

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592417

研究課題名(和文) ヒト歯根膜組織由来細胞の破骨細胞分化誘導メカニズムに関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study on osteoclastogenesis of human periodontal ligament derived cells

研究代表者

松澤 光洋 (MATSUZAWA MITSUHIRO)

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60288082

研究成果の概要(和文): 本研究は、近年シグナル分子としての機能が注目されているアメロジェニンを用いて、骨芽細胞および歯根膜細胞の細胞分化に与える影響を調べた。アメロジェニンは骨芽細胞に対して骨分化マーカーの発現を上昇させたが、歯根膜細胞においては抑制的に制御することが分かった。一方、破骨細胞分化因子の発現に対しては骨芽細胞、歯根膜細胞とも促進的に作用することが明らかとなった。また、アメロジェニンと相互作用する骨芽細胞由来の新規機能性分子として、マトロプロテアーゼ組織阻害因子(TIMP-2)を同定した。以上より、アメロジェニンは骨組織の改造において、分解酵素の活性調節を介して間接的に石灰化を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): The present study examined whether amelogenin activates the cell differentiation in mouse osteoblasts and human periodontal ligament (PDL) cells and used the T7 phage-display osteoblast library to identify a target protein with which amelogenin can interact. The marker genes of osteoblast-phenotype were enhanced by amelogenin in the osteoblasts. However, these genes were suppressed in the PDL cells. The expression of RANKL, a critical regulator of osteoclastogenesis was increased in the osteoblasts and PDL cells. The DNA sequence that demonstrated one of the highest affinities for amelogenin was tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2). These findings suggest that amelogenin can induce cell differentiation of osteoblasts and may facilitate the mineralization procedure during matrix formation by increasing the MMP activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯根膜細胞、骨芽細胞、破骨細胞、細胞分化、ECM、アメロジェニン、TRAP

## 1. 研究開始当初の背景

歯周組織の再生、歯の生理的吸収および矯正力による移動の際の顎骨の改造現象において、歯根膜組織とりわけ歯根膜由来細胞の

役割が重要であることは周知の事実である。我々はこれまでに乳歯歯根膜由来細胞の細胞生物学的性格について、IGF- 影響下における合成基質タンパク質の解析やメカニカ

ルストレスによるサイトカイン合成に与える影響など、永久歯歯根膜由来細胞と比較することでその応答性の差異を証明し、乳歯支持組織において歯根膜細胞が有する分子レベルの生物学的特性を強調してきた。最近では、歯根膜細胞において破骨細胞の分化と機能を調節する破骨細胞分化因子 (RANK-ligand ; 以下 RANKL) やそのデコイレセプターである Osteoprotegerin (以下 OPG) の発現が明らかにされ、破骨細胞の分化誘導に歯根膜細胞が深く関与することが示唆されている。

近年、歯の発生過程における上皮 - 間葉相互作用を制御するシグナル分子とその下流で働く転写因子の発現機構が次第に明らかにされ、発生過程を模倣した歯や歯周組織の再生研究が盛んに行われている。歯周組織の再生をテーマとした基礎研究において、エナメル基質タンパク質の一つであるアメロジェニンが歯根の発生過程でセメント質の形成を誘導する可能性が示唆されたことをきっかけに、アメロジェニンの骨系細胞に対するシグナル分子としての側面が次第に明らかになりつつある。さらに、アメロジェニンノックアウトマウスにおいては歯根の吸収像が確認され、破歯細胞や破骨細胞の分化調節因子としての機能を有することも明らかにされている。

このように歯根膜由来細胞が破骨細胞の分化と機能を調節すること、また歯の萌出過程での破骨細胞形成はエナメル上皮からのシグナルによって開始されることなどを考え合わせると、歯の萌出の際に生じる顎骨の改造現象において重要な役割を担う歯根膜由来細胞に対するアメロジェニンの生理作用を明らかにすることが必要不可欠と考えられる。そこで本研究では、近年シグナル分子としての機能が注目されているアメロジェニンを用いて、骨芽細胞および歯根膜由来細胞の細胞分化に与える影響、歯根膜細胞の破骨細胞分化誘導能、さらにアメロジェニンと相互作用する骨芽細胞由来の新規機能性分子を検索するための実験系をデザインした。

## 2. 研究の目的

### (1) アメロジェニンの新規相互作用タンパク質の解析

タンパク質の最も重要な機能は結合形成であり、触媒作用、抗原抗体反応、シグナル伝達などすべてにおいてリガンドとの結合能力が基本となる。この結合能力、すなわち分子間の相互作用は、タンパク質の機能を分子レベルで理解する上で欠くことのできないものである。ファージディスプレイ法や酵母ツーハイブリッド法はリバースプロテオミクスとも呼ばれ、タンパク質間相互作用を

網羅的に解析するハイスループットな方法として知られている。ファージディスプレイとは、外来ペプチドやタンパク質をファージの融合タンパク質としてバクテリオファージの表面に提示させ、標的分子と親和性を持つ分子をファージライブラリーから検索する方法である。この方法は抗体工学をはじめとするタンパク質工学の分野での発展が著しいが、最近では糖、RNA 結合タンパク質の選択、インテグリン結合ペプチドの選択、細胞表面抗原の認識など細胞生物学分野においてもその報告例が増えつつある。共同研究者の Sheu は、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) を標的分子としてラット骨芽細胞由来 T7 ファージライブラリーによるタンパク質間相互作用の検索を行った結果、高親和性リガンドである TRIP-1 を同定し、本因子が骨芽細胞の新規分化制御因子として機能することを証明した。本研究では、既に結合活性が確認されている骨芽細胞由来 T7 ファージライブラリーを用いて、アメロジェニンと相互作用する骨芽細胞由来リガンドタンパク質の検索を行った。

### (2) アメロジェニンによる歯根膜由来細胞の破骨細胞分化誘導能の解析

Hatakeyama らは、アメロジェニンのノックアウトマウスの表現系において興味深い知見を得ている。歯根表面上に多数の破歯細胞を検出し、歯根象牙質やセメント質の一部に吸収像が確認された。このことは、アメロジェニンは正常組織において破歯細胞や破骨細胞に対して抑制的に作用している可能性を示唆しており、吸収系細胞に対するアメロジェニンの生理作用を明らかにする必要性を生じさせた。そこで我々は、アメロジェニンによる歯根膜細胞の破骨細胞分化誘導因子の発現に対する影響、さらに歯根膜細胞および破骨細胞の共存培養系における破骨細胞誘導能の検索を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) タンパク質間相互作用の検討

rM179 は、マウスアメロジェニン cDNA/pET11a ベクター (ミシガン大学 Dr. JP Simmer より供与) を *E. coli* BL21(DE3)pLysS に導入し、イソプロピル -D-チオガラクトシド (IPTG) により発現誘導を行った。アメロジェニン可溶性画分はゲル濾過カラムにより分離精製した。アメロジェニンに対する高親和性タンパク質の同定には、T7 ファージによる T7 ファージディスプレイシステムを用いた。T7 ファージは、約 36kbp の直鎖状の 2 本鎖 DNA のゲノムを持つバクテリオファージであり、外来タンパク質を提示する頭部の G10 タンパク質および尾部より構成されている。この G10 遺伝子の C 末端側に、外来遺伝

子を融合することにより頭部の表面にタンパク質・ペプチドが提示される。本実験では、8日齢ラット骨芽細胞 cDNA プラスミドライブラリーから、1200 アミノ酸残基のポリペプチドまで提示できる T7 ファージディスプレイライブラリーを作製した。すなわち、ラット頭蓋冠由来骨芽細胞および歯根膜由来細胞から総 RNA を得て、polyA Spin mRNA Isolation Kit を用いて mRNA を抽出した。OrientExpress cDNA System を用いて cDNA を作製後、T7Select System 付属のプライマーおよび Taq ポリメラーゼを用いて PCR を行い、両細胞の遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を T7Select System 付属のベクター (T7Select10-3b) に導入後、得られたファージライブラリーのスクリーニングを行った。目的分子の単離、選別は、バイオニングと呼ばれる手法を用いた。計 3 回のパニングを繰り返すことによりアメロジェニンに結合する特異的ファージの濃縮を行った。rM179 を吸着した well にファージライブラリーを加え、ローターで室温 2 時間回転させながら攪拌した。中和したファージ溶液を、2xM9TB 培地中で濁度約 0.5 まで生育させた DH10B Cells に加えて、37 °C 1 時間振盪培養して感染させた。培養液を遠心分離後、ファージライブラリーの構築と同様の方法でライブラリーを調整し、二次スクリーニングを行った。この操作を数回繰り返し、30 回の洗浄で回収率が  $10^{-5} \sim 10^{-4}$  になった時点で ELISA による確認を行った。ELISA がポジティブであることを確認後、ファージクローンをスクリーニングした。標的分子と得られたファージクローンの *in vitro* での結合は、ファウエスタンプロッキングにより確認した。最終的にアメロジェニンに対する 3 つの特異的結合クローン (3、6、7) を得て、これらの結合活性を ELISA にて確認した。次に、生理的条件に近い相互作用を検出できる哺乳類細胞ツーハイブリッド法による検討を行った。アメロジェニンと TIMP-2 それぞれを、転写調節因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン (GAL4-DBD)、転写活性化ドメイン (VP16-AD) との融合タンパク質を細胞内で発現するコンストラクトを作製した。これらの発現コンストラクトおよび GAL4-DBD と TATA ボックスの下流にルシフェラーゼ遺伝子をもつ pG5-Luc ベクターを HEK293 細胞に遺伝子導入し、48 時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、MMP 阻害物質スクリーニングキット (QuantiZyme MMP Colorimetric Assay) を用いて MMP 基質と MMP および活性阻害剤の反応系にけるアメロジェニンの MMP 活性に与える影響を検索した。反応で生じる 2-nitro-5-thiobenzoic acid の呈色を、412nm の吸光度で測定した。

## (2) 共存培養系における歯根膜細胞の破骨細胞誘導能の検討

はじめにラット骨芽細胞 (ROS17/2.8 cells) および歯根膜由来細胞 (HPDL cells) の骨基質タンパク質 (COL1、ALP、OCN、BSP) および破骨細胞の分化活性化に関連する RANKL と OPG の mRNA 発現に対する影響をリアルタイム RT-PCR により検索した。それぞれの細胞は、各濃度の rM179 (0.1、1.0、5.0  $\mu$ g/ml) を 2 日毎の培地交換時に添加して 7 日間の培養を行った。培養終了後、細胞層より総 RNA を抽出し、reverse transcription kit (Invitrogen) を用いて cDNA の作製を行った。ポリメラーゼ連鎖反応は、2 本鎖 DNA のインターカレーターである SYBR Green I 色素と共に Rotor-Gene3000 (Corbett Research, Australia) を用いて行った。内部標準遺伝子には  $\beta$ -actin を使用した。rM179 の RANKL、OPG タンパク質生合成に対する影響については、遺伝子発現の検索と同条件で培養した各細胞層より lysate を調整した。総タンパク質量 50  $\mu$ g を SDS-PAGE に展開し、ニトロセルロース膜に転写後 Western blotting を行った。抗 RANKL、OPG 一次抗体と反応後、二次抗体として HR ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG 抗体を用いた。反応物の検出は、高感度化学発光 ECL-Plus 検出システム (GE Healthcare Bio-Sciences KK) を用いて行い X 線フィルムに感光させた。マウス脾細胞由来破骨細胞および HPDL cells の共存培養系による破骨細胞誘導能の解析については、7 週齢の BALB/cJ マウスより採取した脾細胞とヒト歯根膜組織より遊走した培養歯根膜細胞を用いた。HPDL cells を 24well 培養プレートに  $2 \times 10^4$ /well の細胞密度で播種し、10% FBS を含む D-MEM 培地にて 3 日間培養を行った。培養 3 日目に脾細胞を 24well 用のインサートに  $1 \times 10^4$ /well で播種し、5ng/ml RANKL を含む上記培地にてさらに 4 日間の培養を行った。培養終了後、4% パラホルムアルデヒド / 0.4M PBS で 30 分固定を行い、50mM sodium tartrate、1.2mM naphthol AS-MX phosphate、1.3mM fast red violet LB salt を含む 0.1M sodium acetate buffer による TRAP 染色を行った。TRAP の陽性細胞数は、3 核以上の多核細胞を陽性細胞として測定した。

## 4. 研究成果

### (1) タンパク質間相互作用の検討

ファージクローンの増幅および精製を行い DNA の塩基配列を検索した結果、メタロプロテアーゼ組織阻害因子 (TIMP-2) が同定された。293 細胞を 48 時間トランスフェクション後ルシフェラーゼ活性の測定を行った結果、単独添加した発現コンストラクトに比較して GAL4-DBD- アメロジェニン、VP16-AD-TIMP-2 の同時添加において約 8 倍の

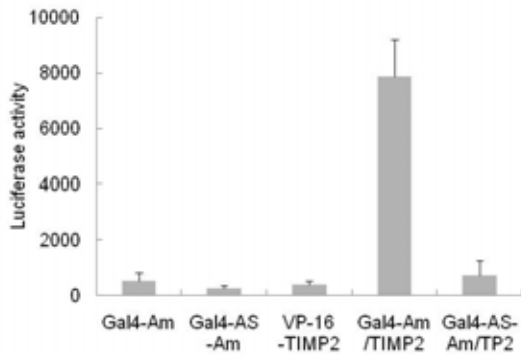


図 1. 哺乳類細胞ツーハイブリッド法によるタンパク質間相互作用の検討

ルシフェラーゼ活性の上昇がみられ、相互作用を陽性と判断した(図1)。MMP活性の阻害率は、TIMP-2 単独添加では最大で70%を示したが、アメロジェニンとTIMPの同時添加では20%を示し、アメロジェニンはMMP活性に対するTIMP-2の阻害作用を抑制することが明らかとなった(図2)。

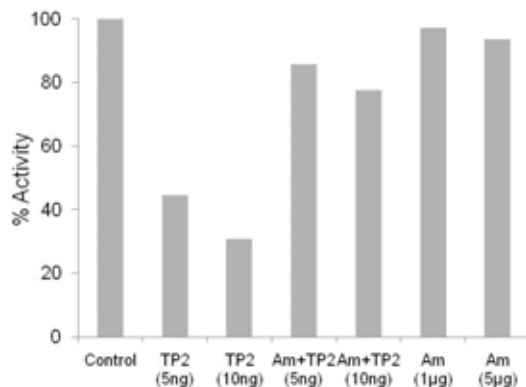


図 2. rM179 と TIMP-2 の相互作用が MMP 活性に及ぼす影響

#### (2) 共存培養系における歯根膜細胞の破骨細胞誘導能の検討

アメロジェニンの骨分化マーカーに対する細胞応答のポジティブコントロールとしてラット骨芽細胞(ROS17/2.8 cells)を用いた。ROS17/2.8 cells における骨基質タンパク質の mRNA 発現レベルは、1µg rM179 添加により COL1; 2.2 倍、ALP; 1.4 倍、OCN; 6.5 倍の上昇を認めた。HPDL cells における COL1、ALP、BSP の mRNA 発現レベルは、濃度依存的な抑制を示した。破骨細胞分化因子 RANKL の mRNA 発現量は、1µg rM179 添加により ROS17/2.8 cells および HPDL cells で約 3 倍の上昇が認められた(図3)。Western blotting では、コントロールに対して ROS17/2.8 cells で約 2 倍、HPDL cells で 1.4 倍を示し、タンパク質レベルにおいても RANKL の上昇が確認された。脾細胞由来破骨細胞に対しては 1、

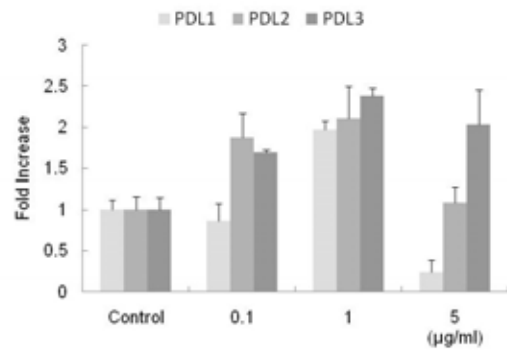


図 3. HPDL cells における RANKL 発現に対する rM179 の影響

5µg/ml rM179 でそれぞれ 43%、75%の TRAP 陽性細胞数の抑制がみられたが、HPDL cells との共存培養においてはそれぞれ 35%、45%の抑制を示し、HPDL cells の共存により TRAP 陽性細胞数の上昇が認められた(図4)。

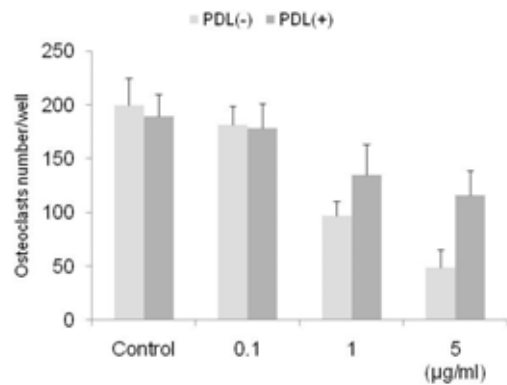


図 4. 脾細胞由来破骨細胞と HPDL cells の共存培養系における rM179 の影響

骨芽細胞様細胞としての性質を有する歯根膜細胞が、rM179 により骨分化マーカーの上昇を示した骨芽細胞の応答と異なることは興味深い。共存培養系における TRAP 陽性細胞数の増加は、HPDL cells において RANKL の発現が促進されることで生じたものと考えられる。以上の結果は、歯の萌出経路においてアメロジェニンが歯小囊由来細胞を介して骨改造を調節する可能性を示唆している。

本研究では、MMP の活性調節に重要な役割を担う TIMP-2 とアメロジェニンとの相互作用を明らかにした。このことは局所においてアメロジェニンが TIMP-2 の阻害作用をブロックすることにより、間接的に MMP 活性を促進する可能性を示唆している。MMP による有機性基質の分解が石灰化の進行過程において重要なステップとなることから、アメロジェニンが ECM リモデリングの調節を介して間接的に石灰化を制御する可能性が考えられる。今後は、石灰化組織におけるアメロジェ

ニンと TIMP-2 の相互作用を明らかにする細胞および個体レベルの解析を行うと同時に、個々のタンパク質の機能ドメインや構造ドメインなどの詳細な分子機能の解析が必要と思われる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. 松澤光洋:アメロジェニンによる骨系細胞分化制御メカニズムの解析. 小児歯科学雑誌、査読有、47巻、2009、539-549
2. Matsuzawa M, Sheu TJ, Lee YJ, Chen M, Li TF, Huang CT, Holz JD, Puzas JE: Putative signaling action of amelogenin utilizes the Wnt/-catenin pathway. J Periodont Res, 査読有, 44巻, 2009, 289-296
3. 山口三菜, 進士久明, 木本茂成, 倉田茂昭, 大川浩作, 山本浩之:新しい齲蝕予防法の検討. 小児歯科臨床、査読有、13巻、2008、76-80

[学会発表](計10件)

1. 横山三菜:ポリホスホセリンを用いた齲蝕予防法の検討. 第44回神奈川歯科大学学会総会、2009年12月5日、横須賀
2. 松澤光洋:アメロジェニンによる骨芽細胞分化調節機構の解析(第5報). 第44回神奈川歯科大学学会総会、2009年12月5日、横須賀
3. Matsuzawa M: Amelogenin(M180) showed high affinity to tissue inhibitor metalloprotease 2 (TIMP-2) and helped osteoblasts mineralization by inhibiting TIMP-2 activity. ASBMR, 31<sup>st</sup> Annual Meeting, 2009. 9. 11-15, Colorado, USA
4. 横山三菜:ポリホスホセリンを用いた新しい齲蝕予防法の検討(第3報). 第47回日本小児歯科学会大会、2009年5月15日、大阪
5. 松澤光洋:アメロジェニンによる骨芽細胞分化調節機構の解析(第4報)破骨細胞分化誘導能について. 第47回日本小児歯科学会大会、2009年5月15日、大阪
6. Matsuzawa M: Amelogenin activates the Wnt/-catenin pathway. 86<sup>th</sup> General Session and Exhibition of the IADR, 2008.7.2-5, Toronto, Canada
7. 山口三菜:ポリホスホセリンを用いた新しい齲蝕予防法の検討. 第43回神奈川歯科大学学会総会、2008年12月6日、横須賀
8. 松澤光洋:アメロジェニンによる骨芽細胞分化調節機構の解析(第4報). 第

43回神奈川歯科大学学会総会、2008年12月6日、横須賀

9. 山口三菜:ポリホスホセリンを用いた新しい齲蝕予防法の検討. 第46回日本小児歯科学会大会、2008年6月12日、大宮
10. 松澤光洋:アメロジェニンによる骨芽細胞分化調節機構の解析(第3報)・TIMP-2間相互作用について. 第46回日本小児歯科学会大会、2008年6月12日、大宮

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

松澤 光洋 (MATSUZAWA MITSUHIRO)  
神奈川歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 60288082

##### (2)研究分担者

木本 茂成 (KIMOTO SHIGENARI)  
神奈川歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 90205013  
横山 三菜 (YOKOYAMA MINA)  
神奈川歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 10386849