

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593050

研究課題名(和文) 歯根吸収抵抗性細胞群の分子機構 - 上皮間葉転換由来セメント芽細胞のBSP発現 -

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of BSP gene transcription on cementblast

研究代表者

山内 雅人 (Yamauchi, Masato)

神奈川県立歯科大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30230311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換によりヘルトウィッチの上皮鞘由来細胞から移行するセメント芽細胞の骨シアロ蛋白質(BSP)発現とその転写調節やクロマチン制御を検討した。BSP遺伝子の転写制御領域には3か所のRunx2応答性領域(OSE2-1～OSE2-3)が存在した。BMP-2は前骨芽細胞のBSPの遺伝子発現を促進し、すべてのOSE2の転写活性の上昇とクロマチンレベルでのRunx2との結合を促進した。一方、TGF-β1はBSP遺伝子の発現を転写レベルで抑制した。以上からBSP遺伝子の3か所のOSE2には、増殖因子に反応して、その遺伝子発現を正負に制御するRunx2応答性の転写制御機構が存在することが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone Sialoprotein(BSP) is a tissue-specific marker of cementblast cells which has shown to be transformed from Hertwig's epithelial cells. To elucidate the mechanisms of gene transcription, 3 putative osteoblast specific element 2 consensus motif(OSE2-1～OSE2-3) were investigated the ability of Runx2 to interact with cognate cis-acting elements. Forced expression of Runx2 induced 14 fold enhancement of transcription activity observed with the 6 x tandem repeats of OSE2-2 and 3 fold enhancement with that of OSE2-3, whereas 60% significant reduction was observed with that of OSE2-1. Chromatin immunoprecipitation analyses revealed Runx2 were significantly higher recruited to OSE2-2 than to other OSE2s in vivo. BMP-2 increased Runx2 binding to these OSE2s and its transcription, whereas obvious reduction of OSE2-2 transcription induced by TGF-beta 1. These data suggested that the coordinated regulation of chromatin on respective OSE2s with Runx2 were modulated by TGF-beta/BMP signals.

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：骨シアロ蛋白質 Runx2 BMP-2

1. 研究開始当初の背景

近年、成人矯正治療の需要が急激に増加に伴い、不可逆的な歯根吸収の潜在的なリスクは高くなっている。矯正力による歯根吸収を予知し、予防し、さらに効果的な治療法が存在すれば、進化する矯正治療がより安全になる事は確実である。そのためには、歯根吸収の発症と修復機構を解明することが喫緊の課題である。本研究においては、これまでの研究結果から推察される下記の作業仮説を学術的背景とした。Reitan が提唱する歯根吸収抵抗性の細胞群の主体は HERS 細胞とセメント芽細胞であり、アメロジェニンあるいは TGF- β 1 のオートクライン制御により HERS 細胞は上皮間葉転換を経て、セメント芽細胞に移行する。さらに同様の制御あるいは BMP-2 等の局所に存在する増殖因子の刺激によりセメント芽細胞は BSP を発現してセメント質基質を合成する。同時に破骨細胞誘導を阻害するようにセメント芽細胞の RANKL の発現は低下している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上皮間葉転換により HERS 細胞から移行するという報告のあるセメント芽細胞の骨シアロ蛋白質(BSP)発現とその転写調節機構に焦点を当て、そのオートクライン、パラクライン制御にかかわるアメロジェニンや TGF- β 1 あるいは BMP-2 の影響を検討することである。BSP 遺伝子の発現は間葉系硬組織特異性が強く、上皮系細胞での発現は報告がない。そのため、HERS 細胞からセメント芽細胞に移行する際には未解明の転写制御を受けて BSP 遺伝子の発現スイッチの On/Off を行うはずである。その際には BSP 遺伝子の高次クロマチン構造がエピジェネティックな制御を受けて開放型のヌークレオソーム構造に変

化していることになる。MacDougall M. ら (Arch Oral Biol 2005) の鎖骨頭蓋異形成症のセメント質形成異常の研究から、セメント芽細胞の BSP 発現に転写因子 Runx2 が関与している事を強く示唆している。申請者は、これまでマウス骨シアロ蛋白質(BSP)のプロモーター中の転写調節領域をクローニングし、その Runx2 による BSP 遺伝子発現調節機構の一部を報告してきた。本研究においては、上述の目的のため HERS 細胞とセメント芽細胞の上皮間葉転換において関与すると思われるアメロジェニンや TGF- β 1 あるいは BMP-2 が、セメント芽細胞の Runx2 応答性領域を含むマウス BSP 遺伝子の転写制御、またそのクロマチン構造のエピジェネティック制御にどのような影響を与えるかを検討した。

3. 研究の方法

(1)培養後 Sub-confluent に達したマウス歯小嚢由来前駆体細胞 MDFE6 127 と前骨芽細胞 MC3T3E1 細胞に 100 ng/ml の BMP-2、1ng/ml の TGF- β 1、1 μ g/ml の大腸菌発現系を用いたマウス全長アメロジェニン (rM179) を 24 時間添加した。各種条件の細胞から全 RNA を Isogen RNA isolation kit により抽出し、等量の全 RNA を用いて RT 反応を行った。Real-time PCR 定量法により、GAPDH を内部コントロールとして Runx2 あるいは BSP の mRNA 発現量を C3H10T1/2 の発現量と相対比較した。

(2)マウス genomic library から骨シアロ蛋白質 (BSP) の遺伝子転写制御領域の転写開始点上流 9.0 kb を長さクローニングし、その長さの異なる断片をルシフェラーゼ発現ベクター-pGL3(Promega)にサブクローニングする。さらに、各 Runx2 認識配列(0SE2-1~0SE2-3)を含む遺伝子断片(20bp)の 6 x 断片を合成し、

BSP 遺伝子転写開始点上流プロモーター領域 146bp を結合させたキメラ遺伝子を作成し、同様にサブクローニングした (pLuc 6xC1, pLuc 6xC2 と pLuc 6xC3)。24 マルチウエルプレートに播種した線維芽細胞 C3H10T1/2 を 24 時間培養後、lipofectAMINE と plus Reagent を用いて各種コンストラクトの一過性トランスフェクションを行った。24 時間後に 100ng/ml の BMP2、1ng/ml の TGF-1、1 μg/ml のアメロジェニン (rM179) を添加し、さらに 24 時間後、Dual luciferase reporter system (Promega) を用いて転写活性を測定した。

(3) コンフルエントに達した MC3T3E1 細胞を 1% formaldehyde で 10 分間固定し、ChIP-IT™ Express Enzymatic (Active Motif) の酵素を用いて断片化した可溶性クロマチン分画を得た。各分画に Runx2 モノクローナル抗体 (CST 社製) と protein G 磁気ビーズを加えて免疫沈降を行った。洗浄後、クロマチンを溶出、脱架橋し、Runx2 抗体と結合していた DNA の精製を行った。その定量は SYBR® Green I アッセイによる real-time PCR 後、Comparative Ct 法を用いて行った。10% Input サンプルにより標準化されたサンプルの Δ Ct 値は GAPDH locus から得られる Δ Ct 値を減ずることにより $\Delta\Delta$ Ct 値を求めて、比較定量した。KAT3B/p300、HDAC3、HDAC4、Histone H3K9ac、Histone H3K9me2、Histone H3K27ac、Histone H3K27me3 モノクローナル抗体 (Active Motif 社製) も同様に反応させた。

4. 研究成果

(1) BMP-2, TGF-1 あるいはアメロジェニン (rM179) の遺伝子発現に及ぼす影響

qPCR 分析の結果、BMP-2 は MC3T3E1 細胞の Runx2 遺伝子発現を 2.4 ± 0.4 倍上昇させ、BSP 遺伝子発現を 5.3 ± 0.7 倍上昇させた。一方、TGF-1 は MC3T3E1 細胞の Runx2 遺伝子発現を $45 \pm 5\%$ 減少させ、BSP 遺伝子発現を $62\% \pm 7\%$ 減少させた。同様に、マウス歯小嚢由来前駆体細胞 MDFE6 127 では、BMP-2 は Runx2 遺伝子発現を 1.5 ± 0.25 倍上昇させ、BSP 遺伝子発現を 5.3 ± 0.7 倍上昇させた。一方 TGF-1 は MDFE6 127 の Runx2 遺伝子発現を $32 \pm 3\%$ 減少させ、BSP 遺伝子発現を $52 \pm 6\%$ 減少させた。尚、qPCR 分析の結果、アメロジェニン (rM179) は MC3T3E1 の Runx2 と BSP 遺伝子発現に対して促進的傾向は持つものの、有意差を持つ変化を与えなかった。また、同様にアメロジェニン (rM179) は MDFE6 127 の Runx2 と BSP 遺伝子発現に対して、促進的効果をもつものの、有意差を持つ変化を与えなかった。

(2) BMP2, TGF-1 が BSP 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

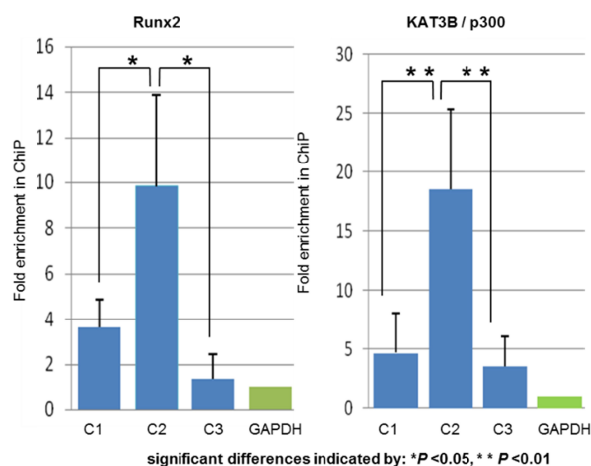
C3H10T1/2 細胞に対する一過性 transfection 分析から、OSE2-2 ならびに OSE2-3 を含む pLuc G-X (nts -9256 to +30) construct では Runx2 発現ベクター添加により約 1.67 倍の有意な転写活性の促進を示した。同様に、pLuc E-X (nts -5431 to +30) construct では Runx2 発現ベクター添加により約 1.9 倍の有意な活性促進を示した。各 OSE2 を含む遺伝子領域の 6x 連続断片を含む constructs 用いて Runx2 の効果を同様に検討した。Runx2 発現ベクター添加により、pLuc 6xC2 で約 14 倍に、pLuc 6xC3 では約 3 倍の有意な転写活性の促進を示した。一方、pLuc 6xC1 では約 60% の有意な転写活性の抑制を示した。Runx2 発現ベク

ターと BMP-2 を同時に添加した場合は非添加群では、Runx2 発現ベクターのみ加えた群に比較して pLuc 6xC2 と pLuc 6xC3 では約 2 倍の有意な活性促進を示した。また、興味深い事に、pLuc 6xC1 では約 3 倍の有意な活性上昇を示した。一方、Runx2 発現ベクターと TGF- β 1 を同時に添加した場合は、pLuc 6xC2 では約 30%への活性抑制が認められた。また、pLuc 6xC3 の Runx2 による転写活性の促進効果に影響を与えなかった。さらに pLuc 6xC1 の転写活性の抑制効果を阻害し、約 2 倍の促進効果を示した。以上の事から BMP-2 と TGF- β 1 は異なる Smad 分子等が関わるシグナルカスケードを用いて、BSP 遺伝子の Runx2 を介する遺伝子転写制御機構に正負の影響を与えている事が強く示唆された。BMP-2 の刺激により OSE2-2 は通常の約 30 倍の転写促進効果を示すが、TGF- β 1 の刺激では Runx2 による促進効果は 30%までに阻害される。一方、OSE2-1 は通常の BSP の遺伝子発現では負の制御を行っているが、BMP-2 や TGF- β 1 の刺激により正に制御されていた。

(3)ChIP 分析による BSP 遺伝子の Runx2 を介する転写制御機構の解析

各 OSE2 を含む BSP 遺伝子領域の Runx2 による転写活性の相違は、Runx2 に対する結合能の差異のみならずクロマチンを構成する histone 分子のアセチル化やメチル化ならびにクロマチン修飾因子の作用があると考えられた。そこで ChIP 分析を用いて、各 OSE2 と関連蛋白質群との結合性を比較検討した。その結果、OSE2-2 は Runx2、KAT3B/p300、Histone H3K9ac ならびに H3k27ac との結合性が OSE2-1 と OSE2-3 と比較して有意に高い事が示された(右図参照)。同じく OSE2-2 は HDAC3、HDAC4 ならびに Histone H3K27me3 との結合性が有意

に低い事が示された。一方、OSE2-1 では HDAC3 ならびに HDAC4 との結合性が OSE2-2 と OSE2-3 と比較して有意に高い事が示された。以上の事から、OSE2-2 の Runx2 による転写促進作用は Runx2 自体の結合能の高さのみならず、Histone3K9、Histone3K27 のアセチル化や Histone アセチル化酵素である KAT3B/p300 との協調によるものと考察された。一方、OSE2-1 の Runx2 による転写抑制作用は Runx2 の結合はあっても HDAC3 と HDAC4 の干渉による HistoneH3K27 のメチル化によって協調されているものと考察された。今回の報告の範囲では、OSE2-3 の Runx2 による転写促進の機構の解釈については不明であった。本研究により BSP 遺伝子の Runx2 による転写調節は Histone 分子の修飾やクロマチン修飾因子との協調により、OSE2-2 では正に、OSE2-1 では負に制御されている事が強く示唆された。



(4)BMP-2 と TGF- β 1 の BSP 遺伝子の転写制御機構への影響

BMP-2 を添加した MC3T3E1 細胞からクロマチンを溶出し、Runx2 抗体と結合していた DNA を用いて ChIP 分析を行った。BMP-2 非添加群と比較して in vivo での Runx2 との結合能がすべての OSE2 で約 3 倍に上昇していた。一方、

TGF- 1 は非添加群と比較して、すべての OSE2 に対する Runx2 との結合能に有意差のある変化を与えなかった。

(5)結論ならびに考察

以上の事から、今回の申請では BSP の遺伝子転写制御領域には Runx2-OSE2s の分子スイッチ存在し、その遺伝子発現を正負に制御する事が確認された。さらに、骨芽細胞やセメント芽細胞の BSP 発現が、異なる増殖因子による Runx2-OSEs 経路を介して正負に制御されている事を示した。しかしながら、異なる増殖因子がどのようなシグナル因子やクロマチン修飾因子を誘導して Runx2 を介する BSP 遺伝子の転写制御を調節しているかは現在検討中である。今後、本申請期間では検討するまでに至らなかった課題として、ヘルトウィッチの上皮鞘由来細胞が TGF- 1 やアメロジェニンに応答して、BSP 発現を示すセメント芽細胞に移行するかどうか、移行時における BSP 発現に関わるシグナル伝達、転写制御、クロマチン制御がいかなるものかを明らかにする事が必要である。

5. 主なる発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Saito M, Kurokawa M, Oda M, Oshima M, Tsutsui K, Nakao K, Ogawa M, Manabe R, Suda N, Ganjargal G, Hada Y, Noguchi T, Teranaka T, Sekiguchi K, Yoneda T, Tsuji T. ADAMT SL6beta protein rescues fibrillin-1 microfibril disorder in a Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. J Biol Chem. 2011 Nov 4;

286(4):38602-38613. 査読有
DOI:10.1074/jbc.M1111.243451

Saito M, Tsuji T. Molecular Mechanisms for the improvement of wound healing ability of periodontal ligament in Marfan's syndrome. Clin Calcium. 2012 Jan; 22(1):35-42. 査読有
DOI: CliCa12013542

Saito M, Tsuji T. Extracellular matrix administration as a potential therapeutic strategy for periodontal ligament regeneration. Expert Opin Biol Ther. 2012 Mar;12(3):299-309. 査読有
DOI:10.1517/14712598.2012.655267

Yasukawa M, Ishida K, Yuge Y, Hanaoka M, Minami Y, Ogawa M, Sasaki T, Saito M, Tsuji T. Dpysl4 is involved in tooth morphogenesis through growth regulation, polarization and differentiation of dental epithelial cells. Int J Biol Sci. 2013 Apr 26; 9(4):382-90 査読有
DOI:10.1111/gtc.12067

Ishida K, Yuge Y, Hanaoka M, Yasukawa M, Minami Y, Ogawa M, Maumoto KH, Shigeyoshi Y, Saito M, Tsuji T. Gadd45g regulates dental epithelial cell proliferation through growth p38 MAPK-mediated p21 expression. Genes Cells.2013 Aug;18(8):660-671. 査読有
Doi:10.1111/gtc.12067

Koizumi Y, Kawashima N, Yamamoto M, Takimoto K, Zhou M, Suzuki N, Saito

M, Harada H, Suda H. Wnt11 expression in rat dental pulp and promotional effects of Wnt signaling on odontoblast differentiation. Congenit Anom (Kyoto). 2013 Sep;53(3):101-108. 査読有 DOI:10.1111/cga.12011
Yamamoto M, Kawashima N, Takashino N, Koizumi Y, Takimoto K, Suzuki N, Saito M, Suda H. Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation on dental pulp cells. Arch Oral Biol. 2014 Mar; 59(3):310-317. 査読有 DOI:10.1016/j.archoralbio.2013.12.006

[学会発表] (計 10 件)

山内雅人 多数の埋伏過剰歯を伴う cleidocranial dysplasia の一例 - 歯顎顔面用コーンビーム X 線 CT 画像の有用性 - 第 70 回日本矯正歯科学会大会 2011. 10.17-18 名古屋

草柳真理子 中頭蓋窩の前下方傾斜と上下顎骨の垂直的成長方向変化の研究 -counterpart 分析による検討- 第 70 回日本矯正歯科学会大会 2011.10.17-18 名古屋

佐久間秀二 上顎臼歯部歯槽骨の水平的成長発育変化に関する研究 第 70 回日本矯正歯科学会大会 2011. 10.17-18 名古屋
大島正充 再生歯ユニット移植による歯の機能の再生 第 70 回日本矯正歯科学会大会 2011.10.17-18 名古屋

水野光政 再生歯ユニットの作製と成体顎骨への生着の解析 第 70 回日本矯正歯科学会大会 2011.10.17-18 名古屋

齋藤正寛 ADAMTSL6 によるマルファン症候群の歯根膜におけるマイクロフィブリル形成不全改善機構の解析 第 54 回歯科基礎医学会学術大会 2012. 09. 15-16. 郡山

鴨井美幸 頸椎の成熟に伴う形態変化と身長ならびに下顎骨の成長量の関連性 第 71 回日本矯正歯科学会大会 2012. 09.26-28. 岩手

佐久間秀二 左側上顎骨萎縮を伴うロンベルグ症候群の一例 第 71 回日本矯正歯科学会大会 2012.09 26-28. 岩手

山内雅人 骨シアロ蛋白質 (BSP) 遺伝子の Runx2 による転写調節機構の解明 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2013. 09.20-21.

鴨井美幸 頸椎の成熟に伴う形態変化と身長ならびに上顎骨の成長量との関連性 第 72 回日本矯正歯科学会大会 2013.10. 07-09. 松本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 雅人 (YAMAUCHI, Masato)
神奈川歯科大学・歯学研究科 (研究院)・助教
研究者番号 : 30230311

(2) 研究分担者

齋藤 正寛 (SAITO Masahiro)
東北大学・歯学研究科 (研究院)・教授
研究者番号 : 40215862