

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890265

研究課題名(和文)ブタ歯髄組織中の象牙質シアロリンタンパク質の構造機能解明と臨床応用への基礎研究

研究課題名(英文)Elucidation of structural function and basic research for clinical application of dentin sialophosphoprotein in porcine pulp

研究代表者

山越 康雄 (Yamakoshi, Yasuo)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：20182470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は象牙質の主要非コラーゲン性タンパク質である象牙質シアロタンパク質(DSP)および象牙質リンタンパク質(DPP)が細胞分化誘導因子としての生理活性機能を有しているかを調べることを目的とした。ブタ象牙質より分離精製したDSPおよびDPP自体には生理活性作用はなく、TGF- β 1と結合した微量のDSPおよびDPPが存在することが判明した。リコンビナントTGF- β 1を用いた主要象牙質タンパク質に対する*in vitro*結合実験では、TGF- β 1はコラーゲンにはほとんど結合しなかったが、DSPおよびDPPに結合することでその活性が維持されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We fractionated DPP and DSP along with TGF- β -like activity by ion exchange (IE) chromatography from developing pig molars and measured their alkaline phosphatase (ALP) stimulating activity in human periodontal (HPDL) cells with or without TGF- β receptor inhibitor. We then purified TGF- β -unbound or -bound DPP and DSP by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using ALP-HPDL system. The TGF- β isoform bound to DPP and DSP was identified as being TGF- β 1 by ELISA and LC-MS/MS analysis. We incubated carrier-free human recombinant TGF- β 1 (CF-hTGF- β 1) with TGF- β -unbound DPP or DSP and characterized the binding on IE-HPLC using the ALP-HPDL system. DPP and DSP rescued the loss of TGF- β 1 activity. Approximately 19% and 10% of the ALP stimulating activities were retained by the binding of TGF- β 1 to DPP and DSP, respectively. The type I collagen infrequently bound to CF-hTGF- β 1. We conclude that both DPP and DSP help retain TGF- β 1 activity in porcine dentin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯学 再生医学 細胞・組織 タンパク質 生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

昨今の iPS 細胞作製技術により今後さらに歯の再生技術の進歩が予想される中、歯の形成に関わるタンパク質の構造機能解析が重要な研究課題となっている。研究代表者は歯牙象牙質に含まれる非コラーゲン性タンパク質 (NCP) の約 9 割を占める DSPP のタンパクレベルでの生化学的研究を行い、象牙質形成における役割を解明することに取り組んできた。DSPP 遺伝子の突然変異は象牙質形成不全症及び象牙質異形成症を引き起こす原因遺伝子であるため、このタンパク質の構造機能解析研究は重要視されてきた。これまで DSPP のタンパクレベルにおける研究は齧歯類の象牙質を用いて行われてきたが、量的制限などにより研究は遅れ、基礎研究に未解明のことが数多く残されていた。研究代表者はブタを動物モデルとし、それまで使用されていた方法とは異なる独自の象牙質中の NCP に対する抽出、分離精製方法を開発して、DSPP を構成する 3 種類のタンパク質；象牙質シアロタンパク質 (DSP)、象牙質糖タンパク質 (DGP)、象牙質リンタンパク質 (DPP) を同定し、それらタンパク質の構造および機能研究の基盤を築いた。

2. 研究の目的

上記の背景を基に、本研究は歯髓組織中の DSPP のまだ明らかにされていない機能研究を遂行し、DSPP を用いた歯周組織の再生研究、さらには臨床応用に展開するための基盤となる研究を行って、研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) 歯髓組織に含まれる DSPP をこれまでの象牙質からの方法とは異なる新規方法を開発して抽出・分離精製し、DSPP アイソフォームを同定する。

(2) DSPP が未分化歯根膜由来細胞より骨形成、セメント質形成及び歯根膜形成を誘導する生理活性物質となり得るかを将来的に解明するための基盤実験として間葉系幹細胞株を用いた骨芽細胞への分化誘導実験を行う。

3. 研究の方法

(1) ブタ歯髓組織中の DSPP の新規抽出・分離精製法の確立

いくつかの異なる界面活性剤及び変性剤を組み合わせた効果的な細胞抽出液を決定した後、それを用いて超音波破碎により生後約 5 ヶ月のブタ第二大臼歯より採取した歯髓組織から DSPP を抽出し、イオン交換またはアフィニティークロマトグラフィーにより DSPP を分画した。得られた DSPP 画分を各種カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによって DSPP アイソフォームを最終的に分離精製した。精製度及び純度の検定を各ステップにおいて電気泳動及びウェスタンブロットを行って評価しながら、抽出・分離精製法を最適化した。

(2) DSPP アイソフォームを用いた細胞分化誘導実験

マウス筋芽細胞 (C2C12 細胞) および歯根膜由来培養細胞 (PDL 細胞) を継代培養した後、DSPP アイソフォームを添加して細胞の分化誘導を行い、骨芽細胞分化の指標であるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性について調べた。また、ALP 活性を上昇させた画分中に含まれる生理活性物質を LC/MS 分析および ELISA によって同定した。

4. 研究成果

歯髓組織を先端部 (T) および本体部 (B) に分けて調製し、NP40 界面活性剤を含む細胞抽出

液に混和後、超音波破碎によって得られた抽出液をヘパリン・アフィニティークロマトグラフィーで分離した。ヘパリンカラム非結合画分を溶出後、0.05, 0.1, 0.2, 1M NaClを用いてヘパリンカラム結合タンパク質をそれぞれ溶出すると(図1A)、0.1M および0.2M NaCl画分に溶出される画分中にPDL細胞に対してALP活性を上昇させる物質が含まれていることが判明した(図1B)。さらにALP活性はTGF- β 受容体阻害物質であるSB431542で阻害された(図1B)。また、この画分中にはDSP 抗体に反応するDSP由来タンパク質が含まれていた(図1C)。

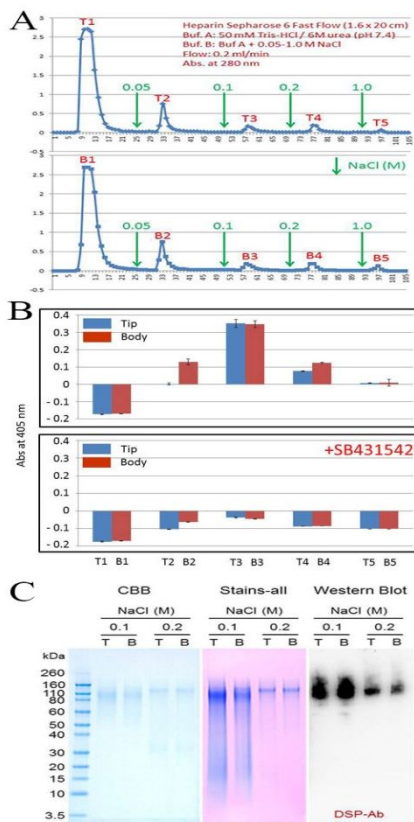


図 1

そこで DSP 由来タンパク質である DSP に生理活性作用があるかどうかを調べるために、歯髓組織から象牙質にスケールアップして DSP 由来タンパク質を大量精製することを試

みた。象牙質中から DSP および DPP を含む画分を抽出し、イオン交換クロマトを行うと図 2A の Q 3 画分に DSP および DPP が、また Q 4 画分に高分子量の DSP が溶出した(図 2B、2C)、また両画分には PDL 細胞に対して ALP 活性を上昇させる TGF- β 様活性が認められた(図 2D)。

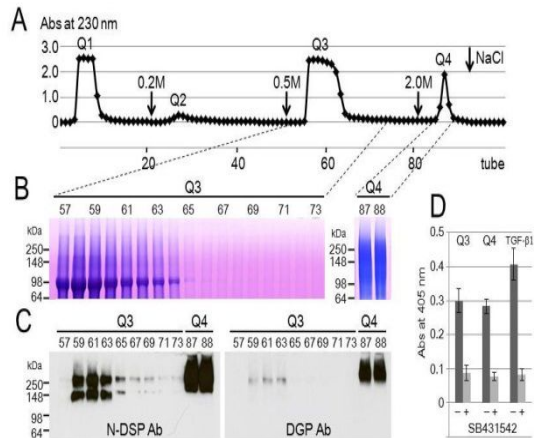


図 2

次に Q 3 および Q 4 画分に対して逆相カラムを用いた HPLC を行うと、DPP および DSP の主ピーク(画分 10-11)とは異なる位置(画分 17-20)に PDL 細胞に対して ALP 活性を上昇させる TGF- β 様活性が認められた(図 3A、3B)、活性が認められた画分には微量の DPP (図

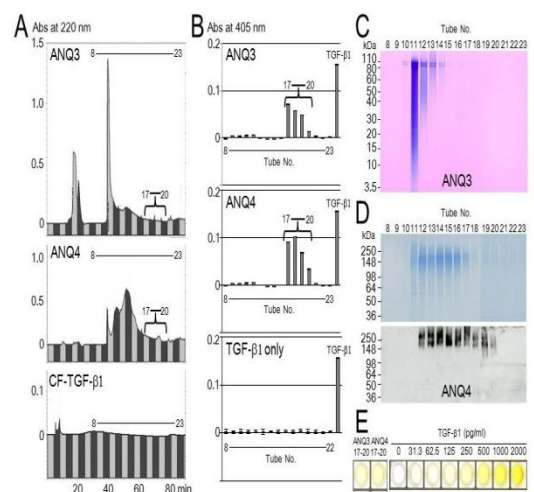


図 3

3C) および DSP (図 3D) が含まれていた。また、ELISA によって TGF- β のアイソフォームは

TGF-β1 であることが同定された (図 3E)。これらの結果より、DSP および DPP 自体には生理活性作用は無く、それらタンパク質に結合している TGF-β1 に生理活性作用があることが判明した。

表 1 (ng)

Binding Protein	Unbound	Bound
CF-hTGF-β1 only	36.4±3.01	not detected
DSP	not detected	101.8±2.90
DPP	not detected	190.5±7.34
Col I	24.7±2.87	23.8±2.04

DSP および DPP に結合する TGF-β1 の存在意義を明らかにするため、リコンビナント TGF-β1 を用いて、TGF-β1 が結合していない DSP および DPP に対する結合実験を行った。その結果、1μg のリコンビナント TGF-β1 のみを 37 でインキュベーションすると約 3.6% まで活性が失活したが (CF-hTGF-β1 only-Unbound)、DSP (DSP-Bound) および DPP (DPP-Bound) に結合することでその活性が約 10% および 19% まで維持された。また TGF-β1 はコラーゲンにはほとんど結合しなかった (Col I-Bound) (表 1)。このことより DSP および DPP は象牙質中の TGF-β1 の活性維持に必要であることが判明し、今後それらタンパク質が歯周組織再生への臨床応用に利用出来るかどうかさらに検討を行うつもりでいる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Yasuo Yamakoshi, Saeko Kinoshita, Luna Izuhara, Takeo Karakida, Makoto Fukae, Shinichiro Oida、DPP and DSP are Necessary for Maintaining TGF-β1

Activity in Dentin、Journal of Dental Research、査読有、93 巻、(2014)、671-677

Yasuo Yamakoshi、J.D. Bartlett、James P. Simmer、MMP20 and KLK4 Activation and Inactivation Interactions In Vitro、Archives of Oral Biology、査読有、58 巻、(2013)、1569-1577

[学会発表] (計 3 件)

Yasuo Yamakoshi、MMP20 and KLK4 Activation and Inactivation Interactions In Vitro、AADR 学会、2014. 3.20、シャーロット・コンベンションセンター、USA

山越 康雄、MMP20 と KLK4 の相互作用について、歯科基礎医学会、2013. 9.21、岡山コンベンションセンター

Yasuo Yamakoshi、DSPP-derived Proteins are Transient Components、IADR 学会、2013. 3.23、シアトル・コンベンションセンター、USA

[招待講演] (計 1 件)

山越 康雄、歯牙象牙質形成と象牙質シアロリタンパク、2013. 1.30、日本大学松戸歯学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山越 康雄 (YAMAKOSHI YASUO)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：20182470