

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592588

研究課題名（和文）エナメルタンパクの骨代謝コントロールメカニズムの解明-エストロゲン関与の可能性-

研究課題名（英文）Identification of mechanisms for bone metabolism regulated by enamel matrix proteins - a possibility of estrogen's involvement.

研究代表者 五十嵐 薫 (IGARASHI KOAORU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70202851

研究成果の概要（和文）：

本研究では、歯周組織再生を期待して広く用いられているエムドゲインの主成分であるアメロジェニンが、エストロゲン低下時にみられる骨代謝変化に影響をあたえるメカニズムを調べた。アメロジェニンスプライスアイソフォームの1つであるLRAPは、エストロゲン低下時にみられるIL-6、シクロオキシゲナーゼ2 (COX2)、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の産生上昇を抑制し、結果的に破骨細胞の形成を抑制する可能性が示唆された。また、一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (iNOS および eNOS) の発現を変化させ、結果としてNOの上昇させることで、エストロゲン低下時の骨密度低下を防止している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies suggest that the amelogenins are expressed in various tissues including bone and affecting bone metabolism. In this study, we examined the effects of LRAP, one of the major splice isoform of amelogenins, on stimulated bone turnover under estrogen deficiency. Using mesenchymal cells isolated from wild type and LRAP transgenic mice with or without ovariectomy (OVX), gene expression levels of inter leukin-6 (IL-6), cyclooxygenase-2 (COX2), and nitric oxide (NO) synthase were examined by real-time PCR. In addition, ELISA or colorimetric assay was also performed to measure prostaglandin E₂ (PGE₂) or NO production from the cells. We found that the LRAP inhibited the elevation of IL-6 and COX2 gene expression, which is typically found in the estrogen deficient condition. PGE₂ production was decreased in the ovariectomized LRAP TG derived cells, but not in the ovariectomized wild type derived cells. The production of NO was increased in the ovariectomized LRAP TG cells. The LRAP may play a significant role on the prevention from bone loss due to estrogen deficiency, by changing the interleukin and PGE₂ expression, and the production on NO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：アメロジェニン・エナメルタンパク・骨代謝・エストロゲン・歯学

1. 研究開始当初の背景

現在歯周組織再生治療に応用されているエムドゲインは、ブタ歯胚から精製したタンパク質で、歯周外科手術の際の補助材料として広く用いられている。エムドゲインの大部分は、エナメル上皮が分泌するエナメルタンパクのうちアメロジェニンファミリーで、ヒトにおいてセメント質・歯槽骨の形成や機能性付着組織の再生がもたらされることが示されている。しかし、エムドゲインには増殖因子などのタンパクも多く含まれていると考えられ、その作用機序は未だ不明である。

ここ数年の研究から、アメロジェニン遺伝子欠損(KO)マウスは野生型マウスと比較して歯根吸収が促進していること、KOマウスのCM/PDL cellsのRANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)発現レベルが上昇していること(J Biol Chem. 2003 12;278(37):35743-8)がわかってきた。またアメロジェニンファミリーのうち、全長タンパク(M180)またはLRAP(Leucine Rich Amelogenin Peptide)を歯根膜細胞の培養系に加えたところ、LRAPは歯根膜細胞のRANKLの発現を抑制し、破骨細胞形成を抑制する効果があることが報告されている(J Dent Res. 2006 85(2):144-9.)。以上のことから、歯周・骨組織などの間葉系細胞においてアメロジェニンは細胞間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ている。

我々のグループは、骨に特異的にアメロジェニンを過剰発現させるトランスジェニックマウス(TGマウス)を共同研究者と作製し、その表現型解析を試みた。すると、卵巣摘出術(OVX)を施した際に、野生型のマウスは骨密度低下(骨粗鬆症)を示したものの、TGマウスは有意な骨密度低下を示さなかった。これは骨芽細胞のRANKLの発現がLRAPにより抑制されたことが原因と考えられた(unpublished data)。このマウスにおいてエストロゲン減少時の血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6の濃度を測定したが、野生型マウスと有意な差は見られなかった(unpublished data)。全身レベルでのサイトカイン量変化は捉えきれなかったものの、IL-6を介したエストロゲン減少時の骨密度減少は、骨粗鬆症の主たる原因であり、骨髄間葉系細胞培養系を用いれば、IL-6やプロスタグランジンE₂の変化の確認できる可能性がある。一方、LRAPをエナメル芽細胞に添加したところ一酸化窒素(NO)の合成経路が活性化されることが報告されている(Bone 2008 42(6), 1072-1079)。また、骨におけるエストロゲンの効果は、血管内皮型NO合成酵素から合成されたNOによって媒介されているということは以前より判明しており(Immunology 2001 103(3), 255-266)、骨髄間葉系細胞においてNOはRANKL/OPG発現の比を減少させる

(Endocrinology 2004 145(2), 751-759)ことから、卵巣摘出時のNO発現量の減少がアメロジェニンによって抑制された可能性が考えられる。

2. 研究の目的

よって、本研究では

- (1) アメロジェニンは、エストロゲン低下時にみられるIL-6、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)、プロスタグランジンE₂(PGE₂)の産生上昇を抑制し、結果的にRANKLの発現上昇を抑制することで、破骨細胞の形成を抑制する。
- (2) アメロジェニンはNOの発現を上昇させることで、エストロゲン低下時のNO産性低下を補い、骨密度低下を防止する。という仮説を、アメロジェニンTGマウス由来間葉系細胞の培養を通じて検証することを目的とした。

アメロジェニンは従来エナメル芽細胞のみに発現していると考えられてきたが、マラッセの上皮遺残にも発現しており、アメロジェニンの役割を解明することは、矯正治療における病的歯根吸収のメカニズム解明につながる可能性がある。また、本研究の結果から、歯周病治療に用いられているエムドゲインの作用機序を明らかにすることが期待され、最終的に、新規歯周病治療薬開発など歯科臨床に貢献する有益な情報を得られると考えた。

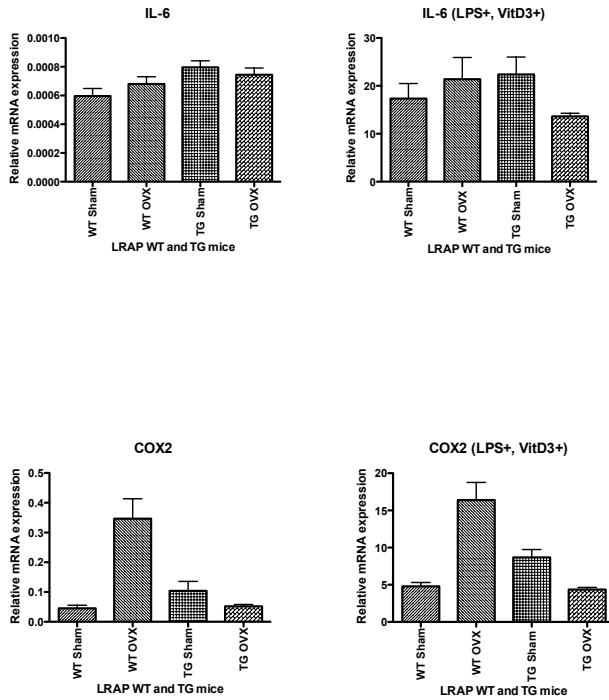
3. 研究の方法

- (1) エストロゲン低下時における、IL-6、COX-2、PGE₂発現の解析を行うため、野生型マウスおよびアメロジェニン(LRAP)をI型コラーゲンプロモーター下で骨に特異的に発現するトランスジェニックマウスモデルに、偽手術(Sham)および卵巣摘出(OVX)を施し、これらのマウス由来間葉系細胞を用いて、IL-6、COX2、RANKLの発現量レベルをリアルタイムPCR(Q-PCR)で比較した。また、回収した培養上澄を用い、PGE₂の定量をELISAにておこなった。
- (2) ShamおよびOVXを施した野生型および、トランスジェニックマウスモデル由来の間葉系細胞を活性型VitaminD3およびLipopolysaccharide(LPS)存在・非存在下で培養後、NO合成酵素(iNOS, eNOS)の遺伝子発現量を比較した。また回収した培養上澄を用い、Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kitを用いて、NO産生量を比較した。

4. 研究成果

- (1) 全長アメロジェニンおよび、LRAPをI

型プロモーター下で骨に特異的に発現するトランスジェニックマウス(以下TGマウス)と野生型マウスに卵巣摘出術を施し、8週後に長管骨より骨髓間葉系細胞を採取し活性型 VitaminD3 と LPS 存在下または非存在下で培養を行った。その後 RNA を抽出しリアルタイム PCR 法にて、IL-6、COX-2 遺伝子発現を比較したところ、アメリロジェニントランスジェン(LRAP)の存在によってこれらの遺伝子発現に差が生じることが示唆された(図 1, 2)。



また、PGE₂の定量をELISAにておこなったところLRAPの存在の有無によってPGE₂の培養上澄中の存在量が異なり、これはリアルタイムPCRのCOX2の結果と一致した(図3)。

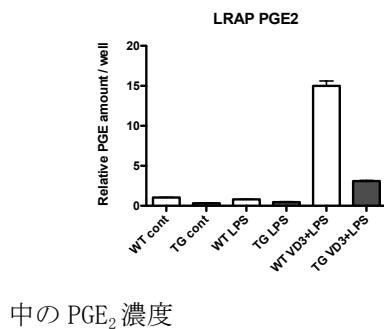


図 3 培養上清中の PGE₂ 濃度

(2) 卵巣摘出を施した野生型および、トランスジェニックマウスを用いて、骨髓間葉系細胞を活性型 VitaminD3 および Lipopolysaccharide (LPS) 存在下で短期培養後、NO 合成酵素 (iNOS, eNOS) の遺伝子発現量の変化をリアルタイム PCR 法で測定した。その結果、LRAP を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、野生型と比較して OVX を行った時の iNOS, eNOS の発現量が有意に上昇していることが確認された(図 4)。

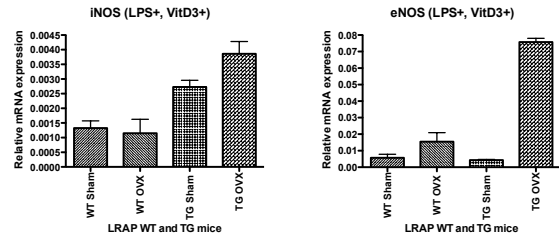
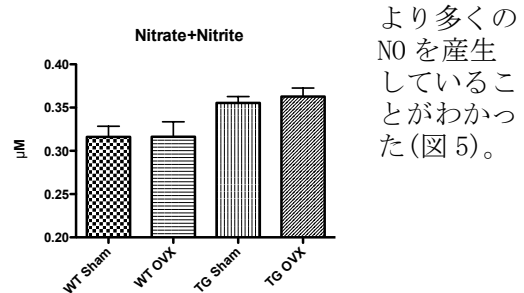


図 4 iNOS, eNOS 遺伝子発現の変化

また、回収した培養上澄を用い、Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit を用いて、NO 産生量を比較したところトランスジェニックマウス由来細胞のほうが、



より多くの NO を産生していることがわかった(図 5)。

図 5 NO 産生量の変化

以上、今回の我々の研究から、エナメルマトリクスがインターロイキンや NO の発現と、そのシグナル経路に影響を与え、結果として骨代謝に作用している可能性が示唆された。本実験から得られた結果は、歯周病治療に用いられているエムドゲインの作用機序の一端を明らかにすることに寄与できたと考えられる。

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 6 件)

1. Tokugawa Y, Kubota M, Nishimura M,

- Haruyama N, Igarashi K. Bone regeneration of canine artificial alveolar clefts using bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells and β -tricalcium phosphate: A preliminary study. *Orthod Waves*. 査読あり, 2012; in press.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.odw.2012.01.003>
2. Qiu L, Haruyama N, Suzuki S, Yamada D, Obayashi N, Kurabayashi T, Moriyama K. Accuracy of orthodontic miniscrew implantation guided by stereolithographic surgical stent based on cone-beam CT derived 3D images. *Angle Orthod*. 査読あり, 2012; 82(2) 284-293.
<http://dx.doi.org/10.2319/033111-231.1>
3. Haruyama N, Hatakeyama J, Moriyama K, Kulkarni AB. Amelogenins: Multi-functional enamel matrix proteins and their binding partners. *J Oral Biosci*. 査読あり, 2011; 53(3) 257-266.
<http://dx.doi.org/10.2330/joralbiosci.53.257>
4. Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats. *Dev Biol*. 査読あり, 2011; Feb 15;350(2):337-347.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.11.029>
5. Ma D, Zhang R, Sun Y, Rios HF, Haruyama N, Han X, Kulkarni AB, Qin C, Feng JQ. A novel role of periostin in postnatal tooth formation and mineralization. *J Biol Chem*. 査読あり, 2011; Feb 11;286(6):4302-4309.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.140202>
6. Cho A, Suzuki S, Hatakeyama J, Haruyama N, Kulkarni AB. A method for rapid demineralization of teeth and bones. *Open Dent J*. 査読あり, 2010; 4:223-229.
<http://dx.doi.org/10.2174/187421060>

[1004010223](#)

[学会発表] (計 5 件)

1. Haruyama N, Qiu L, Suzuki S, Yamada D, Obayashi N, Kurabayashi T, Moriyama K. Accuracy of miniscrew implantation guided by cone-beam CT based stereolithographic stent. The 4th International Congress and the 70th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. October 17-20, 2011, Nagoya, Japan
2. 春山直人. 招待講演 メインシンポジウム「エナメルタンパク「アメロジェニン」の新規機能について—from bench to clinics and from clinics to bench—」Amelogenins: Multi-functional enamel matrix proteins. 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2010年9月21-22日, 東京
3. 三谷薫子、春山直人、五十嵐薫. アメロジェニンスプライスアイソフォームの軟骨細胞分化に与える影響. 第69回日本矯正歯科学会. 平成22年9月27-29日, 神奈川県
4. Mitani K, Haruyama N, Igarashi K. Amelogenin splice isoforms stimulate chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. The 39th Annual Meeting & Exhibition of the AADR/CADR March 3-6, 2010 Washington DC, USA
5. 三戸天元、春山直人、五十嵐薫. 筋ジストロフィーマウスにおける筋機能活性化が下顎骨の成長に与える影響. 第68回日本矯正歯科学会. 2009年11月16-18日, 福岡

[図書] (計 1 件)

1. Haruyama N, Hatakeyama J, Hatakeyama Y, Gibson CW, Kulkarni AB. Bentham Science Publishers Ltd. Chapter 3, Lessons from the amelogenin knockout mice. In: Amelogenins: multifaceted proteins for dental and bone formation and repair. 2011; pp 25-31.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 1 件）

名称：OSTEOGENESIS PROMOTER COMPRISING
[4-(METHYLTHIO)PHENYLTHIO]METHANEBISPHO
SPHONIC ACID OR PHARMACEUTICALLY
ACCEPTABLE SALT THEREOF AS ACTIVE
INGREDIENT.

発明者：HISASHI SHINODA, KAORU IGARASHI,
SHINOBU MURAKAMI

権利者：同上

種類：国際特許

番号：JPA 2008225484

取得年月日：2009 年 8 月 5 日

国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 薫 (IGARASHI KAORU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70202851

(2) 研究分担者

春山 直人 (HARUYAMA NAOTO)

東京医科歯科大学・歯と骨の GCOE 拠点・GCOE

拠点形成特任教員

研究者番号：70359529

(3) 連携研究者

なし