

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463137

研究課題名(和文)新規アメロジェニン会合蛋白の分子基盤構築による歯周組織再生の創薬標的分子の同定

研究課題名(英文)Molecular basis of amelogenin-induced periodontal tissue regeneration

研究代表者

福田 隆男 (Fukuda, Takao)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：80507781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織再生治療薬、エムドゲインは広く臨床応用されており、その90%以上はアメロジェニンにより構成されている。しかし、歯周組織再生における詳細なメカニズムは不明な点が多い。申請者は以前、アメロジェニン会合分子をプロテオーム解析でスクリーニングした結果、新規アメロジェニン会合分子Grp78を同定した。

そこで、本研究では歯周組織に重要な歯根膜幹細胞を用いて、アメロジェニンとGrp78の効果生物学的相互作用について検討した。その結果、両者の会合がRac1の活性化と糸状仮足形成促進を介して歯根膜幹細胞の遊走能を促進することで、歯周組織再生を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Amelogenin, the major component of enamel matrix derivative (Straumann® Emdogain), is well recognized in periodontology. It is used in periodontal surgery to regenerate cementum, periodontal ligament, and alveolar bone. However, the precise molecular mechanisms underlying periodontal regeneration are still unclear. In order to gain further insight into how amelogenin induces periodontal tissue regeneration, we conducted a protein interaction screen using recombinant full-length amelogenin (rM180) as bait. Using this proteomic screen we identified glucose-regulated protein 78 (Grp78) as an amelogenin-binding protein. Our study demonstrates that the biological interaction of Grp78 with amelogenin enhances amelogenin-induced cell migration in PDLSCs. Our findings provide a better understanding of the molecular basis of amelogenin-induced periodontal regeneration.

研究分野：歯周病学

キーワード：アメロジェニン 歯周組織 再生 GRP78 歯根膜幹細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周病は成人の主たる歯の喪失原因である。歯周病治療の第一の目的は歯周病の進行の阻止にあるが、健康な歯周組織の再生は究極の目標である。そのため、数多くの歯周組織再生療法が開発されてきたが、最も効果をあげている治療の一つとして、細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) の臨床応用があげられる。最近の再生医療研究においても、コラーゲンやビトロネクチンといった ECM を介したシグナル伝達が細胞運動と幹細胞分化において重要な役割を果たしていることが報告されている。とりわけ ECM の中では、歯の発生環境を模倣する概念に基づいて開発されたエナメル基質抽出物 (enamel matrix derivative; EMD) (Straumann Emdogain®) は、現在広く歯周外科手術に臨床応用されている。EMD は細胞レベルで骨芽細胞への分化誘導・石灰化能の促進 (や歯根膜細胞の分化を誘導するなど数多くの作用が報告されているが、動物実験においても人工多能性幹細胞 (iPS) 移植と EMD の組み合わせが有意に歯周組織の再生を促進したとの報告もある。

EMD の主要成分 (> 90%) であるアメロジェニンは、ECM 蛋白の 1 種である。アメロジェニンは歯の成長過程においてエナメル芽細胞により分泌され、歯根象牙質表層に沈着する。その結果、アメロジェニンがセメント質および歯根膜の形成を誘導し、歯槽骨の石灰化を促進する。そのためアメロジェニンは、歯周組織再生を誘導する生物活性分子の一つであると位置づけられている。EMD の歯周組織再生効果について、エナメル基質蛋白の他の成分が組織再生に関与している可能性がある一方で、最近の研究では組み換えアメロジェニン単独でも歯周組織の再生を誘導することが報告された。こうしたアメロジェニンの生理活性機序の解明を目的として、我々は、完全長の組み換えアメロジェニンと骨芽細胞様骨肉腫細胞 (SaOS-2) を用いてアメロジェニン結合タンパクのスクリーニングを行った。その結果、新規アメロジェニン会合分子として、Glucose regulated protein 78 (Grp78) を同定し、その会合が骨芽細胞の細胞増殖を促進することを明らかにした。(Fukuda et al., PLoS One, 2013)

2. 研究の目的

歯周組織の再生には歯根膜中に存在する歯根膜幹細胞 / 前駆細胞 (periodontal ligament stem/progenitor cells; PDLSCs) が重要な役割を果たすことが知られている。また、新規アメロジェニン会合分子 Grp78 は、Grp78 は熱ショックタンパク質 70 (HSP70) ファミリーに属しており、小胞体分子シャペロンや小胞体ストレスのシグナル伝達経路の調節因子として知られている。Grp78 は主に小胞体に存在しているが、小胞体ストレス刺激により細胞膜上へと誘導され、受容体と

してシグナル伝達に關与するといわれている。さらに、Grp78 の細胞表面への局在が腫瘍細胞の浸潤と遊走に關連することも明らかになってきた。

本研究では、アメロジェニンと Grp78 間の生物学的相互作用が PDLSCs の細胞応答に及ぼす影響について解析を行った。

3. 研究の方法

PDLSCs を証明する決定的なマーカーは未だ不明であるため、細胞は多能性ヒト歯根膜幹細胞株 cell line 1-17 (九州大学大学院口腔機能修復学講座歯科保存学分野、前田英史教授のご厚意による提供) を使用した。

(1) 歯根膜細胞における Grp78 の発現分布の検討: ヒト歯根膜細胞株 (cell line 1-17) を、免疫蛍光染色時に細胞膜透過処理 (digitonin: 50mg/mL) の有無に分け、細胞質内と細胞膜上の Grp78 の発現を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

(2) アメロジェニンの Grp78 依存性細胞内取り込みの確認: 共焦点蛍光顕微鏡において、amelogenin 刺激の前後での、細胞膜上におけるアメロジェニンと Grp78 の共局在を、Grp78 ノックダウン条件と比較検討した。

(3) 歯根膜細胞におけるアメロジェニン刺激および Grp78 が關与する pathway の解析: cell line 1-17 を Grp78 のノックダウンの有無に分け、amelogenin (10 μ g/mL) で 4 時間刺激後、マイクロアレイ (illumina 社 HumanHT-12 v4chip) にて発現変動遺伝子群の解析を行った (DAVID software)。

(4) アメロジェニンと Grp78 が細胞遊走に及ぼす影響の検討: Grp78 を強発現、または sGrp78 をノックダウンし、amelogenin 刺激時の細胞遊走 (wound healing assay)、細胞増殖 (WST-8 assay) について確認した。

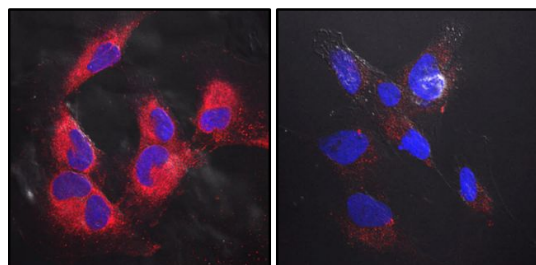
(5) アメロジェニンと Grp78 による細胞遊走活性化経路の確認: アメロジェニン刺激と Grp78 強発現による細胞骨格の変化 (共焦点蛍光顕微鏡) および細胞遊走に重要な Rho シグナルの活性化 (Rho-GTP pull-down assay) を確認した。更に Rac1 特異的阻害剤 NSC2376 (100 μ M) を用いてその葉状仮足形成におよぼす影響を観察した (共焦点蛍光顕微鏡)。

4. 研究成果

(1) 歯根膜細胞における Grp78 の発現分布
まず、PDLSC 1-17 細胞における Grp78 の細胞膜上での発現を確認した。

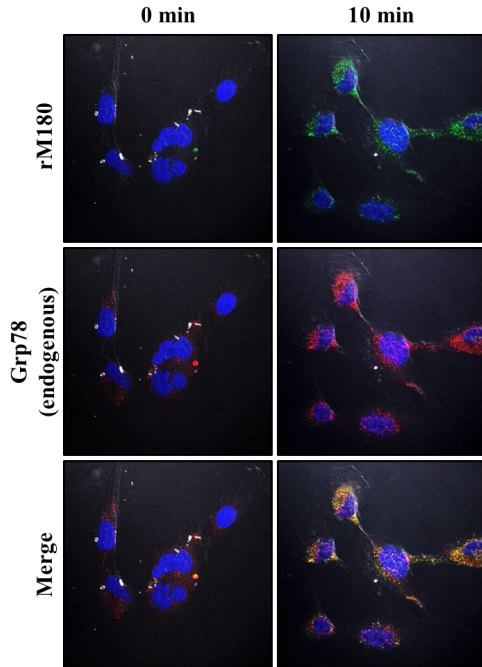
細胞質

細胞膜上

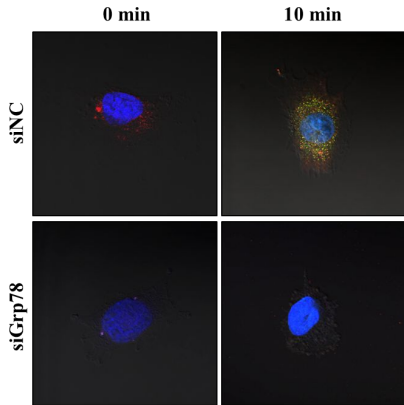


(2) アメロジェニンの Grp78 依存性細胞内取り込みの確認

次に、1-17 細胞のけるアメロジェニンと細胞膜上の Grp78 の局在を確認したところ、両者の共局在を確認した。



さらに Grp78 をノックダウンして 1-17 細胞における発現を抑制したところ、アメロジェニンの細胞内取り込みが阻害された。



このことから、細胞膜上の Grp78 はアメロジェニン取り込みの特異的レセプターとして機能することが示された。

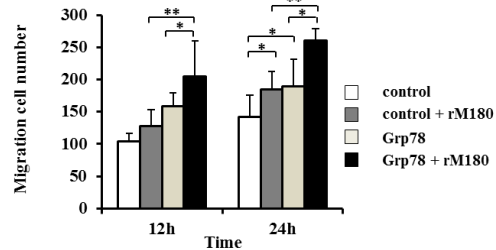
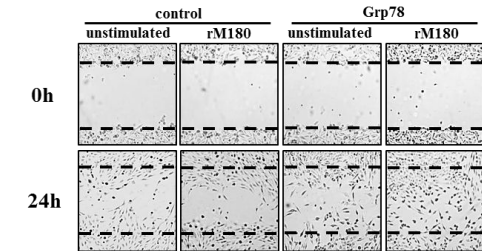
(3) 歯根膜細胞におけるアメロジェニン刺激および Grp78 が関与する pathway の解析

アメロジェニンと Grp78 の生物学的相互作用を検討するため、マイクロアレイによる網羅的遺伝子プロファイリングの変動を検証した。その結果、アメロジェニン刺激により細胞遊走関連遺伝子群の発現が促進されることを確認した。さらに Grp78 ノックダウンすることで、これらの遺伝子発現が抑制されたため、両者の会合が歯根膜幹細胞の遊走能に影響することが示唆された。

(4) アメロジェニンと Grp78 が細胞遊走に及ぼす影響の検討

実際に 1-17 細胞の細胞遊走能について検

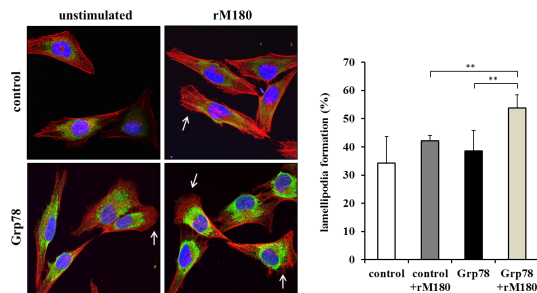
証した結果、アメロジェニン刺激により細胞遊走は促進されたが、Grp78 を強発現させることでさらに細胞遊走は亢進した。



逆に Grp78 をノックダウンすると 1-17 細胞の遊走が阻害されたことから、アメロジェニンは Grp78 との会合により、歯根膜幹細胞の細胞遊走を促進することが示された。

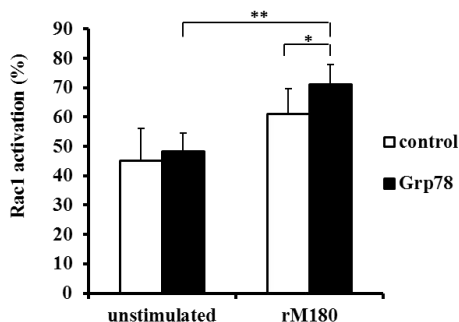
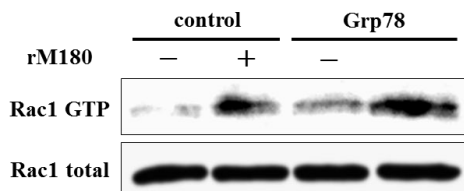
(5) アメロジェニンと Grp78 による細胞遊走活性化経路の確認

一般的に、細胞遊走には細胞骨格の再構成と細胞形態の変化が必要であることが知られている。特に移動方向に対しては、葉状仮足や糸状仮足に代表される細胞周囲への突起の形成が重要になる。アメロジェニンと Grp78 が、細胞遊走に伴うアクチン構造や細胞形態の変化に影響を及ぼすかどうかを検討した結果、アメロジェニン刺激を加えた Grp78 強発現 1-17 細胞において、葉状仮足を呈する細胞数の著明な増加が認められた。一方、糸状仮足の形成には変化が認められなかった。そこで、各条件下での葉状仮足を呈する細胞の割合を測定したところ、1-17 細胞において Grp78 の強発現は葉状仮足の形成を促進したが、rM180 刺激を加えることにより、さらに葉状仮足の陽性率が有意に増加した。

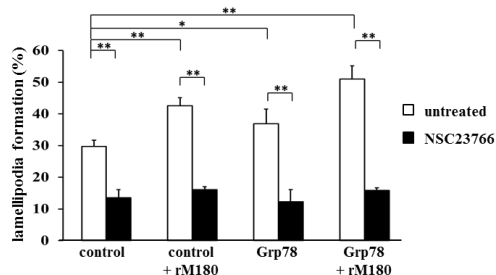
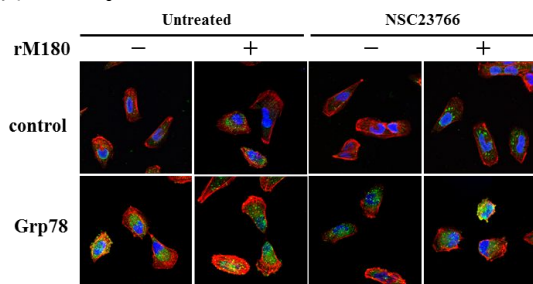


Rho ファミリー G タンパク質が細胞極性と細胞骨格の動態を制御することは広く知られている。中でも Rho ファミリー G タンパク質の Rac1/Cdc42 は糸状仮足と葉状仮足の形成において重要な分子である。先の実験結果において、細胞遊走と葉状仮足形成が増加したことから、アメロジェニンと Grp78 の相互

作用が Rac1/Cdc42 の活性化に関わっている可能性が生じた。そこで、Rac1/Cdc42 の活性を検討するため、Rac1/Cdc42 が特異的に結合する PAK1 ビーズを使用したプルダウンアッセイを行った。その結果、アメロジェニン刺激および Grp78 強発現群では総 Rac1 レベルの変動なしに、活性型 Rac1 の発現量が亢進した。特に Grp78 強発現細胞にアメロジェニン刺激を加えた実験群で、最も活性型 Rac1 が高発現した。一方、活性型 Cdc42 はどの条件下でも有意な差は認められなかった



更に Rac1 特異的阻害剤 NSC23766 (100 μ M) を用いてその葉状仮足形成におよぼす影響を観察したところ、アメロジェニンと Grp78 による葉状仮足形成の促進効果が、完全に阻害された。



これらの結果から、アメロジェニンと Grp78 の相互作用によって誘導される葉状仮足の形成や細胞遊走の促進には、Rac1 の活性が必須であることが示された。

結論として、Grp78 とアメロジェニンの生物学的相互作用が PDLSCs 細胞株である 1-17 細胞におけるアメロジェニン誘導性細胞遊走・細胞接着を促進させることを示し、さら

に Rac1 の活性化と葉状仮足の形成がアメロジェニン誘導性細胞遊走の重要なステップであることを示した。今回得られた知見は、アメロジェニンによって誘導される歯周組織再生の機能の一端を解明する重要な分子基盤の一つと考えられる。

5. 主な発表論等

(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16件)

1. Sanui T, Takeshita M, Fukuda T, Tanaka U, Alshagabi R, Aida Y, Nishimura F. (2017), Adhesion attenuates respiratory burst induced by different modes of triggering in resting or LPS-primed neutrophils. *Immunobiology*, in press.
2. Sanui T, Fukuda T, Yamamichi K, Toyoda K, Tanaka U, Yotsumoto K, Taketomi T, Nishimura F. (2017), Microarray analysis of the effects of amelogenin on U937 monocytic cells. *American Journal of Molecular Biology*, 7(2): 107-122.
3. Takano A, Fukuda T, Shinjo T, Iwashita M, Matsuzaki E, Yamamichi K, Takeshita M, Sanui T, Nishimura F. (2017), Angiopoietin-like protein 2 is a positive regulator of osteoblast differentiation. *Metabolism*, 69: 157-170.
4. Nozoe K, Sanui T, Takeshita M, Fukuda T, Haraguchi A, Aida Y, Nishimura F. (2017), Innate immune-stimulatory activity of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae is eliminated by phase separation using Triton X-114. *Journal of Immunological Methods*, 441: 31-38.
5. Sanui T, Takeshita M, Fukuda T, Haraguchi A, Aida Y, Nishimura F. (2016), Anti-CD14 antibody-treated neutrophils respond to LPS: Possible involvement of CD14 upregulated by anti-CD14 antibody binding. *Immunological Investigations*, 46(2): 190-200.
6. Takeshita M, Haraguchi A, Miura M, Hamachi T, Fukuda T, Sanui T, Takano A, Nishimura F. (2017), Antibiotic effects against periodontal bacteria in organ cultured tissue. *Clinical and Experimental Dental Research*, 3(1): 5-12.
7. Fukuda T, Sanui T, Toyoda K, Tanaka U, Yamamichi K, Taketomi T, Nishimura F. (2016) Glucose-Regulated Protein 78: A Novel Therapeutic Target for Amelogenin- Induced Periodontal Tissue

- Regeneration. *Single Cell Biology*, 5(2): 137.
8. **Fukuda T**, **Sanui T**, Toyoda K, Tanaka U, Yamamichi K, **Taketomi T**, **Nishimura F**. (2016) New Therapeutic Strategy for Regenerating Periodontal Tissue Based on the Combination of Amelogenin and Reapplications of Existing Grp78 Inducer. *Journal of Cell Signaling*, 1(3): 118.
 9. Nozoe K, Aida Y, **Fukuda T**, **Sanui T**, **Nishimura F**. (2016), Mechanisms of the macrolide-induced inhibition of superoxide generation by neutrophils. *Inflammation*, 39(3): 1039-1048.
 10. Komatsu T, Aida Y, **Fukuda T**, **Sanui T**, Hiratsuka S, Pabst M, **Nishimura F**. (2016), Disaggregation of Lipopolysaccharide by Albumin, Hemoglobin, or High Density Lipoprotein, Forming Complexes that Prime Neutrophils for Enhanced Release of Superoxide. *Pathogens and Disease*, 74(3): pii: ftw003.
 11. **Sanui T**, **Fukuda T**, Tanaka U, Toyoda K, Yamamichi K, **Taketomi T**, **Nishimura F**. (2016) Biological effects of Sprouty2 inhibition in periodontal ligament cells. *Journal of Cell Signaling*, 1(3): 117.
 12. Atomura R, **Sanui T**, **Fukuda T**, Tanaka U, Toyoda K, **Taketomi T**, Yamamichi K, Akiyama H, **Nishimura F**. (2016), Inhibition of Sprouty2 polarizes macrophages toward an M2 phenotype by stimulation with interferon and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Immunity, Inflammation and Disease*, 4(1): 98-110.
 13. Toyoda K, **Fukuda T**, **Sanui T**, Tanaka U, Yamamichi K, Atomura R, Maeda H, Tomokiyo A, **Taketomi T**, **Uchiyama T**, **Nishimura F**. (2016), Grp78 is critical for amelogenin-induced cell migration in a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. *Journal of Cellular Physiology*, 231:414-427.
 14. Tanaka U, **Sanui T**, **Fukuda T**, Toyoda K, **Taketomi T**, Atomura R, Yamamichi K, Maeda H, **Nishimura F**. (2015), Sprouty2 inhibition promotes proliferation and migration of periodontal ligament cells. *Oral Diseases*, 21:977-986.
 15. **Sanui T**, **Fukuda T**, Tanaka U, Toyoda K, **Taketomi T**, **Nishimura F** (2015), Spry2 is a novel therapeutic target for periodontal tissue regeneration

through fibroblast growth factor receptor signaling and epidermal growth factor signaling. *Receptors and Clinical Investigation*, 2: e597.

16. **Sanui T**, Tanaka U, **Fukuda T**, Toyoda K, **Taketomi T**, Atomura R, Yamamichi K, **Nishimura F**. (2015), Mutation of Spry2 induces proliferation and differentiation of osteoblasts but inhibits proliferation of gingival epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116: 628-639.

〔学会発表〕(計32件)
 (うち筆頭演者5件)

1. Fukuda T, Qunzhou Z, Anh L, Nishimura F, Songtao S, Exosomes From TNF-alpha-treated GMSCs Induce M2 Macrophage Polarization, 2017 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, San Francisco, USA. 2017.03.25.
2. Fukuda T, Sanui T, Toyoda K, Tanaka U, Yamamichi K, Atomura R, Akiyama H, Nishimura F. Molecular basis of amelogenin-induced periodontal tissue regeneration, 口腔から健康長寿を支えるプロジェクト推進に向けた研究拠点構築プログラム 2nd Symposium, Fukuoka, 2016.02.28.
3. Fukuda T, Toyoda K, Sanui T, Tanaka U, Yamamichi K, Atomura R, **Taketomi T**, Nishimura F. Grp78 Is Critical For Amelogenin-induced Cell Migration In PDLSCs, The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Fukuoka, 2015.10.30.
4. Fukuda T, Toyoda K, Sanui T, Tanaka U, Yamamichi K, Atomura R, **Taketomi T**, Nishimura F Grp78 is critical for amelogenin-induced cell migration in PDL cells. Penn Periodontal Conference 2015, Philadelphia, USA. 2015.06.29.
5. Fukuda T, Atomura R, Toyoda K, Yamamichi K, Tanaka U, Sanui T, **Taketomi T**, Nishimura F. Grp78 is Essential for Amelogenin-Induced Cell Migration in PDLSCs. 93rd General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Boston, USA, 2015.03.13.

〔その他〕

ホームページ等

九州大学研究者情報

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

hppt://www.dent.kyushu-u.ac.jp

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福田 隆男 (FUKUDA Takao)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：80507781

(2)研究分担者

西村 英紀 (NISHIMURA Fusanori)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：80208222

讃井 彰一 (SANUI Terukazu)
九州大学病院・講師
研究者番号：70507780

武富 孝治 (TAKETOMI Takaharu)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：10553290

(3)連携研究者

内海 健 (UCHIUMI Takeshi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80253798