

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2012 年 3 月 6 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 菅崎弘幸
所属機関名： 東北大学病院
所属部署名： 矯正歯科 職名： 助教
所在地： 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 4-1
電話： 022-717-8374 内線：



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

OPG 遺伝子導入へのセメント芽細胞の反応様式と歯根吸収抑制の関係

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 菅崎弘幸

職名： 助教

所属機関名： 東北大学病院

部署名： 矯正歯科

中国側研究者氏名： 林久祥 (Jiuxiang Lin)

職名：

Professor

所属機関名： Peking University School and Hospital
of Stomatology

部署名： Department
of Orthodontics

4. 当該研究における発表論文等

なし

5. 成果の概要

Osteoprogenitorin (OPG)は、破骨細胞分化因子 RANKL のデコイレセプターとして働き、破骨細胞分化を抑制することがよく知られている。申請者らは共同研究で、OPG 遺伝子導入が歯根吸収を阻害することを見いだしているが、その考えられるメカニズムである OPG 遺伝子導入による歯根表面セメント芽細胞の活性化とセメント質再生の制御機構は不明であった。そこで本研究では、OPG 遺伝子導入したセメント芽細胞の分化促進制御機構を解明すべく培養細胞実験を行った。

セメント芽細胞への OPG 遺伝子導入でセメント芽細胞分化マーカー遺伝子発現が上昇することをリアルタイム PCR で確認した。つぎにその制御機構を解明すべくマイクロアレイ発現解析を行ったところ、細胞内カルシウムシグナル系、細胞膜イオンチャネル系、骨芽細胞分化に関連すると報告されているシグナル系 XXX の変動などが観察された。さらにセメント芽細胞をリコンビナント XXX 刺激することで分化が促進された。よって OPG 強制発現により XXX シグナル上昇を介してセメント芽細胞分化が促進される可能性が示唆された。

また、強制発現した OPG がどのような機構で上記の XXX シグナルを介したセメント芽細胞分化促進を惹起するかを解明すべく、OPG を Bait とした免疫沈降を行い、OPG が結合する分子の同定を試みた。RANKL 以外に分子量が 10~260 kDa の 6 バンドが観察され、それぞれを Nano LC-MS/MS によるタンパク質同定を行った。現在、その情報を元にどれがキー分子であるかを検索中である。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

我々は本共同研究助成金獲得前の 2009 年 7 月より共同研究を行っている。本共同研究において中国人共同研究者は主に動物実験を担当した。

主に中国人共同研究者によって得られた研究成果は次の通りである。

1) ラットの矯正学的歯の移動モデルにおいて観察される歯根吸収は、局所的 OPG 遺伝子導入によって抑制された。

2) この OPG による歯根吸収抑制作用は、ただ単に破骨細胞の分化・活性化抑制によるものだけではなく、セメント芽細胞の分化促進とそれによる新規セメント質添加の促進によって生じていた。

OPG 遺伝子導入へのセメント芽細胞の反応様式と歯根吸収抑制の関係

<研究者氏名・所属～共同研究者名・所属>

研究者氏名： 菅崎弘幸

所属： 東北大学病院・矯正歯科、助教

中国側共同研究代表者名： 林久祥 (Jiuxiang Lin)

所属： Peking University School and Hospital of
Stomatology, Department of Orthodontics、
Professor

<要旨>

Osteoprotegerin (OPG)は、破骨細胞分化因子 RANKL のデコイレセプターとして働き、破骨細胞分化を抑制することがよく知られている。申請者らは共同研究で、OPG 遺伝子導入が歯根吸収を阻害することを見いだしているが、その考えられるメカニズムである OPG 遺伝子導入による歯根表面セメント芽細胞の活性化とセメント質再生の制御機構は不明であった。そこで本研究では、OPG 遺伝子導入したセメント芽細胞の分化促進制御機構を解明すべく培養細胞実験を行った。

セメント芽細胞への OPG 遺伝子導入でセメント芽細胞分化マーカー遺伝子発現が上昇することをリアルタイム PCR で確認した。つぎにその制御機構を解明すべくマイクロアレイ発現解析を行ったところ、細胞内カルシウムシグナル系、細胞膜イオンチャネル系、骨芽細胞分化に関連すると報告されているシグナル系 XXX の変動などが観察された。さらにセメント芽細胞をリコンビナント XXX 刺激することで分化が促進された。よって OPG 強制発現により XXX シグナル上昇を介してセメント芽細胞分化が促進される可能性が示唆された。

また、強制発現した OPG がどのような機構で上記の XXX シグナルを介したセメント芽細胞分化促進を惹起するかを解明すべく、OPG を Bait とした免疫沈降を行い、OPG が結合する分子の同定を試みた。RANKL 以外に分子量が 10～260 kDa の 6 バンドが観察され、それぞれを Nano LC-MS/MS によるタンパク質同定を行った。現在、その情報を元にどれがキー分子であるかを検索中である。

<Key Words>

セメント芽細胞、OPG、分化促進、細胞内シグナル伝達

<本文>

緒言

Osteoprotegerin (OPG)は、破骨細胞分化因子 RANKL のデコイレセプターとして働き、破骨細胞分化を抑制することがよく知られている(文献 1)。我々は 2009 年 7 月より、Department of Orthodontics, Peking university School and Hospital of Stomatology と、矯正学的歯の移動後の後戻りに対する OPG 遺伝子導入の抑制効果について共同研究を行っている。その共同研究の中で、OPG 遺伝子導入が歯根吸収を阻害することを見いだしている(文献 2)が、そのメカニズムは大きく 2 つ考えられる。一つは OPG による破骨細胞への RANKL シグナル伝達阻害による分化・活性阻害、もう一つは OPG 遺伝子導入による歯根表面セメント芽細胞の活性化とセメント質再生である。後者の想定しうる制御機構に関して最近、OPG 遺伝子導入は骨芽細胞の分化を惹起するという報告(文献 3)があることから、OPG 遺伝子導入がセメント芽細胞にも何らかの影響を与えることが強く推察される。しかしながら OPG 遺伝子導入による歯根表面セメント芽細胞の活性化やセメント質再生の制御機構は不明である。そこで本研

究では、OPG 遺伝子導入したセメント芽細胞の分化促進制御機構を解明することを目的として、培養セメント芽細胞を用いた実験を行うこととした。

研究対象と方法

細胞

ヒト不死化セメント芽細胞セルライン HCEM を広島大学大学院医歯薬総合研究科口腔顎顔面病理病態学講座、高田隆教授より供与を受けて実験に用いた。培養は、10% FBS 添加 α -MEM を用いて、37°C、5% CO₂環境下で行った。

OPG 遺伝子導入

マウス OPG 発現プラスミド(文献 4)をヒト不死化セメント芽細胞セルラインへ X-tremeGENE HP DNA トランスフェクション試薬 (ロシュアプライドサイエンス)を用いて遺伝子導入した。

RNA 抽出

OPG 発現プラスミドを遺伝子導入後 3 日の時点で細胞から total RNA を抽出した。RNA 抽出には GenElute Mammalian Total RNA mini prep Kit (シグマ)を用いた。得られた RNA の一部はマイクロアレイ発現解析に、残りは cDNA 合成とその後のリアルタイム PCR へ用いた。

cDNA 合成

抽出した RNA の濃度を測定後、1 μ g の RNA を iScript RT Supermix (バイオラッド)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成し以下のリアルタイム PCR へ用いた。

リアルタイム PCR

セメント芽細胞分化マーカー遺伝子発現 (Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP1), Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked (PHEX)) を解析すべく、SsoFast EvaGreen Supermix (バイオラッド)ならびに CFX96(バイオラッド)を用いて検出を行った。各遺伝子の発現はハウスキーピング遺伝子 Ribosomal protein S18 (RPS18)で補正する $\Delta\Delta$ Ct 法で相対発現比を計算した。

マイクロアレイ発現解析

セメント芽細胞 RNA を、CodeLink Human Whole genome Bioarray (フィルジェン)を用いて網羅的遺伝子発現プロファイル解析を行った。OPG 遺伝子導入を行わないサンプルを対象群、導入サンプルを実験群とし、対象群・実験群どちらかのシグナル強度が有為であり、かつ発現量の差が 2 倍以上のものを有為な変動を示した遺伝子とした。これらの変動を再確認すべく、マイクロアレイ発現解析に用いた RNA から cDNA を合成し、それを用いてリアルタイム PCR による遺伝子発現変化を解析した。

免疫沈降

セメント芽細胞内において、OPG が結合する分子の同定を試みるべく、OPG を Bait とした免疫沈降を行った。OPG 遺伝子導入したセメント芽細胞 whole cell lysate に、抗マウス OPG 抗体 (イミュノダ イアグノースティクス) を添加し、Protein G agarose (サーモサイエンティフィック) で OPG と結合したタンパク質との複合体を回収した。SDS-PAGE ジェルで還元下電気泳動し、バンドの確認ならびにジェルの切り出しと Nano LC-MS/MS によるタンパク質同定を行った。

動物実験

6 週齢 Wistar ラットの顎第一臼歯と顎切歯間にニッケルチタン製クローズコイルスプリング (トミー) を装着し、第一臼歯へ約 60gf の近心移動力を負荷した。3 週間後に装置を撤去し、歯の後戻りを観察するとともに一部のラットへ局所的 OPG 遺伝子導入を行った。スプリング撤去から 1 週間ごとにカルセイン溶液を腹腔内注射し、新規石灰化硬組織の生体染色を行った。また、マイクロ CT (スカイキャン) をボクセルサイズ 9.5 μ m で 1 週間ごとに撮影し、歯根吸収の程度を解析した。装置撤去 2 週後に実験動物を屠殺し、通法に従い組織切片の作製を行った。なお、すべての動物実験手順は Peking University Health Science Center の倫理委員会の承認を得た。

結果

1) OPG 遺伝子導入は、セメント芽細胞分化を促進する

OPG 遺伝子導入がセメント芽細胞の分化へ与える影響を検索すべく、OPG 遺伝子導入有無でのセメント芽細胞分化マーカー遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。OPG 遺伝子導入でセメント芽細胞分化マーカー遺伝子発現が有為に上昇した。現在、タンパク質レベルで分化程度の確認を行っている。

2) OPG 遺伝子導入によるセメント芽細胞遺伝子発現変化の網羅的解析

マイクロアレイ 54359 プローブ中、発現量の差が 2 倍以上でかつシグナル強度がある程度以上観察された遺伝子を検索したところ、887 プローブあった。これら遺伝子を観察したところ、細胞内カルシウムシグナル系、細胞膜イオンチャネル系などのシグナルの変動が観察された。さらに骨芽細胞の分化に関連すると報告されている XXX シグナル系の変動も観察された。以上のことは、OPG 強制発現により XXX シグナル上昇を介してセメント芽細胞分化が促進される可能性を示唆する。

3) XXX シグナル系はセメント芽細胞の分化に関与する

マイクロアレイ発現解析で、OPG 遺伝子導入によるセメント芽細胞分化に関わる可能性が示唆された XXX シグナル系のセメント芽細胞分化能を確認すべく、リコンビナント XXX をセメント芽細胞培養系に添加し、その影響を検索した。リアルタイム PCR によるセメント芽細胞分化マーカー遺伝子発現解析で、有為な上昇を確認した。現在、タンパク質レベルで分化程度の確認を行っている。また次年度以降、XXX シグナル系の RNAi によるノックダウンを行い、XXX シグナル系が OPG 遺伝子導入によるセメント芽細胞分化に関わっているかどうかを検索予定である。

4) セメント芽細胞内において OPG が結合する分子同定

強制発現した OPG がどのような機構で上記の XXX シグナルを介したセメント芽細胞分化促進を惹起するかを解明すべく、OPG を Bait とした免疫沈降を行い OPG が結合する分子の同定を試みた。還元下状態で SDS-PAGE 電気泳動を行ったところ、RANKL(約 40kDa)以外に分子量が 10~260 kDa の範囲に 6 つのバンドが観察され、OPG と特異的に結合しうる分子が少なくとも 6 つあることが示唆された。次にこれらバンドを切り出し、Nano LC-MS/MS による質量分析にてタンパク質同定を行った。Mascot データベースから推察された分子量 12, 18, 72kDa のタンパク質 3 種について、現在その発現の細胞内局在、発現量変化、ならびにその機能阻害による影響を現在検索中である。

5) 歯周組織への局所的 OPG 遺伝子導入は、セメント質添加による歯質再生を促進する

我々はすでに共同研究の成果として、歯周組織への局所的 OPG 遺伝子導入が歯根吸収を阻害することを論文報告している(文献 2)が、そのメカニズムはまだ不明な点が残存していた。すなわち OPG 遺伝子導入による歯根表面セメント芽細胞の活性化とセメント質再生が行われるか否かである。それを解明すべく OPG 遺伝子導入後の吸収歯根歯質が修復される過程を、1) マイクロ CT による歯根表面吸収窩の程度、ならびに 2) カルセイン生体染色による新規セメント質添加量の解析を行った。その結果、OPG 遺伝子導入は歯質吸収を抑制するのみならず、新規セメント質添加を促進することが観察された。よって、*in vitro* の結果のみならず、*in vivo* でも OPG がセメント芽細胞分化ならびにセメント質再生を促進する効果があることが示唆された。

考察

セメント芽細胞で OPG 強制発現を行うと、OPG が特定の分子と結合し、そのことが XXX シグナル系の発現上昇を惹起し、それによりセメント芽細胞の分化促進とセメント質の新規添加促進が行われることが示唆された。今後、1) タンパク質レベルでのセメント芽細胞分化程度の確認、2) XXX シグナルノックダウンによる Loss of function 実験、3) セメント芽細胞内において OPG が結合する分子同定とその分子の Gain of function 実験・Loss of function 実験、を行う予定であり、これらの結果

が得られ次第論文投稿を考えている。

参考文献

1. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-319.
2. N Zhao, Y Liu, H Kanzaki, W Liang, J Ni, J Lin. Effects of local osteoprotegerin gene transfection on orthodontic root resorption during retention: an in vivo Micro-CT analysis. *Orthod Craniofac Res* 2012;15:10-20.
3. Yu H, de Vos P, Ren Y. Overexpression of osteoprotegerin promotes preosteoblast differentiation to mature osteoblasts. *Angle Orthod.* 2011;81:100-106.
4. Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2004;83:920-925.

作成年月日 2012年3月6日