

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15752

研究課題名(和文) 妊婦授乳婦の日焼け止めと子どものエナメル質低石灰化症発症との関連

研究課題名(英文) Vitamin D regulates dental epithelial cell differentiation and enamel formation

研究代表者

中村 卓史 (Nakamura, Takashi)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90585324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ビタミンDがエナメル形成時の石灰化にどのような役割を演じているのかを明らかにし、Molar Incisor Hypomineralization (MIH)の発症との関連を見出すことを目的としている。本研究成果より、活性型ビタミンD3は歯原性上皮細胞においてエナメル芽細胞への分化誘導因子であることが明らかとなった。また、ビタミンD欠乏餌を12週間与えることにより、血中のビタミンD(25OHD2, 25OHD3)濃度が低下したビタミンD欠乏モデルラットが作成でき、ビタミンD欠乏モデルラットから出生したラットの切歯と臼歯は摩耗し、エナメルの石灰化不全が疑われた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to elucidate the mechanism of vitamin D during enamel formation as well as enamel mineralization. 1,25(OH)2D3 promoted the expression of a series of enamel matrix proteins such as Ameloblastin, enamelin, and amelogenin in dental epithelial cells. Thus, 1,25(OH)2D3 promotes dental epithelial cell differentiation into ameloblast. In addition, long term culture of dental epithelial cells in the presence of 10⁻⁷M 1,25(OH)2D3 with mineralization media induced the mineralization of culture cells as well as secreted matrices. Attrition of the tip of incisors and molars are observed in rats which feed vitamin D-deficient diet for 12 weeks. Furthermore, incisors of vitamin D-deficient rats showed chalky white enamel suggesting enamel hypomineralization. These results suggest that 1,25(OH)2D3 is an essential vitamin for normal enamel formation.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：エナメル ビタミンD ビタミンD欠乏症 25OHD3 歯原性上皮細胞 紫外線 1,25(OH)2D3

1. 研究開始当初の背景

美白ブームと日焼け止めクリームの多用により、若い女性の紫外線曝露時間が極端に減少しており、その結果ビタミン D 不足者が増加している。最近国内でも小児くる病の発症も増加傾向にある。一般にくる病ではエナメル低石灰化症が引き起こされることが知られているが、小児歯科領域において最近 Molar-Incisor-Hypomineralization (MIH) という疾患の報告が増えてきている。Molar Incisor Hypomineralization (MIH) は、第一大臼歯および切歯に限局して発症するエナメル低石灰化症であり、最近になって外来患者でも散見するようになり、2000 年以降論文の報告数も増加傾向にある。第一大臼歯および切歯は出生前後から歯冠の石灰化が始まる事から、MIH の発症原因については、分娩時の低酸素・低栄養、妊娠期間中の薬剤の摂取などが考えられているが、未だに明らかにはなっていないのが現状である。MIH 報告件数の近年の増加傾向と周産期医療の日々の進歩を考えると分娩時の低酸素・低栄養が原因であることは否定的である。そこで我々は、近年日光浴時間の現象によるビタミン D 不足者に注目した。健康な妊婦の血中ビタミン D (25OHD) を計測すると、成人の正常値が 30 ng/mL であるのに対し、ほぼすべての妊婦がビタミン D 欠乏症のレベルまで、血中ビタミン D が低下していた。このような背景から、血中ビタミン D の低下がエナメルの形成や石灰化にどのような影響があるのかを明らかにしていく必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、ビタミン D がエナメル形成時の石灰化にどのような役割を演じているのかを明らかにし、低ビタミン D の妊婦・授乳婦の子ども切歯と第一大臼歯のエナメル低石灰化症の発症リスクについて検討し、MIH の病態発症機構を解明することを目的とする。さらに、本研究結果を国内外の学会で発表することにより、過度の紫外線防止が、子どものエナメル質低石灰化を引き起こす可能性について情報発信していき、MIH 発症リスクの改善につなげたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 歯原性上皮細胞からエナメル芽細胞に分化する過程における活性型ビタミン D₃ の役割

歯原性上皮細胞を高密度で 1 型コラーゲンコート 48 穴プレートに播種し、細胞接着後、石灰化培地 (2.5mM ベータグリセロリン酸、アスコルビン酸、2mM 塩化カルシウム) に交換し、0, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M の活性型ビタミン D₃ 存在下で 48 時間培養し、遺伝子発現変化をリアルタイム

RT-PCR で検討した。また、同様に 1 週間培養し、アリザリンレッドを用いて石灰化を検討した。さらに、培養 1 週間後の細胞を固定後、透過型電子顕微鏡で結晶構造と元素分析を行った。

(2) 歯原性上皮細胞におけるビタミン D 代謝酵素発現評価

マウス胎生 15.5 日齢第一臼歯歯胚を器官培養し、培養系に 10⁻⁷M 活性型ビタミン D₃ を添加した群と未添加群の mRNA をそれぞれ調整し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて Cyp24a1, Cyp27a1, Cyp27b1, Cyp2R1 の遺伝子発現解析を行った。

(3) ビタミン D 欠乏餌飼育ラットのエナメル形成評価

12 週間ビタミン D 欠乏餌を与えたラット作成し、血中の 25OHD の濃度を測定した。

(4) マウス歯胚器官培養系を用いたエナメル基質石灰化モデルの確立と石灰化評価

マウス胎生 15.5 日齢第一臼歯歯胚を器官培養し、石灰化培地に活性型ビタミン D₃ の添加した群と未添加群の培養歯胚から凍結切片を作成し、アリザリンレッド染色を行った。

(5) 実験 (3) で得られたビタミン D 欠乏ラットを交配させ、ビタミン D 欠乏妊娠および仔ラットを作製し、胎仔ラットのエナメル形成評価と石灰化評価

12 週間ビタミン D 欠乏餌を与えた親ラットを交配させ、出生したビタミン D 欠乏仔ラットを作成。出生後もビタミン D 欠乏餌を与え、12 週間飼育した。歯の発生、石灰化を検討するため、マイクロ CT 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯原性上皮細胞に活性型ビタミン D₃ を添加し培養後、エナメル芽細胞への分化マーカーであるアメロプラスチン、エナメリン、アメロゲニン遺伝子の発現を検討した。その結果、10⁻⁹, 10⁻⁸M の活性型ビタミン D₃ でも、コントロールと比較すると弱いながらもアメロプラスチン、エナメリン、アメロゲニン遺伝子の発現誘導が観察された。一方、10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M の活性型ビタミン D₃ 添加群ではコントロールと比較し強いアメロプラスチン、エナメリン、アメロゲニン遺伝子の発現が認められた。この結果から、活性型ビタミン D₃ は歯原性上皮細胞においてエナメル芽細胞への分化誘導因子であることが明らかとなった。

(2) マウス胎生 15.5 日齢第一臼歯歯胚を器官培養し、培養系に活性型ビタミン D₃ を添加し 72 時間後に培養歯胚のビタミン D 代謝酵素遺伝子発現を検討した。その結果、培養歯胚には Cyp27a1, Cyp27b1, Cyp2R1 の

遺伝子が発現していることが明らかとなった。また、Cyp24a1 遺伝子は、培養系に $10^{-7}M$ のビタミンDを添加した群に強く発現していた。

(3) ビタミンD欠乏餌を用いてビタミンD欠乏モデルラットを作成した。ラットの血中ビタミンD(25OHD₂, 25OHD₃)濃度は、平均 103.21 nmol/Lであった。12週間ビタミンD欠乏餌を与えたラットでは 44.57 nmol/L となり、コントロール群と比較し有意にビタミンDの低下が認められ、ビタミンD欠乏モデルラットの作成に成功した。

(4) マウス胎生 15.5 日齢第一臼歯歯胚を石灰化培地(2.5mM ベータグリセロリン酸、アスコルビン酸、2mM 塩化カルシウム)で5日間培養し、 $10^{-7}M$ 活性型ビタミンD₃を添加した群と未添加群の培養歯胚から凍結切片を作成し、アリザリン染色を行った。培養歯胚の内エナメル芽細胞の領域が強くアリザリンに染色された。しかしながら、 $10^{-7}M$ 活性型ビタミンD₃添加群と未添加群の間で、アリザリンレッドの染色性の差は認められなかった。

(5) ビタミンD欠乏ラットから出生したビタミンD欠乏仔ラットにビタミンD欠乏餌を与え、12週間飼育した歯の写真を下図に示す。

ビタミンD欠乏仔ラットの切歯は、コントロールと比較し白色化しており、エナメル形成不全の表現型を呈するアメロプラスチンノックアウトの切歯と類似していた。マイクロCT解析を行うと、ビタミンD欠乏ラットの骨密度の低下が認められた。ビタミンD欠乏ラットの臼歯ではエナメルの石灰化度には有意な差は認められないものの、切歯の切端や臼歯の咬頭の摩耗がコントロール群と比較し亢進していた。

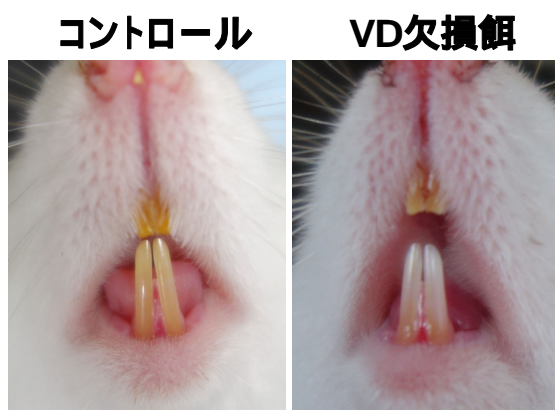


図 ビタミンD欠乏モデルラット

これらの結果から、ビタミンD欠乏餌を12週間与えることにより、血中のビタミンD(25OHD₂, 25OHD₃)濃度が低下したビ

タミンD欠乏モデルラットが作成できることが明らかとなった。また、ビタミンD欠乏モデルラットから出生したラットの切歯臼歯の切端や咬頭が摩耗していることから、エナメルの石灰化に異常があることが推測された。

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9件)

1. Nakamura, T., Jimenez-Rojo, L., Koyama, E., Pacifici, M., de Vega, S., Iwamoto, M., Fukumoto, S., Unda and Yamada, Y. Epiprofin regulates enamel formation and tooth morphogenesis by controlling epithelial-mesenchymal interactions during tooth development, **J. Bone Miner. Res.** 32(3):601-610 2017 査読有り doi: 10.1002/jbmr.3024

2. Nakamura, T., Chiba, Y., Naruse, M., Harada, H., and Fukumoto, S. Globoside accelerates the differentiation of dental epithelial cells into ameloblasts, **Int J Oral Sci.** 8(4):205-212. 2016 査読有り doi: 10.1038/ijos.2016.35

3. Sakisaka, Y., Kanaya, S., Nakamura, T., Tamura, M., Shimauchi, H., and Nemoto, E. p38 MAP kinase is required for Wnt3a-mediated osterix expression independently of Wnt-LRP5/6-GSK3 β signaling axis in dental follicle cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 478(2):527-32. 2016 査読有り doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.076.

4. Liu, J., Saito, K., Maruya, Y., Nakamura, T., Yamada, A., Fukumoto, E., Miyazaki, K., Yoshizaki, K., Ge, L., and Fukumoto, S. Mutant GDF5 enhances ameloblast differentiation via accelerated BMP2-induced Smad1/5/8 phosphorylation **Scientific Reports**, 6:23670. 2016 査読有り doi: 10.1038/srep23670.

5. Li, L., Tang, Q., Nakamura, T., Suh, JG., Ohshima, H., and Jung, HS. Fine tuning of Rac1 and RhoA alters cuspal shapes by remodeling the cellular geometry. 2016; 6: 37828. **Scientific Reports**, 2016 査読有り doi:10.1038/srep37828

6. Tadaki, M., Anada, T., Shiwaku, Y., Nakamura, T., Nakamura, M., Kojima, M., Arai, T., Fukumoto, S., and Suzuki, O.

A 3D culture model study monitoring differentiation of dental epithelial cells into ameloblast-like cells **RSC Advances**, 6(67):62109, 2016 査読有り doi: 10.1039/C6RA04570G

7. Aurrekoetxea, M., Irastorza, I., García-Gallastegui, P., Jiménez-Rojo, R., Nakamura, T., Yamada, Y., Ibarretxe, G., and Unda, F. Wnt/ β -catenin regulates the activity of Epiprofin/Sp6, SHH, FGF and BMP to coordinate the stages of odontogenesis. **Front Cell Dev Biol.** 4-25, 2016 査読有り doi: 10.3389/fcell.2016.00025

8. Ohta, Y., Okabe, T., Larmoura, C., Di Rocca, A., Maijenburg, M., Phillips, A., Speck, NA., Wakitani, S., Nakamura, T., Yamada, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Pacifici, M., and Iwamoto, M. Articular cartilage endurance and resistance to osteoarthritic changes require transcription factor Erg. **Arthritis & Rheumatology**, 67(10):2679-2690, 2015 査読有り doi: 10.1002/art.39243.

9. Nakamura, T., Naruse, M., Chiba, Y., Komori, T., Iwamoto, T., Sasaki, K., and Fukumoto, S. Novel Hedgehog agonists promote osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells. **J Cell Physiol.** 230(4):922-929, 2015 査読有り doi: 10.1002/jcp.24823.

〔学会発表〕(計6件)

1. Li, L., Tang, Q., Nakamura, T., Ohshima, H., and Jung, HS. How to control the cupsal patterning; epithelial morphogenesis, 第59回歯科基礎医学会学術大会、2017年9月16-18日 松本

2. Guang, M., Yoshida, T., Nakamura, T., Gong, P., and Wakamori, M. Zn²⁺ Hyperpolarizes Osteoblastic MC3T3-E1 Cells by Activating IK and BK Channels, The 95th General Session & Exhibition of the IADR, 2017年3月22-25日 San Francisco, USA

3. Yoshida, T., Guang, M., Nakamura, T., and Wakamori, M. The mechanisms of osteoblast differentiation and proliferation stimulated by zinc in MC3T3-E1 cells, 2017 NIH-Japan symposium, 2017年2月15-17日, 仙台

4. Sakisaka, Y., Kanaya, S., Nakamura, T., Tamura, M., Shimauchi, H., and Nemoto, E. A signaling independent of Wnt/GSK3 β signaling is required for Wnt3a-mediated dental follicle differentiation, 2017 NIH-Japan symposium, 2017年2月15-17日, 仙台

5. 中村卓史, 中村友昭, 若森実, 福本敏, エピプロフィンによる骨代謝調節、第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年8月24-26日 札幌

6. Nakamura, T., Fukumoto, S., Aurrekoetxea, M., Unda, F., and Yamada, Y. Transcriptional regulation of Epiprofin, The 12th Tooth Morphogenesis and Development, 2016年6月13-18日 Porvoo Helsinki, Finland

〔図書〕(計1件)

1. エナメル芽細胞の分化制御機構 中村卓史 成瀬正啓 齋藤幹 福本敏 季刊腎と骨代謝 2016 Vol.29, No. 1 15-24 臨床医学出版

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 卓史 (TAKASHI NAKAMURA)

東北大学・歯学研究科(大学院)・准教授
研究者番号: 90585324