

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18944

研究課題名(和文)象牙芽細胞特異的過リン酸化マウスを用いた象牙質形成促進ペプチドの開発

研究課題名(英文)The development of dentin formation-promoting peptides using odontoblast-specific Fam20C overexpression mice

研究代表者

廣瀬 勝俊(Hirose, Katsutoshi)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00824898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯や骨の生体硬組織の石灰化には、硬組織特異的かつ豊富に存在する酸性リン蛋白質の役割が着目されてきた。酸性リン蛋白質は、翻訳後修飾過程で高度にリン酸化されて、生体内で負に荷電してCa²⁺結合能を獲得し、ハイドロキシアパタイト形成の核となって石灰化に寄与すると考えられている。近年、Fam20Cが酸性リン蛋白質のリン酸化を担っていることが報告され、全身の中でも特に硬組織に高発現することから、そのリン酸化は硬組織形成に重要であることが示唆される。本研究では、象牙芽細胞特異的Fam20C過剰発現マウスの解析を行い、Fam20Cによるリン酸化は象牙質形成および象牙芽細胞分化を調整することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生体硬組織に特異的かつ豊富に存在する酸性リン蛋白質のリン酸化は、象牙質の石灰化の促進に働くことが明らかとなった。「リン酸化」は、暫間的間接覆髄法(IPC法)での感染歯質の再石灰化、直接歯髄覆髄法での新規硬組織誘導、象牙質知覚過敏症や初期う蝕の再石灰化療法など歯科治療の新規治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Family with sequence similarity 20, member C (FAM20C) phosphorylates secretory proteins at S-x-E/pS motifs, and is highly expressed in mineralized tissues, implying the role of FAM20C-mediated phosphorylation in their homeostasis. The role of odontoblastic FAM20C-mediated phosphorylation in tooth dentin remains unclear. Here, we investigated the role of FAM20C in dentin formation using odontoblast-specific Fam20C overexpression (Fam20C-Tg) mice, which showed no alterations in serum calcium and phosphate levels. This study revealed that FAM20C-mediated phosphorylation regulates dentin matrix production and mineralization and odontoblast differentiation.

研究分野：骨

キーワード：象牙質 Fam20C リン酸化 Dmp1 DSPP DPP 酸性リン蛋白質

1. 研究開始当初の背景

象牙質の大部分は石灰化象牙質からなり、その歯髄側には未石灰化状態の象牙前質が存在する。石灰化象牙質と象牙前質の境界は、石灰化前線とよばれる。この石灰化前線の石灰化象牙質側には、DPP (dentin phosphoprotein)などの象牙芽細胞が産生した高度にリン酸化された酸性リン蛋白質が分布している^{1,2)}。歯や骨などの生体硬組織では、細胞外基質のリン酸化は、負荷電により Ca^{2+} 結合能を獲得して、ハイドロキシアパタイト形成の核となり、石灰化に関与するのではないかと考えられている。しかし、象牙質に分布する高度にリン酸化された蛋白質の象牙質形成における役割はわかっていない。

2012年に、硬組織のキナーゼとして Fam20C (Family with sequence similarity 20C)が同定され、硬組織における基質のリン酸化研究が脚光を浴び始めた^{3,4)}。Fam20Cの発現は全身の組織で確認され、特に歯や骨などの硬組織で高い発現が認められる。また、Fam20C機能不全疾患の Reine 症候群では歯や骨などの硬組織に石灰化不全などの異常表現型が現れることから⁵⁾、Fam20Cによる基質のリン酸化が、硬組織形成に深く関与していると考えられる。

2. 研究の目的

象牙芽細胞特異的に Fam20C が過剰発現するマウス (Fam20C-Tg)マウスを用いて、象牙質基質のリン酸化の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

2.3kb型コラーゲンプロモーターを用いて作製した象牙芽細胞特異的に Fam20C が過剰発現するマウス (Fam20C-Tg)を用いて、主に上顎臼歯を用いて形態学的・生化学的解析を行った。

4. 研究成果

1) 上顎第一臼歯における Fam20C 発現

Fam20C-Tgの上顎第一臼歯では、野生型マウス (WT)と比較して、Fam20C mRNA 発現が約 30 倍上昇していた。また上顎第一臼歯における FAM20C の免疫組織化学的染色では、WTと比較して、1週齢と4週齢の Fam20C-Tg の象牙芽細胞に強い陽性反応を認めた。

2) 歯の構成蛋白質の網羅的リン酸化解析

上顎第一臼歯から抽出した蛋白質を用いて、リン酸化蛋白質の網羅的解析を行った。Fam20C-Tgでは、WTと比較して、DMP1 (dentin matrix protein 1)や DSP (dentin sialoprotein ;dentin sialophosphoprotein のN端断片)、OPN (osteopontin)等のリン酸化ペプチドが多数検出され、分泌蛋白質のリン酸化の亢進が示されたが、DPP ペプチドは検出できなかった。Gene ontology 解析では、ossification、biomineral tissue development、osteoblast differentiation、calcium ion binding に関与する蛋白質のリン酸化が亢進していることが示された。また、リン酸化セリンの免疫組織化学的染色では、WTと比較して、Fam20C-Tgの歯冠象牙質に強い陽性反応が認められたため、象牙質に最も豊富に含まれる DPP のリン酸化も亢進していることが示唆された。一方、Fam20C-Tgの歯根象牙質では、

リン酸化セリンの免疫反応の減弱が認められた。

3) Fam20C-Tg における歯冠・歯根象牙質の変化

μ CT 解析において、4 週齢および 12 週齢の Fam20C-Tg の上顎第一臼歯では、WT と比較して、歯の全体量は減少していたが、エナメル質量に差はなかった。Fam20C-Tg の歯冠象牙質では、象牙質量は 4 週齢で減少していたが、12 週齢では有意な差は認めず、象牙質密度は 4 週齢では差は見られず、12 週齢で有意に増加していた。一方、Fam20C-Tg の歯根象牙質では、象牙質量と象牙質密度は、4 週齢および 12 週齢ともに有意に減少していた。組織学的解析において、4 週齢の Fam20C-Tg の上顎第一臼歯では、WT と比較して、歯冠象牙質や象牙前質に形態変化はみられなかったが、歯根象牙質では、象牙質幅が狭く面積は有意に減少しており、象牙前質の幅や面積、象牙前質面積/象牙質面積は有意に増加していた。また、Fam20C-Tg の歯根象牙質の石灰化速度は有意に減少していた。

4) Fam20C-Tg における象牙芽細胞の異常について

象牙質特異的な DSP と DPP の免疫組織化学的染色では、WT と比較して、Fam20C-Tg ではそれらの免疫反応が減弱していた。Fam20C-Tg では、特に歯根象牙質の免疫反応は微弱であった。また、上顎第一臼歯の抽出蛋白質のウェスタンブロットによる定量解析でも DPP 産生量の減少が認められ、象牙芽細胞の機能異常が示唆された。象牙芽細胞の組織学的解析では、Fam20C-Tg の歯冠象牙芽細胞に著変は見られないが、歯根象牙芽細胞は、WT と比較して、象牙芽細胞の丈が有意に減少していた。また、Fam20C-Tg の上顎第一臼歯 (4 週齢) の歯根象牙質根尖部には、象牙細管構造がなく、細胞封入を有する異常象牙質を認めた。この異常象牙質には、鍍銀染色では骨細管様構造が観察され、免疫組織化学的染色から象牙質と骨の両性質を有することが分かった。また、異常象牙質に接して、骨芽細胞マーカーである RUNX2 (runt-related transcription factor 2) 陽性細胞が分布し、その歯髓側の細胞には BMP2 (bone morphogenetic protein 2) 強陽性反応が認められた。上顎第一臼歯から抽出した mRNA 遺伝子発現解析では、*Runx2*、*Alkaline phosphatase*、*Opn*、*Dmp1*、*Bmp2* 発現が上昇し、象牙芽細胞マーカーの *Dspp*、*Nestin* は減少傾向を示した。以上より、Fam20C-Tg では、象牙芽細胞機能異常と、歯根象牙芽細胞の分化異常が示された。

5) 歯根象牙質形成の検討

Fam20C-Tg の上顎第一臼歯の歯根根尖部の異常象牙質は 4 週齢の咬合開始後に認められたことから、その形成には咬合力が影響していると考え、対合歯を抜歯して無咬合状態にした歯根根尖部を解析した。その結果、無咬合状態にしても、WT とは異なり、Fam20C-Tg では異常象牙質が形成されることから、咬合力は影響しないと結論した。次に、生体内の様々な環境要因の影響を排除した上で、歯根象牙質形成における Fam20C の役割を検討するため、歯根形成前のマウス歯胚を腎被膜下に移植した。移植 30 日後の WT 由来の歯胚とは異なり、Fam20C-Tg 由来の歯胚では、象牙細管の消失した細胞封入のある硬組織が形成された。この硬組織は、鍍銀染色では骨細管様構造を示して、免疫組織化学染色の結果、象牙質と骨の両性質を有していた。さらに Fam20C-Tg 由来の歯胚の歯根相当部に接して、RUNX2 陽性細胞を認め、Fam20C-Tg の生体の歯根根尖部と同様の所見が観察された。

以上より、Fam20C によるリン酸化は、象牙質の基質産生と石灰化の調整および、象牙芽

細胞分化に関与することが明らかとなった。

< 引用文献 > *J Cell Biol.* 1973;838-45., *Calcif Tissue Int.* 1985;37:491-500.,
Science. 2012;336:1150-3., *Cell.* 2015;161: 1619-32., *BMC Med Gene.* 2018;16:8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hirose Katsutoshi, Ishimoto Takuya, Usami Yu, Sato Sunao, Oya Kaori, Nakano Takayoshi, Komori Toshihisa, Toyosawa Satoru | 4. 巻 138 |
| 2. 論文標題 Overexpression of Fam20C in osteoblast in vivo leads to increased cortical bone formation and osteoclastic bone resorption | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bone | 6. 最初と最後の頁 115414 ~ 115414 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115414 | 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6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 廣瀬勝俊 |
| 2. 発表標題 分泌型キナーゼFam20Cによるリン酸化を介した骨形成制御 |
| 3. 学会等名 大阪大学歯学会 第67回総会 第130回 例会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 浪花耕平, 廣瀬勝俊, 宇佐美悠, 白銀陽一郎, 奥村将, 小守壽文, 豊澤悟 |
| 2. 発表標題 Overexpression of Fam20C in odontoblasts leads to decreased dentin formation |
| 3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 浪花耕平, 廣瀬勝俊, 宇佐美悠, 大家香織, 佐藤淳, 小守壽文, 豊澤悟 |
| 2. 発表標題 象牙質形成におけるゴルジ体キナーゼ Fam20C の役割について |
| 3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 廣瀬勝俊, 浪花耕平, 宇佐美悠, 佐藤淳, 大家香織, 小守壽文, 豊澤悟 |
| 2. 発表標題 象牙質形成におけるFam20Cの役割 |
| 3. 学会等名 第37回 日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hirose K, Naniwa K, Usami Y, Oya K, Komori T, Toyosawa S |
| 2. 発表標題 The role of Fam20C in dentin formation |
| 3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research annual meeting 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 浪花耕平, 廣瀬勝俊, 宇佐美悠, 佐藤淳, 鶴澤成一, 豊澤悟 |
| 2. 発表標題 象牙質形成におけるゴルジ体キナーゼ Fam20C の役割について |
| 3. 学会等名 第128回 大阪大学歯学会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|