

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 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22792040

研究課題名（和文） 象牙質細胞外マトリクスによる骨代謝制御医薬の新規開発

研究課題名（英文） Implications for novel drug development in bone metabolism: Beyond the dentin extracellular matrix.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、歯の象牙質に多く存在する細胞外基質タンパクである象牙質シアロリン酸化タンパク (DSPP) が、骨代謝に影響をあたえるか否かとそのメカニズムについて調べた。DSPP を持たないマウスと通常のマウスの骨を比較すると、DSPP を持たないマウスの方の骨の密度が低かった。しかし、頭蓋冠の器官培養系では、通常と比べ DSPP が存在しないと骨を吸収する破骨細胞の数が少なくなった。さらに骨髄由来間葉系細胞を用いて DSPP の役割を調べた結果、DSPP により、培養細胞が骨を作る細胞に変化しやすくなり、DSPP が存在しないと脂肪細胞に変化しやすいことがわかった。これらの結果から、DSPP は骨を作る細胞と吸収する細胞に、それぞれ独立した作用をもたらし、主に骨を造る作用を増強することで結果としてマウスの骨の密度を増加していることが示され、骨代謝制御に利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined the effects of dentin sialophosphoprotein (DSPP), one of the major extracellular matrix proteins in dentin, on bone turnover in vivo and in vitro. According to micro CT analysis, DSPP knock out (KO) mouse femora showed significantly decreased bone mineral density as compared to those in DSPP wild type (WT) mice. However, calvarial organ culture analysis revealed that the decreased osteoclastogenesis in DSPP KO as compared to WT calvaria. Using bone marrow stromal cells (BMSCs) isolated from both WT and KO mice, we found that under the osteogenic media, ALP activity and in vitro mineralization were higher in BMSCs derived from WT mice as compared to those from KO mice. On the other hand, the KO derived BMSCs showed increased differentiation into adipocytes as compared to those from WT mice. Thus, the DSPP may be a positive regulator for the bone mineral density, promoting the bone formation but not suppressing the bone resorption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：細胞外マトリクス・象牙質シアロリン酸化タンパク・骨代謝・間葉系幹細胞・歯学

1. 研究開始当初の背景

抜歯後や加齢時、歯周病罹患時にみられる歯槽骨・顎骨の喪失、矯正治療時の歯の移動や、歯槽骨退縮などには、歯根周囲の骨吸収と骨形成反応のバランスが影響している。この骨の反応に影響を与える因子として、メカニカルストレスなど物理的因子の他に、様々なサイトカインやホルモン、細胞外マトリクスタンパク、マトリクス分解酵素など種々の生物学的因子が同定されてきたが、歯槽骨喪失を回復あるいは予防するために臨床応用に至っているものは数少ない。その中で、歯周組織再生に用いられているエムドゲインの主成分であるエナメルマトリクスタンパクのアメロジェニンについて、応募者はその作用の一端を解明してきた (J Dent Res. 2006;85(2):144-9)。それは、本来歯に発現しているアメロジェニンが破骨細胞の形成を抑制することで骨代謝に影響を与えるというものであった。

ところで、歯の象牙質に非コラーゲン性の細胞外マトリックスとして最も多く発現しているのは象牙質シアロリン酸化タンパク質(dentin sialophosphoprotein: DSPP)である。DSPPは、歯から発見されたためかその骨における薬理的・生物学的作用に関して近年まであまり注目されることがなかった。そのような中、象牙芽細胞特異的な細胞外マトリックスと考えられていた象牙質シアロリン酸化タンパク質(dentin sialophosphoprotein: DSPP)が、骨(Nat Genet. 2001;27:201-4)や易骨転移性の前立腺癌(Int J Cancer 2006 118:850-6)にも発現していることが明らかになった。また、応募者を含むグループの最近の研究から、DSPPは象牙芽細胞のみならず骨芽細胞および骨細胞の一部に発現し、Dspk 遺伝子欠損(DSPP KO)マウスは象牙質形成不全症を示すだけでなく(J Biol Chem2003;278:24874-80)、骨密度と骨の石灰化度が有意に変化していることが判り(Bone. 2008 ; 43(6):983-90、および未発表データ)、DSPPは骨においても重要な役割を果たしていると推測されるようになった。

DSPP タンパクは、DSPP 遺伝子から連続した1本のポリペプチド鎖として合成され、その後早期に切断されて、象牙質シアロタンパク(DSP)と象牙質フォスフォリン(DPP)となると考えられている。それぞれのタンパクの役割に関しては依然不明な点が多いものの、DSPPはSIBLING(Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein)ファミリーに属するので、RDG配列を介してインテグリン・CD44等へ接着することが予想された。かつ上記予備の結果から、歯のみならず骨に関して幅広く作用し

ていることが考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、骨の組織分化、形成・吸収におけるDSPPの役割を同定し基礎的情報を得ることを目的とした。

(1) 具体的には

① DSPPはインテグリンを介したシグナル伝達を引き起こし、骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進する(若しくは他の間葉系細胞への分化を抑制する)。

② DSPPの存在は破骨細胞のマトリクスへの接着能を抑制し、破骨細胞による骨吸収を抑制する。

という仮説をin vivo・in vitroの実験から検証することとした。

(2) 次に、新規骨形成促進ペプチド、歯周病治療薬、あるいは修復象牙質形成促進剤の開発など、歯科臨床への貢献につながるデータを得るために、DSPP中で薬理活性を持つ部分を検索することとした。

3. 研究の方法

本研究は、研究目的に示した仮説を検証するため、まずDSPPの存在・非存在下での、

(1) Dspk KOマウス由来歯・骨ディスクおよびリコンビナントDSPPを用い、DSPPの骨吸収への影響の検討を検討した

(2) Dspk KOマウス由来の細胞培養系などを用い、骨芽細胞など間葉系細胞分化への影響を解析した。

(3) 各週齢のDspk WT・KOマウスの骨の表現型について、マイクロCTを用いたX線学的計測を行った。

(4) DSPPのインテグリンを介したシグナル伝達機構と活性ペプチド検索をWestern Blotting法を中心に行った。

4. 研究成果

(1) 骨吸収に対するDSPPの影響の検討

Dspk WT・KOマウス切歯象牙質ディスク片を96well培養プレート内に静置後、単球マクロファージ系細胞を播種、象牙質ディスク上の吸収窩の面積を酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色後に計測することで、DSPPの骨吸収への影響を調べた。しかし十分な数の破骨細胞形成が象牙質ディスク上に見られなかつたため、有意な差はみられなかつた。そこで、DSPP KOマウスおよびWTの頭蓋冠器官培養系を用いて、破骨細胞形成数の差の有無についてTRAP染色後計測を行った結果、WTに比べKOにおいて破骨細胞形成数が有意に減少していた。破骨細胞あたりの面積は遺伝子型の違いにより有意差はなかつた。

(2) Dspk KOマウス由来間葉系幹細胞を用いた、間葉系細胞分化能への影響の検討

WT・KO マウスより、骨髄由来間葉系幹細胞を採取し、骨細胞、脂肪細胞への分化促進培地内で培養し、骨細胞への分化を培養開始 14、28 日後、脂肪細胞への分化を 3 日後に評価した。骨細胞への分化能を、ALP 活性、Alizarin red 染色によって確認したところ、WT 由来細胞の骨細胞分化能が KO マウス由来細胞よりも有意に高かった。反対に、脂肪細胞分化能は KO マウス由来細胞のほうが有意に高いことが、Oil red 染色によってわかった。WT・KO マウス骨髄中の間葉系細胞数をコロニー形成数 (CFU) で計測し、あわせて間葉系細胞の増殖能も BrdU 取り込み能を比較し評価を行ったところ、CFU に差はなかったものの、WT 由来細胞の増殖能は KO 由来細胞よりも高かった。

(3) マイクロCTを用いたWT・KOマウスの骨密度計測

各週齢のDSPP WT・KOマウスの骨の表現型について、マイクロCTを用いたX線学的計測を行うため試料採取をおこない、骨密度やASBMR 基準による骨パラメーターを計測した。その結果、WTマウス大腿骨遠位端骨密度はKOマウスに比べて、1年齢以降において高い傾向が見られたが統計学的な有意差はなかった。また、8週目にて卵巣摘出術を行なって4週後に同様に計測をしたところ、WTと比較してKOマウスのほうが、OVX後骨密度がより低下している傾向が見られた。十分なサンプル量を得た後に改めて統計学的な処理を行うため、現在も継続して分析を行なっている。

(4) Dspp 由来 RGD 含有ペプチドを用いた、頭蓋冠由来間葉系細胞の分化への影響の検討

WT・KO マウス頭蓋冠より間葉系細胞を酵素処理にて分離し、骨細胞、脂肪細胞への分化促進培地内で DSPP 由来 RGD 含有ペプチド存在下・非存在下にて培養を行い、細胞分化の様相を比較した。DSPP 由来配列含有ペプチドは、RGD 配列を含む配列を中心に 8 種類を合成し、2 つの異なる濃度 (100nM、および 1 μ M) を含むよう培地を調整して培養を行った。その結果、DSPP 由来 RGD 含有ペプチドを含んだ培地にて培養した細胞のほうが、RGE 含有コントロールペプチドよりも骨細胞分化が抑制された。また、脂肪分化に関しては、DSPP 由来 RGD 含有ペプチドを含んだ培地にて培養した細胞のほうが脂肪分化が促進した。これは、先に骨髄由来間葉系細胞で得られた結果と相反すると考えられた。そこで、実際にどのような細胞内シグナル伝達が行われているかを確認するため、インテグリン下流の ERK1/2 のリン酸化を Western blotting で確認した。WT, KO 由来の骨髄由来間葉系細胞、頭蓋冠由来の骨芽細胞共に、WT と比較して

KO 由来の細胞において ERK1/2 のリン酸化は低下していた。一方、DSPP 由来 RGD 含有ペプチドは添加初期に ERK のリン酸化が急速に上昇するもののその後のリン酸化は添加前よりむしろ低下したレベルが維持されることから、DSPP 由来の合成ペプチドはインテグリンに結合するものの、その後他のインテグリン経由シグナルをむしろ抑制する可能性が示された。一方、細胞から分泌されている内在性 DSPP は、合成ペプチドとは異なりインテグリンを介して骨細胞分化を促進するシグナルを伝達している可能性がある。しかしこれに関しては未解明な部分が多く、共同研究者と今後詳細なメカニズムを解明する予定である。

以上、本研究課題から得られた、間葉系細胞の分化に関して得られる知見は、幹細胞分化に関連した再生医療における基礎的知識の底上げにつながるとかんがえられ、インテグリンシグナルを変化させることで、歯槽骨退縮の回復、歯周病治療薬、あるいは象牙質再生促進を期待できる薬剤の開発など、硬組織関連疾患を有する多数の人々の QOL 向上に役立つことが期待される。

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 8 件)

1. Mitani K, Haruyama N, Hatakeyama J, Igarashi K. Amelogenin splice isoforms stimulate chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Oral Dis.* 査読有り, 2013 Mar;19(2): 169-79. Epub 2012 Aug 2. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2012.01967.x>
2. Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol.* 査読有り, 2012 Sep;57(9):1165-75. Epub 2012 Apr 24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.03.005>
3. 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*. 査読有り, 2012 June;71(2):51-58
<http://dx.doi.org/10.1016/j.odw.2012.01.003>

4. 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*. 査読有り, 2012 Mar;82(2):284-93.
<http://dx.doi.org/10.2319/033111-231.1>
5. Haruyama N, Hatakeyama J, Moriyama K, Kulkarni AB. Amelogenins: Multi-functional enamel matrix proteins and their binding partners. *J Oral Biosci*. 査読有り, 2011 Aug;53(3):257-66.
<http://dx.doi.org/10.2330/joralbiosci.53.257>
6. Ma D, Zhang R, Rios HF, Haruyama N, Sun Y, Xie Y, Kulkarni AB, Qin C, Feng JQ. A novel role of Periostin in postnatal tooth formation and mineralization. *J Biol Chem*. 査読有り, 2011 Feb 11;286(6):4302-09 Epub 2010 Dec 3.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.140202>
7. Cho A, Suzuki S, Hatakeyama J, Haruyama N, Kulkarni AB. A Method for Rapid Demineralization of Teeth and Bones. *Open Dent J*. 査読有り, 2010 Dec 15;4:223-229.
<http://dx.doi.org/10.2174/1874210601004010223>
8. Choi SJ, Song IS, Feng JQ, Gao T, Haruyama N, Gautam P, Robey PG, Hart TC. Mutant DLX 3 disrupts odontoblast polarization and dentin formation. *Dev Biol*. 査読有り, 2010; Aug 15;344(2):682-92.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.05.499>

[学会発表] (計 5 件)

1. Haruyama N : Amelogenins : Multifaceted enamel matrix proteins

in hard tissue biology. Molecular Science in Oral-Systemic Medicine - Autumn Seminar -, Tokyo Medical & Dental University, the 7th Global COE International Symposium. Tokyo, Japan. Nov. 12-14, 2012.

2. アッカラソンスアップ パピーナラット, 春山直人, 松本力, 志賀百年, 森山啓司. ペリオスチンはヒト歯根膜細胞における低酸素誘導性アポトーシスを抑制する. 第 71 回日本矯正歯科学会、盛岡、平成 24 年 9 月 26-28 日
3. 片岡恵一, 小川卓也, 春山直人, 小林起穂, 阿彦希, 大宅彩, 東堀紀尚, 森山啓司. 創内型装置を用いて上顎骨延長法を行った口唇裂・口蓋裂症例における術後変化. 第 36 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、京都、平成 24 年 5 月 24-2
4. 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. Nagoya, Japan October 17-20, 2011
5. 春山直人 : Amelogenins: Multi-functional enamel matrix proteins. 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 -」. 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

[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0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/cmn/gcoe/reports/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし