

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861609

研究課題名(和文)修復象牙質形成におけるBMP-1のプロテアーゼ活性非依存的機能の解明

研究課題名(英文)Protease activity-independent role of BMP-1 in reparative dentin formation

研究代表者

室町 幸一郎(MUROMACHI, Koichiro)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50637072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯髄においてbone morphogenetic protein-1 (BMP-1)がCCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF)の発現を促進する際に、象牙質を構成するタンパク質であるdentin sialophosphoprotein (DSPP)やdentin matrix protein-1 (DMP-1)の発現には関与しないことを明らかにした。加えてBMP-1がヒト歯髄培養細胞の膜タンパク質の糖鎖修飾を促進することを見出した。以上の結果は、修復象牙質形成におけるBMP-1の新たな役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that the expression of bone morphogenetic protein-1 (BMP-1), CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF), and dentin sialophosphoprotein (DSPP) was accelerated in the layer of odontoblast-like cells and reparative dentin subjacent dental caries in human teeth. BMP-1 induced the expression of CCN2/CTGF independently of protease activity in the human dental pulp cells but not that of DSPP or dentin matrix protein-1 (DMP-1). Furthermore, cell membrane glycosylation was altered by BMP-1 stimulation as analyzed by lectin microarray.

These findings indicate that a novel property of BMP-1 which potentially enhances bone-like reparative dentin formation through CCN2 expression and membrane glycosylation in dentin-pulp complex.

研究分野：医歯薬学

キーワード：修復象牙質 BMP-1 CCN2/CTGF 象牙質・歯髄複合体

1. 研究開始当初の背景

Bone morphogenetic protein (BMP) -1 は他の BMP ファミリータンパク質とともに骨組織から分離同定されたがその後の解析でプロテアーゼドメインを有することが明らかになり、現在は astacin ファミリーにも分類されるメタロプロテアーゼである。

研究代表者はこれまでの研究から、健全歯と比較して齲蝕罹患歯では象牙芽細胞様細胞および修復象牙質に BMP-1 の発現が亢進し、BMP-1 がヒト歯髄培養細胞において骨形成に關与する分泌タンパク質である CCN family member 2 / connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) の発現を促進することを明らかにしている。また CCN2/CTGF の発現は BMP-1 のプロテアーゼ活性非依存的に促進され、その際に BMP-1 が細胞内へ dynamin 依存性のエンドサイトーシスにより取り込まれることも確認している。

修復象牙質の形成過程では傷害された既存の象牙芽細胞に代わり、歯髄中の未分化間葉系幹細胞が遊走し象牙芽細胞様細胞に分化すると考えられている。修復象牙質は既存の象牙質と比較して象牙細管数が少なく不連続性で、骨細胞のように包埋された細胞もしばしば認めることから骨様の組織に移行していると考えられている。一方、CCN2/CTGF は骨形成の際にその発現が亢進することが多数報告されており、歯髄での CCN2/CTGF 発現の亢進は骨様の修復象牙質形成と密接な関連があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、修復象牙質形成過程において BMP-1 が CCN2/CTGF の発現を促進する機序の解明および CCN2/CTGF が歯髄中の未分化間葉系幹細胞に及ぼす作用に焦点を当てて検討を行った。上記のうち、歯髄中の未分化間葉系幹細胞の分取については現在も1歯からの安定した分取方法について検討を継続している。

またこれらの研究過程で BMP-1 が細胞膜上のタンパク質の糖鎖修飾を促進することを見出したため、あわせて検討を行った。

3. 研究の方法

1) 免疫組織化学染色

ヒト齲蝕歯の脱灰薄切片を作製後、CCN2/CTGF、BMP-1、DSPP 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した。

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 を回収し、CCN2/CTGF、DSPP、DMP-1 に対する抗体を用いて western blotting を行い各タンパク質発現の変化を確認した。

3) Lectin microarray

ヒト歯髄培養細胞を recombinant human BMP-1 で刺激したのちに細胞膜分画を回収し、lectin microarray に供して糖鎖修飾の変化を確認した。

4. 研究成果

(1) ヒト齲蝕歯における BMP-1、CCN2/CTGF、DSPP の発現の亢進

健全歯と比較して齲蝕歯において、象牙芽細胞様細胞層および修復象牙質に BMP-1、CCN2/CTGF、DSPP の発現が亢進することを確認した(図1)。DMP-1 についてもその発現と局在を免疫染色にて検討したが、非特異的反応が検出され有意な結果は得られなかった。

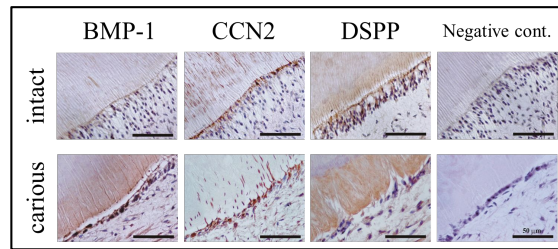


図1 ヒト健全歯および齲蝕歯における BMP-1、CCN2/CTGF、DSPP の局在

(2) ヒト歯髄培養細胞における BMP-1 による CCN2/CTGF、DMP-1、DSPP、fibronectin のタンパク質発現

rhBMP-1 にて刺激したヒト歯髄培養細胞において、CCN2/CTGF タンパク質の発現が濃度依存적および時間依存的に増加することを確認した。一方で、DMP-1、DSPP、fibronectin の発現には変化を認めなかった(図2)。

なお、研究代表者はこれまでの研究で BMP-1 が dynamin 依存性のエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれることを明らかにしている。そこでさらに BMP-1 の細胞質および核への移行についても検討を行った。すなわち、ヒト歯髄培養細胞を rhBMP-1 で刺激したのちに細胞質分画および核分画を回収し抗 BMP-1 抗体を用いて western blotting を行い、BMP-1 の細胞内への移行を検討したが、有意な結果は得られなかった。

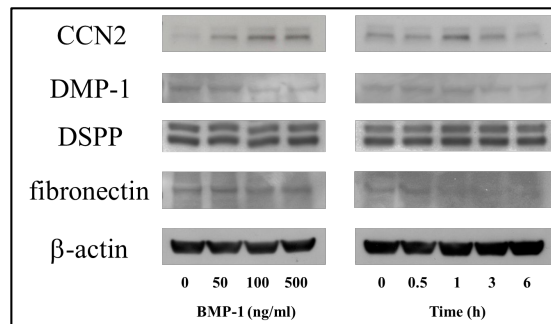


図2 ヒト歯髄培養細胞における BMP-1 による CCN2/CTGF、DMP-1、DSPP、fibronectin のタンパク質発現

(3) BMP-1 によるヒト歯髄培養細胞の膜分

## 画糖鎖構造の変化

BMP-1が細胞内へ取り込まれ、プロテアーゼ活性非依存的にCCN2/CTGFの発現を促進する機序を検討するなかで、細胞内への取り込みに関与する膜タンパク質に着目して研究を進めたところ、細胞膜上の糖鎖構造に有意に変化を生じることを確認した(図3、矢印)。

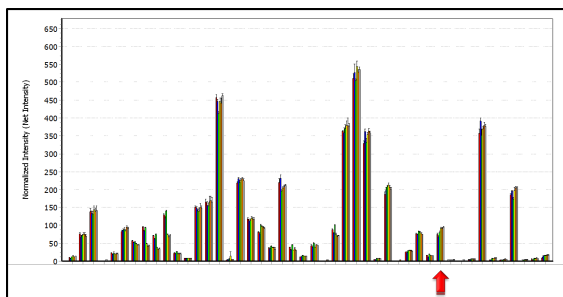


図3 BMP-1によるヒト歯髄培養細胞の膜分画糖鎖構造の変化

### (4)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BMP-1、CCN2/CTGF、DSPPの発現が亢進し、BMP-1はCCN2/CTGFの発現を促進する一方で、他の象牙質形成に関与するタンパク質であるDSPP、DMP-1、fibronectinの発現には影響しないことを明らかにした。加えて、BMP-1が細胞膜上の糖鎖修飾に変化をもたらすことを明らかにした。

本研究はBMP-1とCCN2/CTGFを中心とした修復象牙質形成の機序の一端を解明することで、生体のメカニズムに則した新規覆髄剤の開発に寄与するものと考えられる。

## 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 4件)

Hayama T, Kamio N, Okabe T, Muromachi K, Matsushima K: Kallikrein Promotes Inflammation in Human Dental Pulp Cells via Protease-Activated Receptor-1. *Journal of Cellular Biochemistry* 117: 1522-1528, 2016 (査読有り) doi: 10.1002/jcb.25437

Muromachi K, Kamio N, Matsuki-Fukushima M, Nishimura H, Tani-Ishii N, Sugiya H, Matsushima K: CCN2/CTGF expression via cellular uptake of BMP-1 is associated with reparative dentinogenesis. *Oral Diseases* 21: 778-784, 2015 (査読有り) doi: 10.1111/odi.12347

Muromachi K, Kamio N, Matsuki-Fukushima M, Narita T, Nishimura H, Tani-Ishii N, Sugiya H, Matsushima K: Metalloproteases and CCN2/CTGF in dentin-pulp complex repair.

*Journal of Oral Biosciences* 57: 86-90, 2015 (査読有り) doi:10.1016/j.job.2014.12.001

神尾直人, 室町幸一郎, 葉山朋美, 岡部達, 神尾素代, 諸橋利朗, 松島潔: ヒト歯髄培養細胞における plasmin による calcineurin を介した COX-2 発現. *日本歯科保存学雑誌* 57: 442-451, 2014 (査読有り) <http://doi.org/10.11471/shikahozon.57.442>

〔学会発表〕(計 6件)

室町幸一郎, 石井信之: BMP-1によるヒト歯髄細胞膜糖鎖の変化. *日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会(第143回)*, 東京, 2015年11月12-13日.

神尾直人, 葉山朋美, 室町幸一郎, 五味博之, 喜多詰規雄, 上田幾大, 三浦孝司, 山浦賀弘, 松島 潔: ヒト歯髄培養細胞における LPS の Neuropsin 発現に与える影響. *日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会(第143回)*, 東京, 2015年11月12-13日.

Muromachi K, Tani-Ishii N: BMP-1 regulates CCN2 expression and cell surface glycosylation in human dental pulp. *The 8th International Workshop On The CCN Family Of Genes*, Nice, FRANCE, 2015.11.03-07.

Muromachi K, Kamio N, Matsuki-Fukushima M, Nishimura H, Tani-Ishii N, Sugiya H, Matsushima K: BMP-1-induced CCN2/CTGF expression is associated with reparative dentin formation. *IADR 93rd General Session and Exhibition*, Boston, Mass., USA, 2015.03.11-14.

室町幸一郎, 神尾直人, 松島潔, 石井信之: BMP-1はエンドサイトーシスを経てCCN2/CTGFの発現を促進し第三象牙質形成に関与する. *日本歯科保存学会2014年度秋季学術大会(第141回)*, 山形, 2014年10月30-31日.

室町幸一郎, 神尾直人, 松島潔, 石井信之: BMP-1はヒト歯髄培養細胞においてエンドサイトーシスを介しCCN2/CTGFの発現を促進する. *第6回日本CCNファミリー研究会*, 岡山, 2014年8月30日.

〔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)  
神奈川県立大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：50637072

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし