスから分離した骨髄間葉細胞の破骨細胞支持能を評価した。その結果、特に破骨細胞形成支持能が変化していることがわかり、それに関連して RANKL の発現がアメロジェニン存在下では変化していることが判明した。そのほか、骨形成マーカーに関しても、特に LRAP が影響を与えていることが示唆された(図2)。

(4) その他として海外研究協力者との共同研究も行い、本研究と関連した論文発表を行った(5. 主な発表論文等参照)。とくに、アメロジェニンとアメロブラスチンの存在しないダブルノックアウトマウスの表現型を解析したところ、両者のシングルノックアウトマウスよりも歯のエナメル質の厚みは減少していたが、依然としてエナメル質をとどめており、エナメル質の形成初期には他のマ

トリクス(エナメルリンなど)の関与が強く推察された。また、アメロジェニン、アメロブラスチン非存在下でのアメロブラストでは、Gタンパクに関連したシグナル伝達メカニズムが影響を受けていることが示唆された。

以上、本研究の成果としては、ほ乳類細胞由来のリコンビナントアメロジェニン産生に成功したことがあげられ、また、アメロジェニンは間葉系細胞に対して(特に骨系の細胞において)骨形成を促進し破骨細胞形成を抑制する作用を持つことも確認されたことがあげられる。今後は、これらのM180とLRAPのエナメルマトリクスの作用が、どのように引き起こされているか、そのメカニズムを探っていく必要がある。現在のところ、エナメルマトリクスが、インターロイキンやNOの発現あるいはシグナル経路に影響を与え、結果として骨代謝を制御している可能性が考えられるため、その点を継続して研究を行っていく予定である。

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 3 件)

- ① Haruyama N, Sreenath TL, Suzuki S, Yao X, Wang Z, Wang Y, Honeycutt C, Iozzo RV, Young MF, Kulkarni AB. Genetic evidence for key roles of decorin and biglycan in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009 Apr;28(3):129-136. 査読あり
<http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2009.01.005>
- ② Hatakeyama J, Fukumoto S, Nakamura T, Haruyama N, Suzuki S, Hatakeyama Y, Shum L, Gibson CW, Yamada Y, Kulkarni AB. Synergistic Roles of Amelogenin and Ameloblastin. *J Dent Res.* 2009 Apr;88(4):318-322. 査読あり
<http://dx.doi.org/10.1177/002203450934749>
- ③ Choi SJ, Roodman GD, Feng JQ, Song IS, Amin K, Hart PS, Wright JT, Haruyama N, Hart TC. In vivo impact of a 4 bp deletion mutation in the DLX3 gene on bone development. *Dev Biol.* 2009 Jan; 325(1):129-37. 査読あり
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.014>

[学会発表](計 6 件)

- ① 春山直人 東北地区の3大学の今を知る
ー若手大学人による「最近の臨床的挑戦」
第24回東北矯正歯科学会大会. 2008年5
月31日 仙台
- ② 春山直人. アメロジェニンのスプライ
スフォーム(LRAP)を骨特異的に過剰発現
させたトランスジェニックマウスにおけ
る骨代謝変化. 第29回 東北骨代謝研究
会. 2008年2月2日 仙台
- ③ Suzuki S, Haruyama N, Cho A, Honeycutt
C, Sreenath TL, Kulkarni AB.
Characterization of molecular roles of
dentin sialoprotein (DSP) and dentin
phosphoprotein (DPP) in dentin
biomineralization. 9th International
Conference on the Chemistry & Biology of
Mineralized Tissues (November 4-8,
2007) Austin, Texas, USA
- ④ Verdelis K, Wright JT, Haruyama N,
Kulkarni AB, Lukashova L, Boskey AL.
Enamel Phenotype and Sexual Dimorphism
in Dentin of dspp-null Mouse Molars.
ASBMR 29th Annual Meeting (September
16-19, 2007) Hawaii, USA.
- ⑤ Torigoe K, Ishijima M, Nakamura T,
Haruyama N, Kulkarni AB, Karlsson S,
Iwamoto Y, Yamada Y. Abnormal axial
skeleton in TGF- β type I
receptor-deficient mice. 39th Japanese
society for connective tissue research
and 54th annual meeting of the Japan
matrix club (May 9-11, 2007) Tokyo,
Japan.
- ⑥ Haruyama N. Functional analysis of
extra cellular matrix proteins as
signaling molecules predominantly
expressed in tooth enamel and dentin.
Tokyo Medical & Dental University Global
Center of Excellence Program
International Research Center for
Molecular Science in Tooth and Bone
Diseases 1st Retreat Camp (Mar. 17-18,
2007) Kanagawa, Japan.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他] 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春山 直人 (HARUYAMA NAOTO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 70359529

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし