

平成 23 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890158

研究課題名（和文） 象牙質形成における DSPP 開裂のメカニズムと意義の解明

研究課題名（英文） The elucidation of mechanisms and significance of DSPP cleavage in dentinogenesis

研究代表者

鈴木 茂樹 (SUZUKI SHIGEKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30549762

研究成果の概要（和文）：

Dentin phosphoprotein (DPP) 及び Dentin Sialoprotein (DSP) は *Dentin sialophosphoprotein (DSPP)* という 1 遺伝子から合成される。本研究では、開裂抵抗性 DSPP を発現する細胞株を作製し、開裂のメカニズムを解明することを目的とした。MC3T3 (マウス前骨芽細胞株) 細胞上清中において、正常 DSPP では 100kDa 以下にスメアーに広がるバンドを認めた。開裂抵抗性 DSPP では 100kDa 以上に強いバンドを認め、100kDa 以下には全くバンドを認めなかった。以上の結果より、DSPP の開裂抑制はその細胞外分泌を抑制しないだけでなく、更に開裂抵抗性 DSPP では正常 DSPP より強いバンドシグナルを認めることが明らかとなった。これら結果から DSPP の開裂はその分泌に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Dentin phosphoprotein (DPP) and dentin sialoprotein (DSP) are cleaved products of precursor dentin sialophosphoprotein (DSPP). In this research, we explored the mechanisms and the biological significance of DSPP cleavage into two proteins using cell lines expressing cleavage-resistant DSPP. We observed DSP specific band under 100kDa from the condition medium of normal DSPP transfectants. Conversely, we detected DSP and DPP specific bands over 100kDa from mutated DSPP transfectants. Interestingly, the intensity of DSP and DPP specific bands of mutated DSPP was apparently higher than that of normal DSPP. These results suggested that we successfully generated stable transfectants expressing normal or mutated DSPP and cleavage of DSPP might affect the secretion or the extracellular deposition of DSP and DPP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,990,000	597,000	2,587,000

研究分野：保存治療系歯学

科研費の分科・細目 保存治療系歯学

キーワード：象牙質、DSPP、遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト *DSPP* 遺伝子変異が象牙前質の拡大を伴う象牙質形成不全症 (Dentinogenesis Imperfecta DGI) を呈すること (Xiao *et al.*, *Nat Genet*, 2001)、*Dspp* 欠損マウスが同様の症状を呈すること (Sreenath *et al.*, *J Biol Chem*, 2003) から *DSPP* は象牙質形成に必須の役割を果たすことが明らかにされている。また、*Dspp* 欠損マウスの骨における表現型の解析から骨形成への関与も明らかとなっている (Verdelis *et al.*, *Bone*, 2008)。*DSPP* の翻訳産物は常に *DSP* (Dentin Sialoprotein) と *DPP* (Dentin phosphoprotein) の2つに開裂されて象牙質に沈着する。*in vitro* 研究から、*DPP* はヒドロキシアパタイトの形成、成熟に寄与することが報告されている (He *et al.*, *J Biol Chem*, 2005, Milan *et al.*, *Eur J Oral Sci*, 2006) もの、*DSP* の役割に関しては不明な点が多い。申請者は *DSP* と *DPP* の *in vivo* における個別の役割を解析するために、USA/National Institutes of Health/National Institutes of Dental and Craniofacial Research において Dr. Ashok Kulkarni 研究室に在籍し、*DSPP* プロモーター下で *DSP* を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。さらに、そのマウスと *DSPP* 欠損マウスを交配させることで *DSP* のみをレスキューしたマウス、すなわち *DPP* のみを欠損したマウスの作製に成功した (Suzuki *et al.*, *Matrix Biol*, 2009)。興味深いことに、本マウスでは象牙質量はほぼ正常に戻ったものの、象牙質密度は *DSPP* 欠損マウスと同様に低いままであった。つまり *DSP* は象牙質形成 (前象牙質から象牙質への変換) に積極的に寄与し、*DPP* は主に象牙質形成後の象牙質成熟に寄与することが示唆

された。

## 2. 研究の目的

以上から、申請者らは *DSP* が象牙質形成に積極的に関与することを世界に先駆けて明らかにし、*DPP* が象牙質における石灰化の成熟に必須のタンパクであることを証明した。

*DSPP* はその中央部付近にある *MQGDDPK* 配列 (ヒト、マウス共通) の *G* と *D* の間で開裂されることが、*DSP* の *C* 末端アミノ酸配列シークエンスから明らかとなっている (Qin *et al.*, *J Bio Chem*, 2001)。*DSPP* の *MQGDDPK* 配列に非常に似た配列を持つタンパクとして、同じ *SIBLING* (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins) family に属し、骨や歯の石灰化に寄与する *DMP-1* (Dentin Matrix Protein-1) がある。*in vitro* において、*DMP-1* の開裂は *BMP-1* (Bone Morphogenic Protein-1) に依存することが報告されており (Steiglitz *et al.*, *J Biol Chem*, 2004)、更に *MQ* 配列を *IH* 配列に置換すると、*DMP-1* の *BMP-1* による開裂が完全に抑制されることが最近報告された (Marschall *et al.*, *J Biol Chem*, 2008)。このような背景から、*DSPP* の開裂も *BMP-1* によって引き起こされている可能性がある。また、*DSPP* は従来、象牙質や骨特異的なタンパクであると報告されていたが、近年、セメント質、肺、腎臓、唾液腺、汗腺においても低レベルながら発現していることが明らかとなっており (Qin *et al.*, *J Dent Res*, 2002; Qin *et al.*, *Connect Tissue Res*, 2003; Ogbureke and Fisher, *J Dent Res*, 2004; Ogbureke and Fisher, *Kidney Int*, 2005; Ogbureke and Fisher, *J Histochem Cytochem*, 2007; Alvares *et al.*, *Dev Dyn*, 2006)、*DSPP* が象牙質形成以外にも何らかの役割を果たしていることが推察されている。特に、唾液

腺組織での DSPP の発現様式がマウス、ヒトで厳密に保存されていることから、DSPP の発現パターンが唾液腺において象牙質同様に種を超えて保存されている可能性が考えられ、DSPP の唾液腺組織発生における機能が注目されつつある。このような背景から、DSPP 欠損マウス及び現在樹立中のマウスモデルを用いて DSPP の象牙質以外での機能、特に唾液腺組織発生についても解明する。

### 3. 研究の方法

#### 研究計画・方法の要旨

normal 及び mutated DSPP cDNA トランスジェニックマウスそれぞれ複数ラインを USA/National Institutes of Health/National Institutes of Dental and Craniofacial Research Dr. Ashok Kulkarni 研究室において樹立し飼育中である。これらマウスの組織切片を用いて、免疫組織学的手法によりトランスジーン象牙質における発現様式及び量を検討する。その後、normal 及び mutated DSPP cDNA トランスジェニックマウスそれぞれ高発現、低発現レベルのラインを選択し、microCT, *in vitro* 象牙芽細胞・骨芽細胞培養などにより、*in vivo* における DSPP 開裂のメカニズムや意義を明らかにする。DSPP 欠損マウス、normal 及び mutated DSPP cDNA トランスジェニックマウスの唾液腺組織の解析には、まず組織学的な検討を行い、その後唾液分泌量の測定といった機能解析を行う。

DSPP プロモーター下で DSPP-IRES-GFP cDNA (normal 及び mutated) を発現させる。IRES (Internal Ribosome Entry Site) とその上下に繋がれた遺伝子は単一の mRNA として発現された後に、別々に翻訳される。よって今回作製中のマウスモデルでは、DSPP (normal または mutated) と GFP が DSPP プロモーター

によって発現誘導されるため、トランスジーン陽性細胞を GFP によりスクリーニング可能である。また、このコンストラクトでは、DSP の重要でないと思われる領域 (4 アミノ酸) を、構造的に近いアミノ酸で置換することにより FLAG tag sequence を導入している。

#### 実験計画

(平成 21 年度)

#### マウスラインの選択 (normal 及び mutated DSPP マウス、それぞれ高、低発現ラインを選択)

現在、normal 及び mutated DSPP マウスそれぞれ複数ラインを維持しており、ラインの選択のために、象牙質におけるトランスジーン由来 DSPP の発現レベルを免疫組織染色により検討する。臼歯及び切歯を含むマウス下顎骨を採取し、4 %PFA にて固定後、EDTA にて十分に脱灰したサンプルをパラフィンに包埋し切片を作製する。抗 FLAG 抗体、抗 DSP (Dr. Larry Fisher, NIDCR, NIH, USA より供与済) 抗体及び、抗 DPP (Dr. Keith Alvares, Northwestern University Medical School, Chicago USA より供与済) 抗体を用いてそれぞれの発現量およびパターンを Wild type マウスと比較し、normal 及び mutated DSPP マウスのそれぞれ複数ラインにおける発現レベルを検討する。これら複数ラインから、normal 及び mutated DSPP マウスそれぞれ高発現、低発現ラインを一つずつ選択し、以後の実験に用いる。

#### Mutated DSPP が *in vivo* において開裂されているかの検討

選択したマウスラインから象牙質由来タンパクをこれまでと同様の方法により抽出する (Suzuki *et al.*, *Matrix Biol*, 2009)。抗 FLAG 抗体、抗 DSP 抗体及び、抗 DPP 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、mutated DSPP マウスラインにおける DSPP

開裂の有無を normal DSPP マウスラインをコントロールとして検討する。もし mutated DSPP マウスにおいて DSPP が開裂されないと、normal DSPP サンプルでは抗 DSP 抗体（抗 FLAG 抗体も同様）と抗 DPP 抗体によるバンドサイズが異なるが、mutated DSPP ではバンドパターンが同一になるはずである。また DSP はプロテオグリカンとして象牙質に存在することが知られており（Yamakoshi *et al.*, *J Biol Chem*, 2005）、トランスジーン由来の DSP が同様に修飾を受けるかを検討するため、コンドロイチナーゼ ABC 処理の有無によるバンドパターンの違いも検討する。

#### 表現型の解析 (H&E 染色、X-ray、micro CT)

選択した 1, 2, 3 ヶ月週齢のマウスから臼歯サンプルを回収し、組織切片を作製し、H&E 染色にて象牙質、前象牙質の形態を観察する。特に、前象牙質の幅や石灰化前線の形状を調べる。また、X-ray を撮影し象牙質石灰化度や歯髄腔の大きさの検討を行う。X-ray にて normal と mutated DSPP 間に象牙質石灰化度や歯髄腔の大きさに差があると思われる場合は micro CT による定量的計測を行う。micro CT 撮影及びデータの解析は National Institutes of Biomechanics, ETH Zurich, Switzerland の Dr. Ralph Muller グループ（Hildebrand *et al.*, 1999; Nazarian *et al.*, 2008）との共同研究で行う予定である。Normal DSPP マウスの象牙質を解析することにより、DSPP 過剰発現の象牙質形成への影響を検討する。また、mutated DSPP マウスの表現型を解析する。もし、mutated DSPP が *in vivo* で開裂されなかった場合、その DSPP タンパクは象牙芽細胞から象牙質への分泌が著しく抑制されるのではと推定している。申請者は DSPP が象牙芽細胞内で開裂されてから、DSP、DPP それぞれが細胞外に分泌されると考えており（細胞内外どちらで開裂される

のかはまだ結論が出ていない）、このマウスモデルでその仮定への結論が得られるものと考えている。また DSPP 遺伝子異常に起因する象牙質形成不全症患者の歯では、DSPP タンパクだけでなくコラーゲンなどの他の細胞外基質の分泌も抑制されており、これは異常な DSPP タンパクが小胞体—ゴルジ体に停留することで、他のタンパクの分泌をも阻害しているものと推定されている。このような背景から、もし mutated DSPP が開裂されなかった場合、同様に象牙芽細胞内に停留すると考えられ、mutated DSPP マウスは象牙質形成不全症の *in vivo* モデルになりえる可能性がある。

（平成 22 年度）

#### DSPP 欠損バックボーンにおける表現解析

もし、これらトランスジェニックマウスに明らかな表現型が認められなかった場合、これらマウスを DSPP 欠損マウスと掛け合わせ、内在性 DSPP が無い状態において normal 及び mutated DSPP を発現させる。表現型の解析結果により以下の結論が導き出される。

- a. DSPP 欠損マウスの表現型が normal DSPP でレスキューされるが、mutated DSPP ではレスキューされなかった場合。Mutated DSPP は機能的ではない。つまり、DSPP の開裂がその機能発現に必須である。
- b. DSPP 欠損マウスの表現型が normal 及び mutated DSPP でレスキューされた場合、*in vivo* において、BMP-1 非依存的な DSPP の開裂が起こっていると考えられる。この場合、象牙芽細胞近傍に存在する他の酵素、例えば MMP-2、MMP-20 などの Matrix Metalloproteinases が DSPP 開裂に関与していることが考えられるため、recombinant タンパクを用いた *in vitro* assay で DSPP 開裂に重要な酵素を同定することを試みる。

## 象牙芽細胞培養

Normal 及び mutated DSPP マウス (DSPP 欠損バックブーンを用いるか否かは *in vivo* の表現型による) の切歯および臼歯から象牙芽細胞を回収しその培養を試みる。歯髄の細胞群で象牙芽細胞は非常に少数でありその単離は困難であるが、我々のマウスモデルにおいては GFP により象牙芽細胞のみをソーティング可能である。生後 1 ヶ月マウスの歯髄を顕微鏡下でスクレープすることにより生細胞を回収し、コラゲナーゼで単細胞に分離後 FACS ソーティングを行う。GFP 陽性細胞のみを回収し *in vitro* での培養を行い normal と mutated DSPP の機能的差異 (細胞外基質産生量、石灰化能等) を解析する。

## 4. 研究成果

研究者らは遺伝子改変マウスを用いた研究を当初検討していたが、米国からのマウス搬入並びに、その後広島大学での卵凍結保存によるクリーンアップに時間を要し、研究機関内でのマウスの表現型解析は現在検討中である。代わりに、*in vitro* での実験系を構築し、研究課題に対する検討を行い、一定の結論を得ることができた。具体的な検討方法、結果を以下に示す。正常及び開裂抵抗性 DSPP expressing retrovirus の作製：マウス切歯 cDNA をテンプレートとした PCR により、DSPP タンパクコード領域 (正常 DSPP をコード) のクローニングを行った。次に、mutagenesis kit を用いて、BMP-1 認識配列である MQ (メチオニン-グルタミン) を IH (イソロイシン-ヒスチジン) に置換し、開裂抵抗性 DSPP のクローニングを行った。これら正常及び開裂抵抗性 DSPP クローンを retrovirus expression vector にそれぞれ ligation した。

2. 正常及び開裂抵抗性 DSPP 安定発現株の樹立：293 細胞を用いて通法に従いレトロウイルスを作製し、MC3T3 (マウス前骨芽細胞株)

及び C3H/10T1/2 (マウス間葉系幹細胞株) に感染させた。その後 G418 で選択培養を行い、それぞれ複数の安定発現細胞株を樹立した。

3. DSP 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により細胞上清中の DSP (DSPP) のサイズや発現量の検討を行った。MC3T3 細胞株では、正常 DSPP、開裂抵抗性 DSPP、コントロールそれぞれ 3 種のクローン用安定発現株を、C3H/10T1/2 ではそれぞれ 2 種の安定発現株を作製した。これら細胞上清中の DSP のタンパクサイズ並びに量を DSP 特異抗体によるウエスタンブロッティングにて解析した結果、MC3T3、C3H/10T1/2 共に正常 DSPP では 100kDa 以下にスメアーに広がるバンドを認めた。開裂抵抗性 DSPP では 100kDa 以上に強いバンドを認め、100kDa 以下には全くバンドを認めなかった。コントロールではバンドを認めなかった。以上の結果より、MC3T3、C3H/10T1/2 を用いて、それぞれ正常及び開裂抵抗性 DSPP を発現する安定細胞株を樹立することに成功した。更に、ウエスタンブロッティングの結果から、DSPP の開裂抑制はその細胞外分泌を抑制しないだけでなく、更に開裂抵抗性 DSPP では正常 DSPP より強いバンドシグナルを認めることが明らかとなった。また、開裂抵抗性 DSPP において 100kDa 以下にバンドを認めなかったことから、DSPP の開裂が完全に抑制されていることも示唆された。これら結果から DSPP の開裂はその分泌に影響を与える可能性が示唆されたが、正常及び開裂抵抗性 DSPP の細胞分化や石灰化に対する影響については現在検討中である。

## 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 2 件)

① A method for rapid demineralization of teeth and bones.

Cho, A., Suzuki, S., Hatakeyama, J.,

Haruyama, N., and Kulkarni, A. B.  
Open Dent J. 2010 Dec 15;4:223-9. (査  
読有り)

② Extracellular heat shock protein  
HSP90beta secreted by MG63 osteosarcoma  
cells inhibits activation of latent  
TGF-beta1.

Suzuki, S., and Kulkarni, A. B.  
Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jul  
30;398(3):525-31. (査読有り)

[学会発表] (計4件)

① Suzuki S., Nishimura F. The  
Establishment of Stable Cell Lines  
Expressing Cleavage-resistant Dentin  
Sialophosphoprotein **IADR 89th General  
Session and Exhibition 2011 San Diego** 16-19  
Mar 2011

② 鈴木茂樹、小武家誠司、西村英紀開裂抵  
抗性 Dentin sialophosphoprotein 発現株の  
作製 第133回日本歯科保存学会学術大会 岐  
阜 28, 29 Oct 2010

③ Suzuki S., Nishimura F. Dentin  
sialoprotein and dentin phosphoprotein  
have distinct roles in dentin  
mineralization 3<sup>rd</sup> Hiroshima Conference of  
Education and Science in Dentistry  
Hiroshima Nov 2, 3 2009

④ 鈴木茂樹 西村英紀、象牙質形成におけ  
る Dentin sialoprotein 及び Dentin  
phosphoprotein の機能解析 第131回日本歯  
科保存学会学術大会 仙台 29, 30 Oct 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 茂樹 (SUZUKI SHIGEKI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：30549762

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (2) 連携研究者

( )

研究者番号：