

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890258

研究課題名(和文)修復象牙質形成におけるCTGF/CCN2の役割解明

研究課題名(英文)Role of CTGF/CCN2 in reparative dentin formation

研究代表者

室町 幸一郎 (MUROMACHI, Koichiro)

日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)

研究者番号：50637072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：修復象牙質形成におけるconnective tissue growth factor/CCN family 2 (CTGF/CCN2)の発現と役割解明を目的に研究を行った。齲蝕直下の象牙芽細胞様細胞においてCTGF/CCN2、BMP-1の発現亢進を確認し、ヒト歯髄培養細胞においてBMP-1がプロテアーゼ活性非依存的にCTGF/CCN2の発現を促進することを明らかにした。さらに蛍光標識化BMP-1が細胞質へ移行し、dynamin阻害剤によってBMP-1によるCTGF/CCN2発現が抑制されることを見出した。以上の結果から修復象牙質形成時のCTGF/CCN2発現の新たな機序が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the expression and role of connective tissue growth factor/CCN family 2 (CTGF/CCN2) in reparative dentin formation. Results indicated that specific signal for CTGF/CCN2 and BMP-1 were increased in the layer of odontoblast-like cells subjacent to the dental caries in human teeth. BMP-1 was capable of inducing the expression of CTGF/CCN2 independently of protease activity in primary culture of human dental pulp cells. Exogenously added fluorescence-labeled BMP-1 was internalized into human dental pulp cells. Furthermore, a potent dynamin inhibitor clearly suppressed BMP-1-induced CCN2/CTGF expression. These findings indicate that novel mechanism of CTGF/CCN2 expression in reparative dentinogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：修復象牙質 CTGF/CCN2 BMP-1 象牙質・歯髄複合体

1. 研究開始当初の背景

CTGF/CCN2はCCNファミリーに属する分泌タンパク質で、骨・軟骨組織においては内軟骨性骨化や骨折の治癒時などにその発現が亢進し骨組織の形成に大きく関与することが報告されている。

申請者はこれまでにヒト歯髄培養細胞において matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) により CTGF/CCN2 の発現が亢進すること、齲蝕直下の修復象牙質を形成する象牙芽細胞様細胞層において CTGF/CCN2 の発現が認められることを明らかにした。

修復象牙質は既存の象牙質と比較して象牙細管に乏しく走行も不整であるなど骨組織に近い特徴を示し、CTGF/CCN2 発現との関連が考えられる。しかし、CTGF/CCN2 が修復象牙質の形成にどのように関与しているかはいまだ明らかではない。

歯髄が本来有する創傷治癒機序に則した新規覆髄剤を開発する上で、発現が亢進する分子の役割を解明することは有意義であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は当初、修復象牙質形成における CTGF/CCN2 の役割を解明することを目的に検討を行っていた。しかし、その過程において astacin ファミリーに属するプロテアーゼである bone morphogenetic protein-1 (BMP-1)が CTGF/CCN2 の発現を促進することを見出した。そこで、ヒト齲蝕歯における CTGF/CCN2 および BMP-1 の発現と局在、BMP-1 が CTGF/CCN2 の発現を促進する機序に焦点をあて、解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 免疫組織化学染色

ヒト齲蝕歯の脱灰切片を作製後、CTGF/CCN2 および BMP-1 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡下で局在を観察する。

2) Western blotting

ヒト歯髄培養細胞を recombinant human BMP-1 で刺激したのちに whole cell lysate として回収し、SDS-PAGE および抗ヒト CTGF 抗体を用いて western blotting を行い CTGF/CCN2 タンパク質発現の変化を確認する。また、この際に特異的 BMP-1 阻害剤 UK383367 および dynamin 阻害剤 dynasore を用いる。

3) BMP-1 activity assay

使用した BMP-1 がプロテアーゼ活性を有するかを確認するため、BMP-1 特異的蛍光基質 Mca-Y-V-A-D-A-P-K(Dnp)-OH fluorogenic peptide substrate VI を用いて蛍光プレートリーダーにて測定する。

4) Internalization assay

HiLyte fluor 647 にて蛍光標識した BMP-1 をヒト歯髄培養細胞に加え、共焦点レーザー顕微鏡を用いて BMP-1 の経時的な局在の変化を観察する。

4. 研究成果

(1) ヒト齲蝕歯における CTGF/CCN2 および BMP-1 の局在

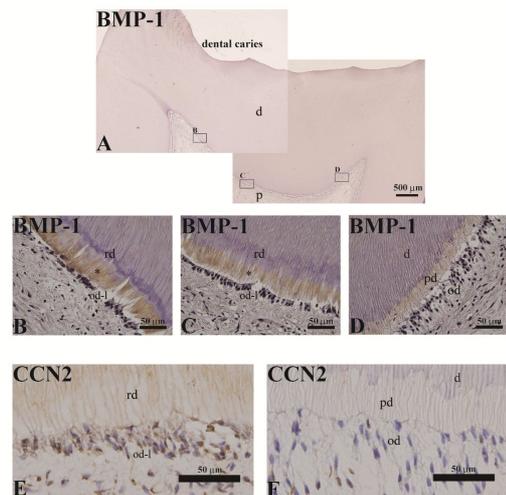


図1 ヒト齲蝕歯における CTGF/CCN2 および BMP-1 の局在

ヒト齲蝕歯において、健全側と比較し CTGF/CCN2 ならびに BMP-1 の発現亢進が象牙芽細胞様細胞層で認められた。

(2) BMP-1 によるプロテアーゼ活性非依存的な CTGF/CCN2 の発現誘導

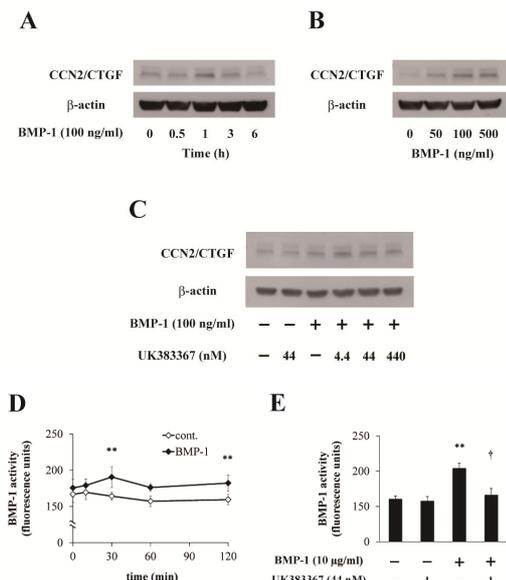


図2 ヒト歯髄培養細胞における BMP-1 のプロテアーゼ活性非依存性 CTGF/CCN2 発現誘導

ヒト歯髄培養細胞において、BMP-1 による CTGF/CCN2 タンパク質の発現が時間お

よび濃度依存的に認められた(図2A、B)。また、BMP-1によるCTGF/CCN2の発現はBMP-1特異的阻害剤UK383367では抑制されず(図2C)、一方でBMP-1のプロテアーゼ活性はUK383367で抑制されていることを確認した(図2D、E)。

### (3) BMP-1の細胞内への移行

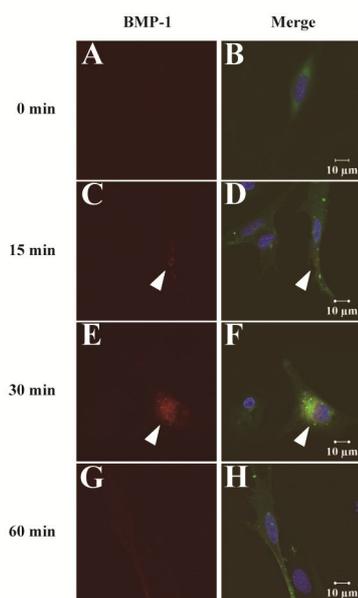


図3 BMP-1の細胞内への移行

ヒト歯髄培養細胞において、HiLyte fluor 647で標識したBMP-1の経時的な細胞質内への取り込みが認められた(図3)。

### (4) BMP-1によるdynamin依存的なCTGF/CCN2発現誘導

CCN2/CTGF	[Western blot bands]				
β-actin	[Western blot bands]				
BMP-1 (100 ng/ml)	-	-	+	+	+
Dynasore (μM)	-	300	-	100	200 300

図4 BMP-1によるCTGF/CCN2発現のdynamin阻害剤による抑制

ヒト歯髄培養細胞において、BMP-1によるCTGF/CCN2タンパク質発現はdynamin特異的阻害剤dynasoreにより濃度依存的に抑制された(図4)。

### (5) まとめ

以上の結果から、ヒト象牙質・歯髄複合体において齶蝕により修復象牙質が形成される際にCTGF/CCN2およびBMP-1の発現が亢進し、その際にBMP-1がdynamin依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれてCTGF/CCN2の発現を

促進することが明らかになった。CTGF/CCN2は骨形成時のマーカーとして有用であることから、修復象牙質が骨様の特徴を示す機序の一端を解明できたと考えられるが、一方でCTGF/CCN2がどのように修復象牙質の成熟に関与するかは未だ明らかでない。また、BMP-1がCTGF/CCN2の発現を制御する機序も興味深く、今後明らかにすることで修復象牙質形成メカニズムに則した新規覆髄剤の開発に寄与できると考えられる。

## 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 1件)

Narita T, Muromachi K, Kamio N, Nakao S, Matsushima K, Hashizume H: Tumor necrosis factor α stimulates expression and secretion of urokinase plasminogen activator in human dental pulp cells. Journal of Oral Science 54: 329-336, 2012 (査読有り)

[学会発表](計 3件)

神尾 直人, 室町 幸一郎, 葉山朋美, 松島 潔: PlasminによるCOX-2産生シグナルと細胞内カルシウムイオン濃度の変化  
日本歯科保存学会 2013年度秋季学術大会(第139回), 秋田, 2013年10月17-18日

室町 幸一郎, 神尾 直人, 松島 潔: ヒト象牙質・歯髄複合体におけるメタロプロテアーゼとCTGF/CCN2発現  
第55回 歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム(招待あり), 岡山, 2013年9月20日

Muromachi K, Kamio N, Matsushima K: BMP-1 promotes CTGF/CCN2 expression independently of protease activity in human carious teeth.  
IFEA The 9th World Endodontic Congress, Tokyo, JAPAN, May 23-26, 2013

[図書](計 0件)

なし

[産業財産権]

なし

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

室町 幸一郎 (MUROMACHI KOICHIRO)

日本大学・松戸歯学部・助手（専任扱）

研究者番号：50637072

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし