

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592405

研究課題名（和文） 糖脂質による歯原性上皮細胞の分化制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulation mechanism of differentiation of dental epithelial cells induced by glycosphingolipids.

研究代表者

釜崎 陽子 （ KAMASAKI YOKO ）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30253678

研究成果の概要（和文）：神経栄養因子 NT-4 を含む多くの増殖因子およびそのレセプターは、歯の発生過程において、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の分化そして上皮間葉相互作用を制御する。糖脂質は、細胞膜を介して発揮される細胞の様々な生理作用に関与している。本研究では、糖脂質 GM3 および LacCer が、発生中の歯胚において、エナメル芽細胞へと分化する上皮部分で強く発現していることを示した。いくつかの実験により、GM3 および LacCer は、NT-4 による *Ambn* 遺伝子の発現のために重要であり、歯原性上皮細胞からエナメル芽細胞への分化に寄与することを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：A number of growth factors, including neurotrophic factor NT-4, and their receptors mediate reciprocal epithelial-mesenchymal interactions that regulate the differentiation of ameloblasts and odontoblasts in tooth development. Glycosphingolipids are involved in a variety of membrane-associated cell physiological functions. In this study, we identified strong expressions of GM3 and LacCer in dental epithelium, which give rise to differentiation into ameloblasts. We obtained the results from some experiments suggesting that GM3 and LacCer are essential for NT-4-mediated *Ambn* gene expression and contribute to dental epithelial cell differentiation into ameloblasts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,500,000	750,000	3,250,000
21年度	500,000	150,000	650,000
22年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児歯科学

キーワード：糖脂質 GM3, 歯原性上皮細胞, エナメル質, 神経栄養因子 NT-4, アメロブラスチン, TrkB,

1. 研究開始当初の背景

歯の再生は、歯科領域研究における最大の目標ともいえる。歯の再生のためには、その

発生分化についての理解が不可欠であるが、発生過程においてどのような分化メカニズムが関与しているのかについては明らかに

なっていない。

糖転移酵素や糖スクレオチド合成酵素など糖鎖の合成に関与している遺伝子の単離と機能解析が急速に進んだことや複雑な生体分子の構造解析に必要な分析技術が急速に進展したことなどを背景に、ポストゲノム研究の対象として糖鎖が注目されている。タンパク質の多くは翻訳後修飾と総称される何らかの分子の修飾を受けるが、このうち、糖鎖付加はリン酸化とともに翻訳後修飾の主演であり、糖鎖の修飾を受けないタンパク質はほとんどないと推測される。糖鎖は生体が病原菌などの異物を見つけて攻撃する目印となり、ウイルス感染時の免疫反応や臓器移植時の拒絶反応などに関わっている。また細胞ががん化すると表面の糖鎖構造は変化する。このほか発生や分化などの生命現象に糖鎖が関与しており、糖鎖の解明は多くの生命現象の理解に直結すると考えられる。

我々は、歯の発生分化における糖鎖の関与について機能解析を開始している。糖鎖研究は、多くの生命科学分野でなされているが、歯科領域において、糖鎖解析を行える知識および技術をもつグループは非常に限られている。我々は、糖脂質合成酵素遺伝子の一つであるGD3合成酵素遺伝子が、エナメル芽細胞の分化過程において、発生段階の初期の上皮部分に特異的に発現し、分化したエナメル芽細胞ではその発現が消失することを報告した(Arch Oral Biol. 50:393-399. 2005.)。

これらのことから、歯の発生への関与が考えられている増殖因子は多種多様であり、糖脂質はこれらの因子による情報伝達を制御している可能性がある為、様々な増殖因子との関与について解析を行うことは、歯の発生分化のメカニズムについての新たな情報が得られると考えられた。

2. 研究の目的

糖脂質は細胞ごとに、あるいは同じ細胞であっても分化段階の違いによって、糖転移酵素の糖鎖付加によりそのプロファイルがダイナミックに変化する。また、これら糖鎖は細胞同士の情報伝達の直接的な修飾因子として、また目印として機能していると考えられる。したがって歯の発生過程においても、各発生ステージにおける糖脂質の発現パターンを明らかにすること、さらにこれら糖鎖の細胞の増殖、分化に及ぼす影響に関して解明する必要がある。また、歯の発生への関与が考えられている因子は多種多様であり、糖脂質はこれら因子による情報伝達のほぼ全てを制御している可能性が高い。発生初期に発現する糖脂質が、細胞の分化や増殖の方向性に何らかの調節を行っているという予測のもとに、発生初期における歯胚の上皮系細胞より株化した細胞株における、糖脂質の発

現パターンを明らかにすること、さらにこれら糖脂質の関与が考えられる多くの細胞増殖因子およびその受容体との相互作用について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

①細胞

ラット由来歯原性上皮細胞株(SF2)を用いた。培地は、10% FBS, 1% ペニシリン, ストレプトマイシン含有 D-MEM/F-12 を使用した。

②糖脂質抽出と薄層クロマトグラフィー

SF2のペレット2mlから、クロロホルムメタノール系にて糖脂質を抽出しDEAE-Sephadex A-50カラムを用いて精製を行った。抽出した糖脂質を薄層クロマトグラフィー(TLC)にて展開し、酸性分画をresorcinolにて、中性分画をorcinolによって染色を行った。

③組織切片作製、免疫染色

日齢1のワイルドタイプICRマウスの頭部を4% PFAにて4°C下、20時間固定し、臼歯の凍結組織切片を作製した。細胞は、カバーガラス上に播種培養し、4% PFAにて室温下、15分間固定した。1%BSAにより1時間ブロッキング後一次抗体に抗GM3抗体(M2590)、抗LacCer抗体(T7A7)を用い1時間反応させた後、二次抗体としてAlexa 488標識抗ウサギIgG抗体にて染色を行ない、蛍光顕微鏡BZ-8000にて観察を行なった。核の染色にはDAPIを用いた。

④RNA抽出とリアルタイムPCR

各実験群の細胞からトータルRNAをTRIzol法にて抽出し、スーパースクリプトIIを用いてcDNAを作製した。Applied Biosystems StepOne™リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)により、各マーカー遺伝子発現について定量的解析を行なった。

⑤細胞増殖試験

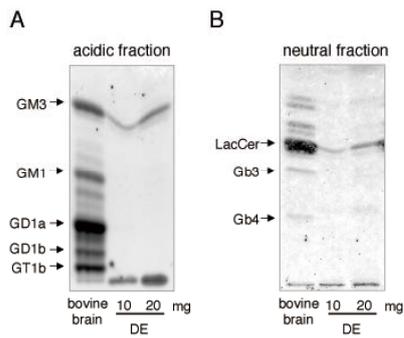
5-bromo-2'-deoxyuridine labeling and detection kit (Roche)を用いてBrdU取り込み試験を行なった。核の染色にはDAPIを用い、蛍光顕微鏡BZ-8000にて観察を行なった。核染色により総細胞数とし、総細胞数における増殖期細胞(BrdUを取り込みFITC標識される)の割合をもって増殖率とした。

⑥ウエスタンブロッティング

核実験群の細胞に対し、100 ng/ml NT-4を加え、0, 5, 15, 30, 60, 120分後に細胞質のタンパクの抽出を行なった。4-20% NuPage Bis-tris gradient gelsで電気泳動し、分離したタンパクをPVDF膜に転写し、抗p44/p42抗体および抗-phospho p44/p42抗体(Cell signaling)によりERK1/2シグナルの検出を行なった。

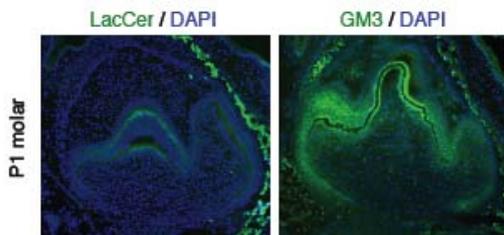
4. 研究成果

(1) 歯原性上皮細胞における糖脂質の検出
①SF2細胞における糖脂質の発現



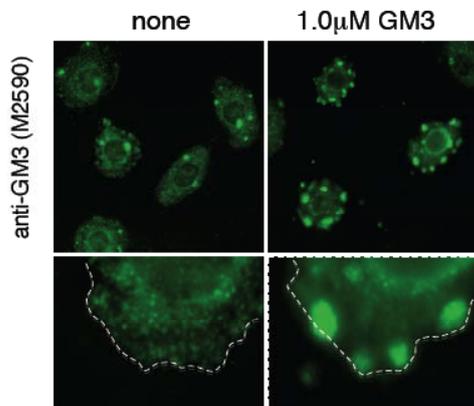
SF2細胞から抽出した糖脂質のうち酸性分画よりGM3が、中性分画よりLacCer, Gb4が検出された。

②マウス歯胚切片上でのGM3, LacCerの発現の確認



日齢1のマウス臼歯歯胚の組織切片上での免疫染色によりLacCerは、上皮組織の中間層に発現が見られた。これに対し、GM3は、より強くかつ広い領域で、エナメル芽細胞、上皮組織の中間層、そして上皮に接した象牙芽細胞に発現が認められた。

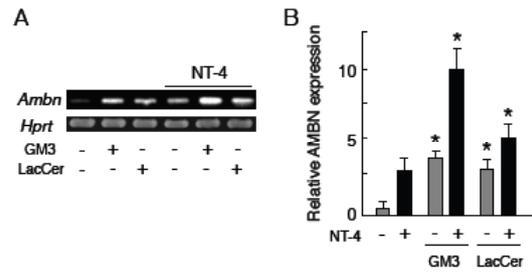
③SF細胞上でのGM3の発現



SF細胞には、GM3の発現が強く認められた。一部でリピッドラフトと呼ばれる糖脂質とコレステロールやスフィンゴミエリンに非常に富んだドメイン構造をとって存在している様子が観察される。リピッドラフトの形成は、細胞の機能を変化させることが知られる。これに対し、GM3を培地中に加えることで、ラフトと思われるGM3が濃く発現しているエリアが増えていることが観察された。

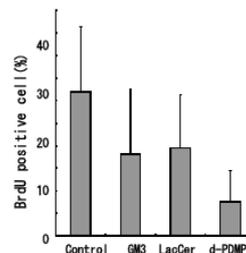
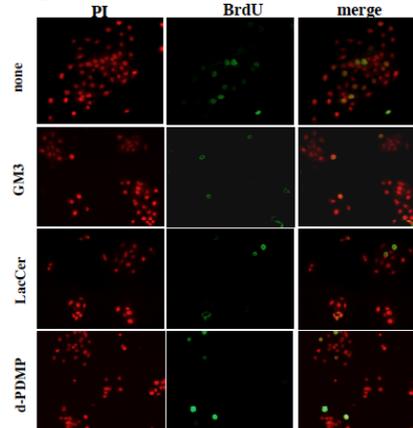
(2) SF2細胞における *Ambn* 遺伝子の発現-GM3,

LacCerによる誘導と神経栄養因子NT-4による相乗的効果



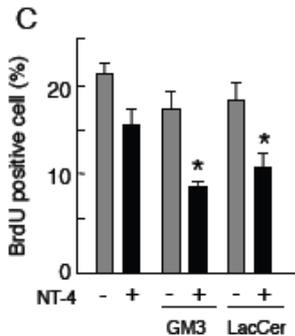
Ambn 遺伝子はエナメル芽細胞への分化のマーカーと考えられる。SF2細胞の培地に1μM GM3またはLacCerを加えた場合、*Ambn* 遺伝子の発現が強く認められた。また、SF2細胞の*Ambn* 遺伝子発現を誘導することが報告されている神経栄養因子NT-4を100ng/mlの濃度で培地中に添加することで、さらにその効果が増強された。リアルタイムPCRにより*Ambn* 遺伝子の定量的解析を行なったところ、NT-4により約6倍、GM3により8倍の誘導効果を認め、両者の共存により22倍にも発現は増えた。これに対し、LacCerにより約7倍の*Ambn* 遺伝子の発現増強が認められたが、NT-4との相乗的な効果は有意な差となつては現れなかった。このことにより、GM3, LacCerは歯原性上皮細胞をエナメル芽細胞へと分化誘導する作用があることが示唆された。またGM3については、NT-4により誘導されるエナメル芽細胞への分化誘導作用を相乗的に強めることが示唆された。

(3) SF2細胞の増殖抑制-GM3, LacCerによる影響とNT-4によるその相乗的効果



SF2細胞にGM3, LacCerおよびグルコシルセラミド合成阻害材(D-PDMP)を5μMの濃度

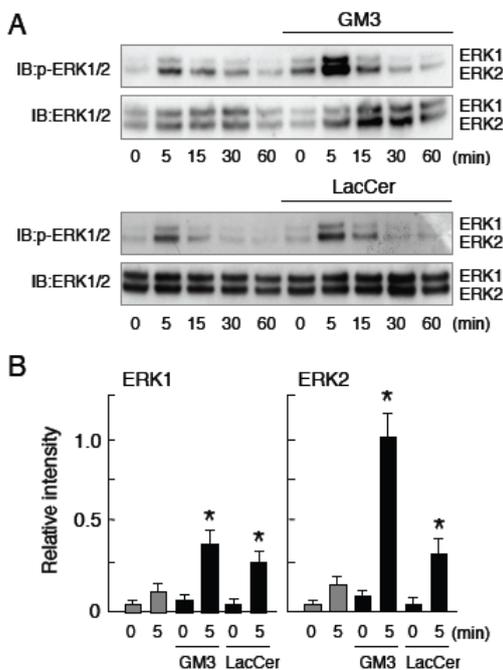
で添加することにより、増殖能を抑制することが BrdU 取り込み試験により明らかであった。D-PDMP は、細胞の糖脂質合成を阻害することにより、細胞が本来発現している糖脂質が枯渇することが知られている。GM3, LacCer 以外の糖脂質の発現も抑えてしまうことにより、細胞増殖能は抑制されたものと考えられる。



GM3, LacCer の細胞増殖抑制の効果は、SF2 細胞の増殖抑制効果を報告されている神経栄養因子 NT-4 を 100ng/ml の濃度で培地中に添加することで、その効果が増強された。

(4) SF2 細胞における NT-4 によるシグナル伝達-GM3, LacCer による影響

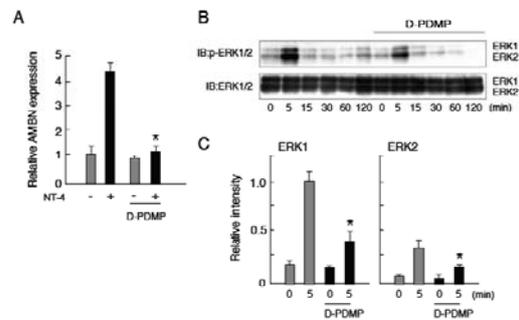
SF2 細胞において、NT-4 はそのレセプターである TrkB と結合し ERK1/2 経路を介して *Ambn* 遺伝子の発現を促進させることが報告されている。そこで、このシグナル伝達における GM3 および LacCer の影響について解析を行なった。



1 μ M GM3 または LacCer を添加して培養した SF2 細胞では、NT-4 による ERK1/2 のリン酸化が強く現れることがわかった(A)。SF2 細胞では、自身が NT-4 を発現しているため、オ

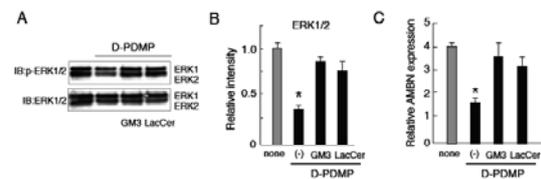
ートクライン様式で ERK1/2 シグナルを活性化させていることが考えられるが、GM3 または LacCer を加えることにより持続的に ERK1/2 のリン酸化を生じていた。特に NT-4 添加後 5 分から 15 分後でより強く生じていた。これを、3 回の実験により確認を行ない、グラフ化した (B)。GM3 は、NT-4 による ERK1 ERK2 のリン酸化をそれぞれ 3 倍、6 倍にも強く生じさせ、同じく LacCer は 2.5 倍、2 倍に生じさせていた。このことから、GM3 または LacCer は、NT-4 が伝える ERK1/2 経路の活性化を促進させることによって、歯原性上皮細胞の分化に寄与していることが示唆された。

(5) NT-4 による歯原性上皮細胞分化における糖脂質の重要性
 これまでに、SF2 細胞の分化において GM3 または LacCer の関与が重要であることが分かっていたが、これを確認する目的で D-PDMP を用いて、細胞上の糖脂質の生合成を阻害する実験を行なった。



D-PDMP による SF2 細胞上の糖脂質の生合成阻害の結果、NT-4 が誘導する *Ambn* 遺伝子の発現誘導は見られなくなった (A)。

同じく NT-4 刺激による ERK1/2 のリン酸化の減少も認められた (B, C)。このことにより、NT-4 による SF2 細胞のエナメル芽細胞への分化誘導において、糖脂質の存在が重要な役割を果たすことが示唆された。



GM3 と LacCer は、SF2 細胞上の主要な糖脂質であることから、この二つの糖脂質により、D-PDMP 処理後減少した NT-4 刺激後 5 分の時点での ERK1/2 のリン酸化が回復するかどうか確認を行なった。GM3 と LacCer により、ほとんど元のレベルまで ERK1/2 のリン酸化が回復していた (A, B)。同じく *Ambn* 遺伝子の発現レベルについてもリアルタイム PCR により確認を行なった。D-PDMP 処理後減少した NT-4 が誘導する *Ambn* 遺伝子の発現レベルは、GM3 と LacCer により回復することがわかった。

これらの結果により SF2 細胞の分化過程における NT-4 によるシグナル伝達には GM3 と LacCer が重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の結果は論文としてまとめ、現在 Journal of Dental Research に投稿中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

釜崎 陽子 (KAMASAKI YOKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科
・助教

研究者番号：30253678

(2) 研究分担者

佐々木康成 (SASAKI YASUNORI)

神奈川県立病院機構・神奈川県立こども医療福祉センター・歯科科長

研究者番号：70332848

西口美由季 (NISHIGUCHI MIYUKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科
・助教

研究者番号：10253676

日高 聖 (HIDAKA KIYOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科
・助教

研究者番号：10389421

山田亜矢 (YAMADA AYA)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40295085

(3) 連携研究者

藤原 卓 (FUJIWARA TAKU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科
・教授

研究者番号：00228975

福本 敏 (FUKUMOTO SATOSHI)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30264253