OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	DMP1 ELISAの構築と血中DMP1量から推測される骨細胞の機能
Author(s)	佐藤, 淳
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2016, 60(2), p. 11-16
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/60645
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

阪大歯学誌　60(2)：11 ～ 16，2016

DMP1 ELISA の構築と 血中 DMP1 量から推測される骨細胞の機能

佐藤　淳*

（平成 28 年 1 月 31 日受付）

はじめに

Dentin matrix protein 1（DMP1）は，骨細胞が特異的に発現する非コラーゲン性骨基質タンパク質で，small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins（SIBLINGs）ファミリーに属している。DMP1 を構成するアミノ酸の約 30％は，酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸から構成されており，生体内においては，この DMP1 はマイナスに荷電した状態で存在している。さらに，DMP1 を構成するアミノ酸の約 20％はセリンであり，この DMP1 にはセリンを含む多くのリン酸化モチーフが含有されており，リン酸化されてマイナスに荷電すると考えられている。DMP1 のリン酸化酵素としては，family with sequence similarity member 20C（FAM20C）が重要な役割を果たしていると考えられている[1)]。高度にマイナスに荷電した DMP1 は Ca^{2+} との強い結合能を得て，ハイドロキシアパタイト形成の核となることが可能となり，骨の石灰化に影響を及ぼすと考えられている。DMP1 を過剰に発現させると，DMP1 がハイドロキシアパタイト形成能や石灰化促進能を有するとする多数の報告がなされている[2,3,4)]。また，DMP1 は分泌過程で，N 末端の 37kDa 断片と C 末端の 57kDa 断片に切断され[5)]，未切断の全長の DMP1 は骨基質中には，ほとんど存在しないことが報告されている[6)]。骨組織における骨代謝マーカーは，骨吸収マーカー，骨形成マーカーとして数多くの有用なマーカーが用いられているが，骨吸収マーカーは，破骨細胞の機能の指標であり，骨形成マーカーは骨芽細胞の機能の指標となっており，骨細胞の機能を評価するマーカーに関してはあまり報告がなされていない。DMP1 は，骨細胞が特異的に発現している骨基質タンパク質であり，DMP1 の発現を定量化出来れば，骨細胞の機能を評価することが可能になると考えられる。加えて，DMP1 の発現を指標として，骨組織の質的な評価も可能になるものと思われる。本稿では，DMP1 を定量化出来る ELISA を用いて計測した DMP1 発現量と骨組織との関連性について解説する。

骨細胞の分化

DMP1 は骨細胞が特異的に産生しているが，この骨細胞は，骨組織を構成する細胞の中で最も数が多い細胞で，骨組織の全構成細胞数の約 90％（20,000 ～ 80,000 個/mm^3 骨組織）を占めている[7,8)]。骨細胞は，骨小腔と呼ばれる骨基質内の空間に埋入された状態で骨組織の至る所に存在し，さらに骨細胞間や骨細胞–骨芽細胞間を繋ぐ多数の骨細管の中に細胞突起を伸ばして細胞間ネットワークを形成し[9)]，骨の形成・維持に重要な働きをしている。この骨細胞は，骨芽細胞に由来しており，骨芽細胞は自らが産生した骨基質内に埋入され骨細胞へと分化する。この過程では，50 ～ 70％の骨芽細胞がアポトーシスによる細胞死により骨表層部分から消失し，その残りが骨細胞や休止期骨芽細胞（bone lining cell）に移行すると考えられている[10,11)]。骨芽細胞が骨細胞へと分化するとその寿命は数十年にもなるという報告もあり，骨芽細胞の寿命が約 3 ヶ月程度であるのに比較すると骨細胞は長寿命である[12)]。

骨細胞は，電子顕微鏡観察に基づいて，その分化・

＊　大阪大学大学院歯学研究科　顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学教室）

成熟段階に応じた詳細な分類がされている[13]（図1）。骨芽細胞層に隣接し，骨芽細胞の列から外れて類骨に埋入されつつある骨細胞は，骨芽細胞様骨細胞，osteoblastic osteocyte と呼ばれる。骨芽細胞様骨細胞では，mineral processes と呼ばれる太く短い細胞突起が類骨内で石灰化骨側に向かって伸ばされ，発達した粗面小胞体やゴルジ装置などを有しており，細胞内小器官は骨芽細胞とほぼ同じである。周辺部に存在する骨芽細胞との接触は少なくなるものの密着接合（tight junction）により接触している。次の分化段階では，類骨内に完全に埋入された類骨骨細胞，osteoid osteocyte と呼ばれる骨細胞となる。類骨骨細胞では，細胞の大きさが骨芽細胞の 70％にまで縮小するが，依然として発達した粗面小胞体やゴルジ装置を有しており高い基質産生能を有している。類骨内から石灰化骨側へと向かう mineral processes はさらに伸長され，骨芽細胞側に向かって長く伸びる細胞突起は，ギャップ結合を介して骨芽細胞との接触を保った状態となっている。さらに分化し，石灰化骨に埋入されてすぐの骨細胞は幼若骨細胞，young osteocyte と呼ばれ，細胞内小器官が減少し，粗面小胞体やゴルジ装置の発達は乏しくなっている。最終的に分化した骨細胞は，成熟骨細胞，old osteocyte となって，石灰化骨の深部に分布し，細胞内小器官はほとんど認められなくなる。石灰化骨側に向いた細胞突起や骨芽細胞側に向いた細胞突起は，さらに発達して細長く伸長された状態となる。

DMP1 発現分布

前項で述べた骨細胞の成熟・分化段階ごとの形態学的変化からは，骨内に存在する全ての骨細胞が一様に DMP1 を産生しているわけではないことが推測される。*In situ* hybridization により Dmp1 *mRNA* 発現の検索を行うと，図 1 に示される骨表面に分布している骨芽細胞の領域においては，Dmp1 *mRNA* の発現は認められず，骨表層で類骨に埋入し始めた骨芽細胞様骨細胞，類骨内に存在する類骨骨細胞，石灰化骨に埋入し始めた幼若骨細胞に特異的に Dmp1 *mRNA* の発現が観察される。

さらに DMP1 蛋白質を認識する抗体を用いた免疫染色によって，骨細胞の詳細な分化ごとに DMP1 の発現を検索すると，類骨に分布する骨芽細胞様骨細胞や類骨骨細胞では，細胞内の核に隣接して DMP1 の局在が観察されるが，これらの細胞外の類骨基質には，DMP1 の発現は認められない。石灰化骨に分布する幼若骨細胞では，骨細胞内に DMP1 が局在するとともに，骨小腔や骨細管構造に沿って DMP1 の分布が観察される。成熟骨細胞では骨細胞内に DMP1 の分布は認められず，骨小腔や骨細管構造に沿ってのみ，その分布が認められる。これは，すでに分泌された DMP1 が骨基質蛋白

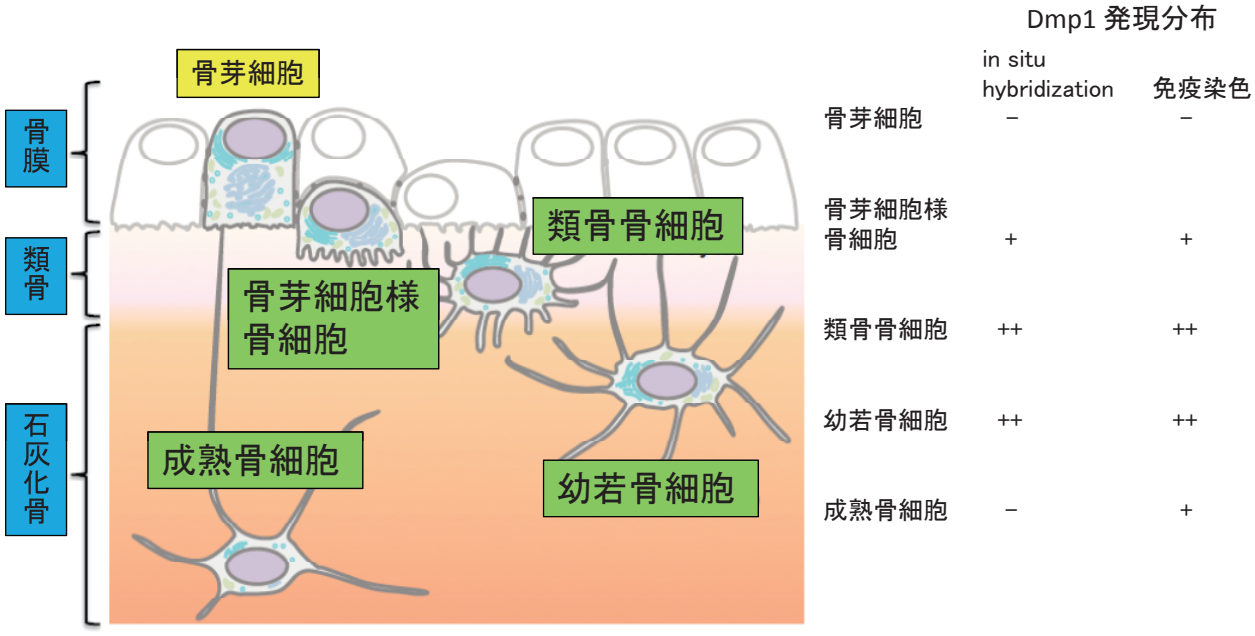

図 1　骨細胞の分類と DMP1 発現分布。（文献 13 より改変）

質として骨基質に残存しているためと考えられる。

血中 DMP1 を定量化する ELISA の開発

骨の石灰化に関連した DMP1 の生体内での発現を定量化することは，骨細胞の機能から骨の性状を理解する上で有効なマーカーになると考えられる。しかしながら，DMP1 は骨基質蛋白質であるため，非侵襲な方法を用いて測定するためには，循環血液中の DMP1 を測定することが理想となる。そこで，血液サンプルを測定する DMP1 の ELISA の作製を行った。DMP1 タンパク質は，分泌過程において N 末端の 37kDa 断片と C 末端の 57kDa 断片の 2 つに切断され，全長の DMP1 はほとんど存在しないため，N 末端および C 末端を認識できる抗体を組み合わせた ELISA を作製した。DMP1 1–2 では，N 末端の DMP1–1 と DMP1–2 のペプチドに対するポリクローナル抗体を用い，DMP1 4–3 では，C 末端の DMP1–3 と DMP1–4 のペプチドに対するポリクローナル抗体を用いた（図 2）。

2 週齢から 96 週齢（約 2 年齢）の間のラットから血漿を採取し，DMP1 ELISA 1–2 と 4–3 を用いて循環血液中の DMP1 蛋白量の測定を行った。ELISA1–2 と 4–3 により定量化された DMP1 の蛋白量は，ラットの週齢が進むにつれて，明らかな減少を示していた（図 3）。両方の ELISA キットにより定量化された DMP1 の蛋白量を比較すると，2 週齢から 12 週齢の急速な骨成長を示す時期において，C 末端を検出する ELISA4–3 により測定された DMP1 蛋白量は，N 末端を検出する ELISA1–2 により測定された DMP1 蛋白量よりも 3 倍以上の高い数値を示していた（図 3）。しかしながら，老齢の 72 週齢や 96 週齢の DMP1 蛋白量は，どちらの ELISA でもほぼ同じ数値であった（図 3）。

DMP1 と他の骨代謝関連因子との関連

DMP1 以外の骨代謝関連因子を，2 週齢から 96 週齢のラットの血漿を用いて測定し，DMP1 の発現との関連性について検討した。骨形成マーカーとして骨芽細胞が特異的に発現する Osteocalcin の発現と Wnt シグナル伝達の阻害により骨形成を阻害する Dickkopf–1（Dkk–1）の発現を検索したところ，Osteocalcin，Dkk–1，両者ともにラットの週齢が進むにつれて減少する傾向が観察された（図 4a, b）。

さらに，骨吸収マーカーとして破骨細胞が発現する Tartrate-resistant acid phosphatase 5b（Trap5b）と Wnt シグナル伝達を阻害し骨形成を阻害する Sclerostin（SOST）の発現を検索すると，この両者ともに 8 週齢で増加が見られたが，12 週齢以降では減少が見られた（図 4 c, d）。

DMP1 の ELISA により測定された血液中の DMP1 量とその他の骨代謝マーカーとの相関性について検討を行ったところ，DMP1 ELISA により検出される DMP1 タンパク量と高い相関性を示していた骨代謝マーカーは，Dkk–1（r＝0.9）であった。ついで高い相関性が見られたのは，Osteocalcin（r＝0.8）であった。Trap5b や SOST と DMP1 とは，低い相関性であった。

力学的負荷による DMP1 量の変化

宇宙空間での宇宙飛行士の長期滞在や高齢者の寝た

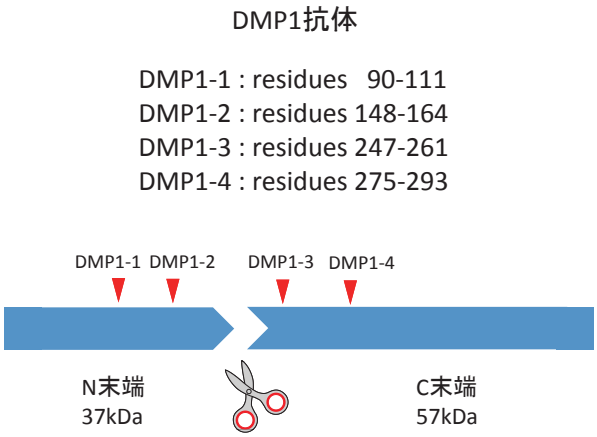

図 2　DMP1 ELISA に用いた抗 DMP1 抗体の組み合わせ。

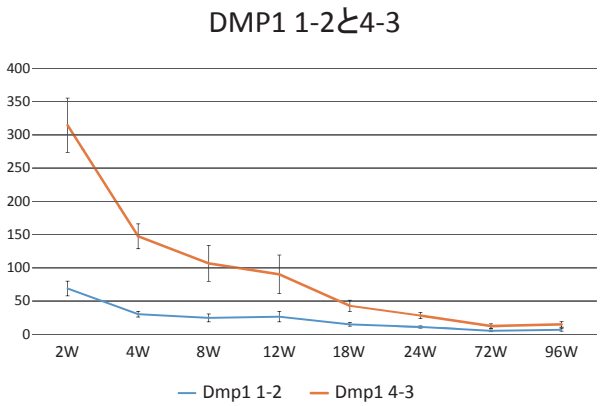

図 3　ラットの週齢変化に伴う DMP1 量の変化。

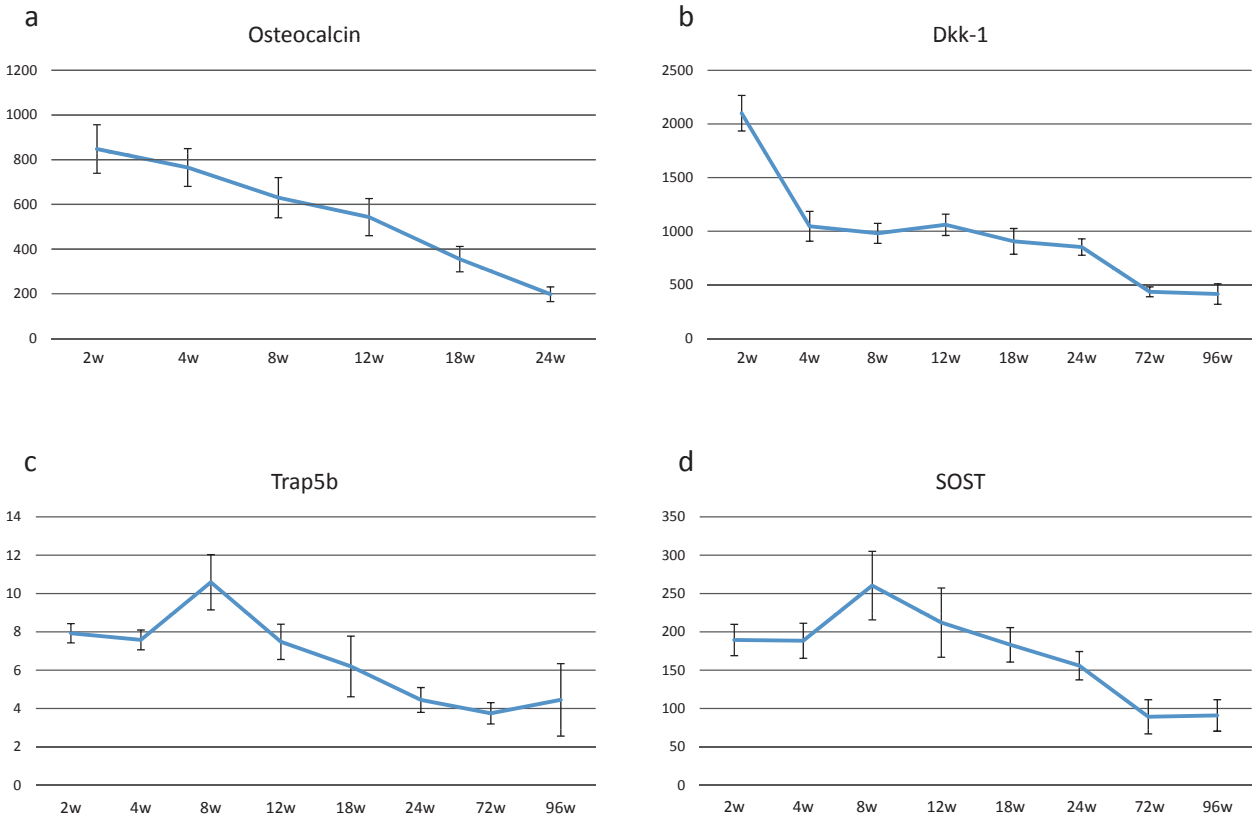

図 4　ラットの週齢変化に伴う骨代謝関連因子の変化。

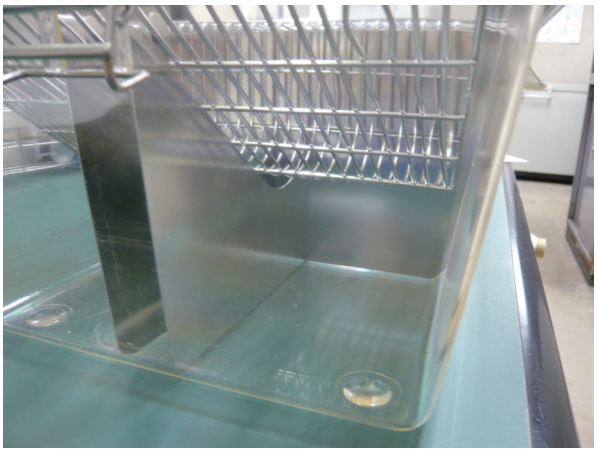

図 5　運動制限飼育ケース。

きり状態，あるいは運動不足などで骨組織に力学的負荷がかからない状態となると，骨量は減少し，骨密度が低下する。この際，骨細胞は，骨組織への力学的負荷を感知し，骨の形成や吸収を調節する重要な役割を果たしていると考えられている。力学的負荷と血液中の DMP1 との関連性を検討するため，ラットの運動を制限し，力学的負荷のかからない環境を再現した。図 5 の運動制限飼育ケージを用いてラットを飼育し，血液を採取した。運動制限飼育ケージの広さはほぼラット一匹分程度で，体の向きは変えられるが，ラットが自由に行動できる十分な広さは無い。このような環境下で 3 ヶ月飼育を続けたラットを不動化グループとし，コントロールグループとの比較を行った。不動化グループおよびコントロールグループから脛骨を採取し，pQCT を用いて海綿骨骨密度の測定を行うと，コントロールグループと比較して不動化グループでは骨密度が低下し，骨粗鬆症のような状態を示していた。それぞれのグループのラットから採取した血液を用いて DMP1 量を計測すると，実験開始後，2 週目の時点では，統計学的に有意な差は無いものの，不動化グループはコントロールグループと比較して低い DMP1 量を示していた（図 6 a, b）。4 週目，8 週目，12 週目においては，コントロールグループよりも不動化グループの方が統計学的に有意に低い DMP1 量を示していた（図 6 a, b）。

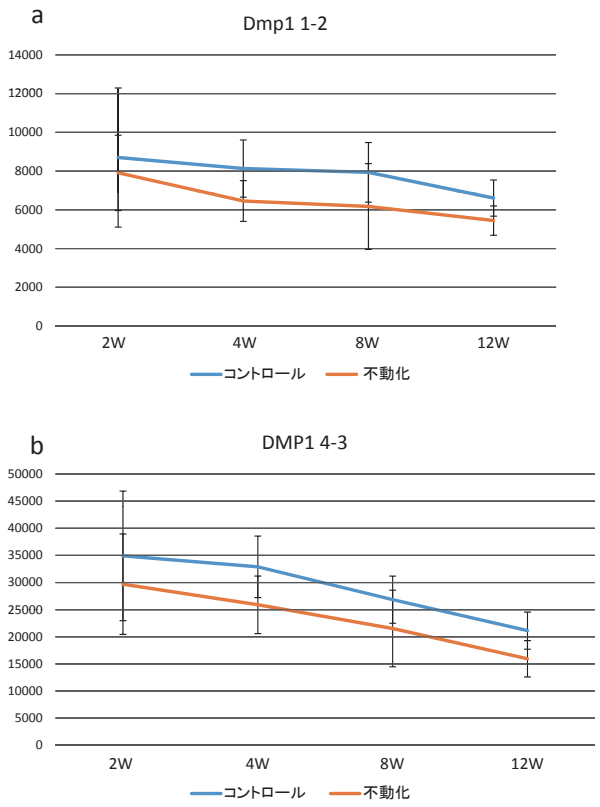

図 6　力学的負荷による DMP1 量の変化。

おわりに

血液中の DMP1 を定量化する ELISA の構築を行い，この ELISA を用いて 2 週齢から 96 週齢の雄ラットの血漿中の DMP1 量を計測すると，ラットの週齢の増加に伴い，DMP1 量が減少することが明らかとなった。DMP1 とその他の骨代謝マーカーとの相関性を検討すると，Dkk-1，オステオカルシンとの相関性が高いことが示された。また，運動が制限され，力学的負荷の無い環境下では DMP1 量が減少することも明らかとなった。

DMP1 の ELISA により血液中の DMP1 を定量化することで，生体内の DMP1 を非侵襲的に測定し，その変化から骨細胞の機能を推測出来る可能性が示唆された。今後は，DMP1 と骨代謝との関連性や骨関連疾患における DMP1 の発現変化の検索を引き続き行い，DMP1 の詳細な機能を明らかにするとともに，様々な疾患や病態の診断マーカーとしての有効利用を検索したい。

本総説は，Bone に掲載された論文 Novel sandwich ELISAs for rat DMP1: Age-related decrease of circulatory DMP1 levels in male rats をもとに内容を追加し，日本語で解説した。

謝　辞

本稿で概説した研究を遂行するにあたり，多大なるご指導とご助言を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔病理学教室 豊澤悟教授に心より感謝申し上げます。また，多くのご助言とご協力を頂きました口腔病理学教室の皆様および共同研究の先生方に深謝いたします。

文　献

1）Tagliabracci, V. S., Engel, J. L., Wen, J., Wiley, S. E., Worby, C. A. , Kinch, L. N., Xiao, J., Grishin, N. V. and Dixon, J. E.（2012）: Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science*, 336, 1150–1153

2）Gericke, A., Qin, C., Sun Y., Redfern, R., Redfern, D., Fujimoto, Y., Taleb H., Butler, W. T. and Boskey, A. L.（2010）: Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization. *J Dent Res*, 89, 355–359.

3）Gajjerman, S., Narayanan, K., Hao, J., Qin, C. and George, A.（2007）: Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J Biol Chem*, 282, 1193–1204.

4）Tartaix, P. H., Doulaverakis, M., George, A., Fisher, L. W., Butler, W. T., Qin, C., Salih, E., Tan, M., Fujimoto, Y., Spevak, L. and Boskey, A. L.（2004）: In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions. *J boil Chem*, 279, 18115–18120.

5）Qin, C., Brunn, J. C., Cook, R. G., Orkiszewski, R. S., Malone, J. P., Veis, A. and Butler, W. T.（2003）: Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem*, 278, 34700–34708.

6）Huang, B., Maciejewska, I., Sun, Y., Peng, T., Qin, D., Lu, Y., Bonewald, L., Butler, W. T., Feng, J. and Qin, C.（2008）: Identification of full-length dentin matrix protein 1 in dentin and bone. *Calcif Tissue Int*, 82, 401–410.

7）Schaffler, M. B. and Kennedy, O. D.（2012）: Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep*, 10, 118–125.

8）Marotti, G.（1996）: The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol*, 101, 25–79.

9）Kmioka, H., Ishihara, Y., Ris, H., Murshid, S. A., Sugawara, Y., Takano-Yamamoto, T. and Lim, S. S.

(2007): Primary cultures of chick osteocytes retain functional gap junctions between osteocytes and between osteocytes and osteoblasts. *Microsc Microanal*, 13, 108–117.

10) Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M. and Manolagas, S. C. (1998): Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*, 13, 793–802.

11) Manolagas, S. C. (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21, 115–137.

12) Parfitt, A. M. (1993): Bone age, mineral density, and fatigue damage. *Calcif Tissue Int*, 53 (Suppl 1), S82–86.

13) Nefussi, J. R., Sautier, J. M., Nicolas, V. and Forest, N. (1991): How osteoblasts become osteocytes: a decreasing matrix forming process. *J Biol Buccale*, 19, 75–82.