

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09505

研究課題名(和文) エナメル上皮細胞の動態を制御するストレス応答性糖代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of stress-responding glycometabolism in ameloblast differentiation

研究代表者

依田 浩子 (IDA, Hiroko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：60293213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル上皮細胞の分化過程では、特にエナメル基質の分泌および石灰化の時期に、エナメル芽細胞およびエナメル器細胞に低酸素や低栄養などのストレス負荷が生じ、オートファジーを介するストレス応答機構が作用している可能性が明らかとなった。さらに、上皮細胞特異的オートファジー不全マウスでは、エナメル質のミネラル沈着の低下およびエナメル芽細胞のアポトーシスの増加とエナメル器の異常が確認され、それらの変化は糖尿病病態で顕著になることより、オートファジーはエナメル芽細胞の機能維持および糖代謝調節に密接に関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により低酸素や低栄養などに対するストレス応答の破綻がエナメル芽細胞の分化を阻害し、エナメル質形成不全を生じさせる可能性が明らかになった。これらの結果より、低栄養や妊娠糖尿病などによる子供のエナメル質形成不全の予防や発症リスクの予測につながると期待できる。エナメル質は象牙質と異なり二度と再生しない組織であるため、その形成過程での異常を未然に予防することは極めて重要である。さらに、母体状態から小児の歯の異常の発症リスク予測が可能となれば、重度齲蝕などの早期診断・治療も可能となることより、臨床的にも非常に意義深い結果がえられた。

研究成果の概要(英文)：In the process of ameloblast differentiation, the stress markers such as hypoxia and malnutrition were observed in the secretory and maturation stages of ameloblasts. At the same time, autophagy was seen in the papillary layer of the maturation stage. Therefore, the stress was loaded to the ameloblasts during secretion and calcification of enamel matrices, and the stress-responding reaction might be associated with autophagy. In the epithelium-specific autophagy deficient mice, the disorder of enamel formation was observed and it was notably in the hyperglycemic condition. These results suggest that autophagy is involved in the functional maintenance and glucose metabolism of ameloblast-lineage cells in amelogenesis.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：エナメル質 ストレス応答 オートファジー 糖代謝 エナメル芽細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮細胞は幹細胞から増殖期・形成期・成熟期エナメル芽細胞とダイナミックに形態的・機能的分化を遂げながら、生体で最も高度に石灰化したエナメル質を完成させていく。その過程では、乏血管性環境にあるエナメル上皮幹細胞や、活発な蛋白合成とエナメル質石灰化に必要な種々のイオン交換を担っている形成期・成熟期エナメル芽細胞は、低酸素・低栄養・酸化ストレスなど種々のストレスを感受し、それらに対する活発なストレス応答機構が作用していることが推察された。しかし、エナメル質形成に関わるストレス応答制御に関する研究はこれまでに無かった。

ストレス応答反応としてのエネルギー代謝調節は、細胞動態を制御する重要な機構であり、その破綻が癌などの疾患発症要因となることが明らかにされている。我々はこれまでに、エナメル芽細胞の分化過程でエネルギー代謝の主軸である糖代謝が時期特異的に厳密に制御されていることを明らかにしてきた経緯があり、エナメル上皮分化過程で糖代謝を制御している要因は細胞内外の環境変化に対するストレス応答であり、オートファジー異常によるストレス応答の破綻がエナメル質形成不全の発症要因になるのではないかと考え、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本課題ではストレス応答機構の「オートファジー」に着目し、オートファジーを介した糖代謝調節機構およびエネルギー供給システムを明らかにし、エナメル質形成を制御する糖代謝の全容解明を目指すことを目的とした。さらに、低酸素・低栄養や酸化ストレスなどのストレスに対するストレス応答の破綻がエナメル芽細胞の増殖や分化にどのような影響を及ぼすのか、さらにエナメル質形成不全の発症との関連性の解明も目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) エナメル上皮細胞分化過程におけるストレス環境の全容把握

##### ① ストレス応答性分子の免疫組織学的検索

マウス上顎切歯の組織切片を用いて、各分化段階のエナメル上皮細胞について、ストレス応答性因子および糖代謝関連分子の発現について免疫組織化学的に検索した。

##### ② エナメル上皮細胞培養・歯胚器官培養実験

マウスエナメル上皮細胞株 (mHAT-9a) およびマウス歯胚器官培養系にて、種々のストレス条件下 (低グルコース、低酸素、酸化ストレス) で培養し、エナメル上皮細胞への影響について形態学的解析および遺伝子発現解析を行った。

#### (2) エナメル質形成におけるオートファジーと糖代謝制御の検討

##### ① 上皮特異的オートファジー不全マウスの作成

オートファジーを上皮細胞特異的に欠損させるため、Keratin14 cre マウスと Atg7<sup>flx/flx</sup> マウスを掛け合わせ、上皮細胞特異的オートファジー不全マウス (K14cre: Atg7<sup>flx/flx</sup> マウス) を作成した。

##### ② 上記マウスにおける歯の検索

生後1日齢から生後1年6ヶ月齢の正常および K14cre: Atg7<sup>flx/flx</sup> マウスの切歯および

臼歯について、エナメル上皮細胞およびエナメル質の変化について、EPMA、マイクロ CT および免疫組織化学的に解析した。

- ③ 歯胚器官培養系におけるオートファジー調節によるエナメル芽細胞変化の解析  
正常マウスの切歯器官培養系にて、オートファジー抑制剤および促進剤の処理によるエナメル芽細胞への影響について解析した。

### (3) 糖代謝異常に起因するエナメル質形成不全の発症の検討

- ① I型・II型糖尿病モデルマウスにおけるエナメル質の解析  
streptozotocin (STZ) 誘発性 I 型糖尿病マウス、および II 型糖尿病マウス (TSOD マウス) を用いて、切歯および臼歯のエナメル質とエナメル芽細胞の変化、オートファジー関連分子 (LC3, p62, Atg7等) と糖代謝関連分子等の発現状況について解析した。
- ② オートファジー不全での糖代謝異常によるエナメル質形成の検索  
K14cre: Atg7<sup>fllox/fllox</sup> マウスに STZ 腹腔内投与により I 型糖尿病を発症させ、切歯エナメル質の変化について形態学的に観察した。

## 4. 研究成果

### (1) エナメル上皮細胞分化過程におけるストレス環境の全容把握

エナメル上皮幹細胞—増殖期—形成期—成熟期の時期特異的なストレス状況 (低酸素・低栄養・酸化ストレス) と糖代謝経路の変化の概要について検索した。

- ① ストレス応答性分子の発現  
生後3週齢マウスの上顎切歯では、低酸素マーカーのHIF-1および低栄養マーカーのAMPKは、基質形成期および成熟期エナメル芽細胞に発現し、オートファジーマーカーのLC3およびAtg7は成熟期の乳頭層細胞に強発現していた。従って、エナメル基質の分泌および石灰化の時期にエナメル芽細胞には多くのストレス負荷が生じており、オートファジーを介するストレス応答機構が作用していることが推察された。
- ② 細胞・器官培養系におけるストレス応答、糖代謝とエナメル質形成との関連性  
マウスエナメル上皮細胞株 (mHAT-9a) では、低酸素環境ではグルコース輸送体 (Glut 1/2, Sglt1/2) の遺伝子発現が有意に上昇し、糖代謝が亢進されることが示された。また、マウス下顎切歯および臼歯の器官培養系では、グルコース輸送体の阻害剤 (Phloridzin, Sotagliflozin) によるグルコース取り込み阻害により、エナメル芽細胞の増殖、分化ならびにエナメル基質形成が障害されることを証明した (Ida-Yonemochi et al. JDR, 2020)。以上より、エナメル質形成過程ではエナメル芽細胞の糖代謝が時期特異的に制御されており、細胞内外からのストレス刺激が糖代謝を変化させ、エナメル質形成の障害をきたす可能性が示唆された。

### (2) エナメル質形成におけるオートファジーと糖代謝制御の検討

- ① 上皮特異的オートファジー不全マウスの歯の解析  
上皮細胞特異的オートファジー不全マウス (K14cre: Atg7<sup>fllox/fllox</sup> マウス) を作成し、生後1日齢から生後1年6ヶ月齢の切歯および臼歯を形態学的に観察した。その結果、EPMAにてエ

ナメル質表層の高石灰化帯の菲薄化とミネラル沈着の低下が確認され、組織学的解析ではエナメル芽細胞のアポトーシスの増加と成熟期の乳頭層細胞の異常が確認された。それらの変化は、ストレプトゾシン (STZ) 投与によりI型糖尿病を発症させたK14cre: Atg7<sup>fllox/fllox</sup>マウスで、より顕著に確認された。

② 歯胚器官培養系におけるオートファジー調節とエナメル芽細胞変化の解析

正常マウスの切歯器官培養系を用いて、オートファジー抑制剤および促進剤存在下によるエナメル芽細胞の変化について解析した。その結果、オートファジーの抑制により、基質形成期のエナメル器細胞の配列に変化が生じた。以上より、基質形成期および成熟期エナメル芽細胞の分化および維持にはオートファジー機構が密接に関与していることが示唆された。

(3) 糖代謝異常に起因するエナメル質形成不全発症機序の解明

① I型・II型糖尿病モデルマウスにおけるエナメル質形成不全の解析

ストレプトゾシン (STZ) 誘発性I型糖尿病マウス、およびII型糖尿病マウス (TSODマウス) の歯の異常について、形態学的解析を行った。その結果、I型糖尿病マウスにはエナメル質形成不全と成熟期エナメル芽細胞のオートファジー関連分子の異常蓄積が確認された。一方、II型糖尿病マウスではEPMA、マイクロCTおよび組織学的に明らかなエナメル質形成異常は確認されなかったが、第三象牙質の添加促進、歯髄結石の形成およびセメント質の肥厚が認められ、これらの変化は加齢に伴い顕著になった。

以上の研究結果より、エナメル上皮細胞の分化過程では、幹細胞の維持、増殖および細胞分化にオートファジーを介したストレス調節と糖代謝制御が重要であることが示され、それらの異常がエナメル質形成不全の発症の一因となることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ida-Yonemochi H, Otsu K, Harada H, Ohshima H.	4. 巻 99
2. 論文標題 Functional Expression of Sodium-Dependent Glucose Transporter in Amelogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 977-986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034520916130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依田浩子, 大島勇人
2. 発表標題 肥満型 2 型糖尿病モデル TSOD マウスにおける口腔組織の経時的変化
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依田浩子, 大島勇人
2. 発表標題 糖代謝異常がマウス歯髄組織へ及ぼす影響
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 依田浩子
2. 発表標題 歯の形態形成におけるエネルギー代謝調節機構
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会学術シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 依田浩子, 監物新一, 大島勇人
2. 発表標題 肥満型糖尿病モデルTSODマウスにおける口腔組織の経時的変化
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国 学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原田 英光  (HARADA Hidemitsu)  (70271210)	岩手医科大学・歯学部・教授    (31201)	
研究分担者	入江 太郎  (IRIE Tarou)  (00317570)	岩手医科大学・歯学部・教授    (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------