

論 文 題 目

エナメル上皮細胞と骨芽細胞の増殖と分化における

リコンビナント・ヒトアメリロジェニンの作用

平成 28 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

高橋 亜友美

[緒言]

アメロジェニン(N末端側に疎水性領域, C末端側に親水性領域を持つ極性の強い分子で, エナメル質形成時に大量に分泌され, エナメル質が石灰化する過程において分解される(藤沢, 久保木, 2000, Svensson *et al.*, 2012). エナメル質の形成以外にも, 細胞の増殖や分化の促進にアメロジェニンが関与することが報告されているが(Gestrelus *et al.*, 1997, He *et al.*, 2004, Tanimoto *et al.*, 2012, Kunimatsu *et al.*, 2016, Yoshimi *et al.*, 2016), その詳細は明らかではない. これまでの多くの報告で用いられてきた動物から抽出したアメロジェニンは, セリンプロテアーゼ等で切断された分解産物や増殖因子などアメロジェニン以外の生理活性物質を含むため, アメロジェニンの活性そのものの解析には不適切である. そこで本研究では, アメロジェニンの生理活性を解析するために, 哺乳類細胞に発現させたリコンビナント・ヒトアメロジェニンを大量に精製し, ラットエナメル上皮細胞由来細胞(HAT-7細胞)とマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1細胞)に対する細胞増殖能, 石灰化誘導能および細胞接着能を比較検討した.

[方法]

(1) リコンビナント・ヒトアメロジェニンの作製

アメロジェニン遺伝子を含んだ pAMELXv3-Myc-DDK-Histag プラスミドを作製し, タンパク質発現用哺乳類細胞(EXPI細胞)に導入後, 浮遊培養した培養上清を DDK アガロースビーズにてアフィニティー精製した. サンプルはウエスタンブロッティング, 銀染色, MEM-CODE 染色にて解析した.

(2) 細胞増殖能測定

HAT-7細胞とMC3T3-E1細胞を播種し, 細胞定着後にリコンビナント・ヒトアメロジェニンを, もしくはエムドゲイン®ゲル(EMD)を添加した培養液に交換し3日後の細胞数を計測した.

(3) 石灰化誘導能の解析

HAT-7細胞とMC3T3-E1細胞を播種し, 細胞の定着後, 石灰化誘導培地にリコンビナント・ヒトアメロジェニン, もしくはEMDを添加した培養液にて培養し, アリザリンレッドS染色およびALP活性で評価した.

(4-1) 細胞接着能の解析

細胞伸展能を調べるため, コントロールとしての0.1%BSA, フィブロネクチン, リコンビ

ナント・ヒトアメロジェニン, EMD をコートしたチャンバーに, MC3T3-E1 細胞を播種し培養後固定し, DIOC₆ と DAPI で染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した.

(4-2) 阻害剤実験

チャンバーをフィブロネクチン, もしくはリコンビナント・ヒトアメロジェニンでコートし, RGD ペプチドもしくはフィブロネクチンインヒビターを添加した培養液で MC3T3-E1 細胞を培養後, 位相差顕微鏡により細胞形態を観察した.

(4-3) 免疫蛍光組織化学染色

コントロールとしての 0.1%BSA, フィブロネクチン, リコンビナント・ヒトアメロジェニン, EMD をそれぞれコートしたチャンバー上に, MC3T3-E1 細胞を播種し培養後, パキシリンの接着斑への局在を免疫組織化学的に観察した.

[結果]

pAMELXv3-Myc-DDK-HisTag プラスミドを導入した EXPI 細胞の培養上清のウエスタンブロッティング解析において, 抗 DDK 抗体, 抗 c-Myc 抗体, および抗アメロジェニン抗体に反応する 30 kDa, 33 kDa, 65 kDa の複数のバンドが確認された. アフィニティー精製後のウエスタンブロッティング解析では, 単量体アメロジェニンと考えられる 27 kDa バンドに加えて, 2 量体と思われる 54 kDa バンドが認められた. 銀染色および MEM-CODE 染色でも同じバンドが認められたことから DDK ビーズによって高純度のリコンビナント・ヒトアメロジェニンが精製されたことが示された. この方法で 1.3×10^8 cells/50 mL あたり 450 μ g のリコンビナント・アメロジェニンの精製が可能になった.

リコンビナント・ヒトアメロジェニンは濃度依存的に HAT-7 細胞の増殖を抑制し, 4 μ g/mL で細胞数を有意に低下させた. 100 μ g/mL EMD でも, 同様の細胞増殖抑制作用が認められた. さらに, 4 μ g/mL のリコンビナント・ヒトアメロジェニン存在下で培養した HAT-7 細胞では, アリザリンレッド S に染色される石灰化物の顕著な沈着と ALP 活性の上昇が認められた. EMD の添加では ALP 活性を変化させなかった.

MC3T3-E1 細胞において, リコンビナント・ヒトアメロジェニン添加培地では細胞増殖の変化は認められなかった. また, 比較的低濃度 (<0.01 μ g/mL) のリコンビナント・ヒトアメロジェニンは石灰化物の沈着と ALP 活性を増加させたが, 高濃度 (4 μ g/mL) のリコンビナント・ヒトアメロジェニンでは石灰化物の沈着と ALP 活性を抑制した. 同様に, EMD は低濃度 (<1 μ g/mL) のときに ALP 活性の上昇傾向を示し, 高濃度 (100 μ g/mL) で ALP

活性を有意に抑制した。

リコンビナント・ヒトアメロジェニンをコートしたチャンバー上で MC3T3-E1 細胞を培養したところ、細胞接着面の面積がコントロール (BSA) の約 1.98 倍に増大した。この細胞伸展は、RGD ペプチドやフィブロネクチンインヒビターにより阻害された。MC3T3-E1 細胞の細胞伸展には、パキシリンが集積する接着斑が関与していることが免疫染色によって示された。

[考察]

本研究では、EXPI 細胞にヒトアメロジェニンを大量に発現させ、DDK タグを用いたワンステップの精製で高純度のリコンビナント・ヒトアメロジェニンを得ることに初めて成功した。精製したアメロジェニンが示す分子量から、培養液中のリコンビナント・ヒトアメロジェニンの大部分が 2 量体あるいは多量体として存在していることが示唆された。一方、EMD に含まれるアメロジェニンは C 末端を欠如しており (Jonke *et al.*, 2016), 生理活性にも違いが認められた。例えば、リコンビナント・ヒトアメロジェニンは HAT-7 細胞の石灰化誘導能や ALP 活性を上昇させたが、EMD にはそのような作用は認められなかった。このことは、HAT-7 細胞の分化誘導にアメロジェニンの C 末端が必要であることを示唆している。また本研究では、MC3T3-E1 細胞に対するリコンビナント・ヒトアメロジェニンの作用において、低濃度で ALP 活性の上昇を、高濃度で ALP 活性の低下を起こすことを示した。さらに、リコンビナント・ヒトアメロジェニンは MC3T3-E1 細胞の接着性と細胞伸展を促進することが明らかとなった。インテグリンの阻害剤を使った実験結果および抗パキシリン抗体で免疫染色した結果から、リコンビナント・ヒトアメロジェニンによる MC3T3-E1 細胞の接着・伸展能がインテグリンを介する adhesion pathway を介して引き起こされていることが示唆された。

[結論]

高純度のリコンビナント・ヒトアメロジェニンを大量に精製する方法を確立し、アメロジェニンが濃度や細胞種の違いによって異なる生理活性をもち、さらにインテグリンを介する細胞接着性と伸展能を持つことが明らかとなった。

[文献]

- 藤沢隆一, 久保木芳徳. 歯の細胞外マトリックスと石灰化. *Connect Tissue Res* 32 : 77-83, 2001.
- Gestrelus S, Andersson C, Lidstrom D, Hammarstrom L & Somerman M. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 24: 685-692, 1997.
- He J, Jiang J, Safavi KE, Spångberg LS & Zhu Q. Emdogain promotes osteoblast proliferation and differentiation and stimulates osteoprotegerin expression. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97: 239-245, 2004.
- Jonke E, Gemperli AC, Zhang T, Özdemir B, Dard M, Rausch-Fan X & Andrukhov O. Effect of tyrosine-rich amelogenin peptide on behavior and differentiation of endothelial cells. *Clin Oral Investig* 20: 2275-2284, 2016.
- Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Awada T, Miyauchi M, Takata T, Li W, Zhu L, Denbesten PK & Tanimoto K. The C-terminus of amelogenin enhances osteogenic differentiation of human cementoblast lineage cells. *J Periodontal Res* 10: 1111, 2016.
- Svensson Bonde J & Bulow L. One-step purification of recombinant human amelogenin and use of amelogenin as a fusion partner. *PLoS One* 7: 33269, 2012.
- Tanimoto K, Kunimatsu R, Tanne Y, Huang YC, Michida M, Yoshimi Y, Miyauchi M, Takata T & Tanne K. Differential effects of amelogenin on mineralization of cementoblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol* 83: 672-679, 2012.
- Yoshimi Y, Kunimatsu R, Hirose N, Awada T, Miyauchi M, Takata T, Li W, Zhu L, Denbesten P, Tanne K & Tanimoto K. Effects of C-Terminal Amelogenin Peptide on Proliferation of Human Cementoblast Lineage Cells. *J Periodontol* 87: 820-827, 2016.

