

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592329

研究課題名（和文） 歯牙発生時の硬組織形成細胞の分化・機能調節、基質石灰化における基質蛋白の機能解析

研究課題名（英文） Role of matrix proteins on the differentiation and activity of hard tissue forming cells and calcification during tooth formation.

研究代表者

内田 隆（UCHIDA TAKASHI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50150305

研究成果の概要（和文）：

エナメル基質蛋白の一種であるアメロブラスチンが、*in vitro* においてエナメル器由来の細胞の増殖を抑制し、他のエナメル基質蛋白であるアメロゲニンやエナメリンの発現を調節していることを明らかにした。また、*in vivo* では歯根形成過程において、アメロブラスチンがヘルトビッチ上皮鞘細胞の正常な増殖と分化に必要であることを明らかにし、さらにアメロブラスチンが象牙芽細胞及びセメント芽細胞の分化に関わっている可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

This study clarified that ameloblastin, one of the enamel matrix protein, suppressed mitotic activity and raised expression of amelogenin and enamelin of the ameloblast-lineage cell *in vitro*, and was essential for normal mitosis and differentiation of cells of Hertwig's epithelial root sheath during root formation *in vivo*. Moreover, ameloblastin is supposed to be one of the candidate molecules of inducing differentiation of odontoblasts and cementocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔解剖学（含組織学・発生学）

科研費の分科・細目：歯科・形態系基礎歯科学

キーワード：歯の発生、エナメル蛋白、アメロブラスチン、歯根形成、細胞増殖、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

エナメル基質蛋白は、エナメル質の形態形成、石灰化等に直接関わっていることは明らかであるが、近年の研究により、実際にエナメル質基質形成に関与しない細胞、すなわちエナメル質形成開始以前の分化期エナメル芽細胞や、ヘルトビッチ上皮鞘の細胞、象牙芽細胞と歯髓細胞の一部においてもエナメル基質蛋白が合成・分泌されていることが示

されている（Uchida et al., *Biomed Res*, 24:205, 2003.; Nagano et al., *J Dent Res* 82:982, 2003.）。

一方、これらエナメル基質蛋白は、*in vitro* で TGF- β や BMP の遺伝子発現に影響することが示されているが（Suzuki et al., *J Dent Res* 84:510, 2005.）、エナメル芽細胞の分化、あるいは象牙質やセメント質形成におけるエナメル基質蛋白の役割については明らか

にされていない。さらに、エナメル基質蛋白の一次構造は種特異性に乏しい反面、mRNAの択一的スプライシングによる多様性を持つが、この分子多様性の意義や、これら多様な分子間の相互作用についても、ごく一部が明らかにされているにすぎない (Ravindranath et al., J Biol Chem 14:282, 2007.)。

申請者らは、エナメル芽細胞の分化過程において、エナメル基質蛋白であるアメロゲニンやアメロブラスチンの発現分子型について検討し、発現する分子型そのものや、それらの相対的発現量が、基質形成期と分化期では異なることを見いだした (Ravindranath et al., J Biol Chem 14:282, 2007.)。これは、エナメル質形成開始以前に発現している基質蛋白が、細胞の分化に関わっていることを強く示唆する。また、歯根セメント質の初期形成過程では、まずヘルトビッチ上皮鞘の細胞がアメロブラスチンを発現し、ついでその細胞と接触する歯小囊の間葉細胞がセメント質基質蛋白を発現すること、マラッセの上皮遺残でのアメロブラスチン発現が停止すると、無細胞セメント質の形成も停止することを見いだした。これは、アメロブラスチンがセメント芽細胞の分化やその機能調節に関わっていることを強く示唆する。

2. 研究の目的

本研究は、歯牙組織の形成過程において、エナメル芽細胞やヘルトビッチの上皮細胞などのエナメル器由来の細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞等の歯小囊由来の細胞が発現するエナメル基質蛋白が、歯牙および歯周組織構成細胞の分化やその機能調節、あるいは石灰化において担っている役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) ameloblast lineage cell line におけるアメロブラスチン発現の影響：エナメル基質蛋白のうち、アメロゲニン、エナメリンおよびタフテリンを発現しているがアメロブラスチンを発現しない ameloblast lineage cell line (秋田大学大学院医学専攻病態制御医学系分子機能学・代謝機能学講座、杉山俊博教授より供与) にアメロブラスチン遺伝子を導入し、アメロブラスチンを強制発現させた。この細胞について、アメロブラスチンを発現させた際の細胞増殖活性の変化、アメロゲニン、エナメリンおよびタフテリンの遺伝子発現の変化について検討した。
- (2) エナメル器由来の細胞におけるアメロブラスチン発現抑制の影響：生後10日のマウス下顎切歯の apical

bud (切歯成長端部でエナメル器の上皮細胞が恒常的に細胞分裂を行っている部位) を採取してトリプシン-EDTA 処理により細胞を分離し、この細胞群からアメロブラスチン、アメロゲニン、エナメリンの発現を指標として細胞の性格を同定した。これら3種類のエナメル基質蛋白を恒常的に発現している細胞を単離して、エナメル芽細胞様細胞とした。このエナメル芽細胞様細胞のアメロブラスチン発現を、アメロブラスチン siRNA を作用させることによってノックダウンし、この場合の細胞増殖活性の変化、アメロゲニン、エナメリンの発現の変化について検討した。

- (3) 培養歯胚におけるアメロブラスチン発現抑制の影響：生後10日のマウス下顎骨より第1臼歯歯胚 (歯根形成初期の状態) を取り出し、培養下での cervical loop の成長、歯根形成過程を観察し、それに対するアメロブラスチン siRNA の影響について検討した。
- (4) *in vivo* でのアメロブラスチン発現抑制の影響：生後10日のマウス下顎骨の第1臼歯歯胚の近心舌側部に、アメロブラスチン siRNA を直接注入してアメロブラスチンをノックダウンし、注入後5日におけるヘルトビッチ上皮鞘の形態変化と細胞増殖活性を組織化学的に検討した。また注入後5日と10日の歯根長を計測し、対照群と比較した。

4. 研究成果

- (1) ameloblast lineage cell line におけるアメロブラスチン発現の影響：アメロブラスチンを発現しない ameloblast lineage cell line に、アメロブラスチン遺伝子を導入し強制発現させた。遺伝子導入2日後のアメロブラスチンの遺伝子発現を RT-PCR で調べ、対照群と比較すると、対照群では全く発現していなかったアメロブラスチンは遺伝子導入群では強発現していた。また、アメロゲニン、エナメリン、タフテリンの遺伝子発現を RT-PCR で調べ、対照群と比較すると、アメロゲニン、エナメリンの遺伝子発現は、アメロブラスチン遺伝子導入群で対照群に比べて優位に高かった。しかし、タフテリンの発現は両群間で差が認められなかった。また、遺伝子導入後培養3日及び6日の細胞数を数えると、アメロブラスチン遺伝子導入群

では対照群に比べて細胞数が有意に少なく、細胞増殖活性が低下していると考えられた。そこで、アメロブラスチン強制発現が細胞周期に関係している可能性を探るため、遺伝子導入1日後に細胞周期関連因子(p21Cip1、p27Kip1、CDK1、CDK4、CDK6)の遺伝子発現をRT-PCRで調べた。この結果、p21Cip1とp27Kip1の遺伝子発現は、アメロブラスチン遺伝子導入群で対照群に比べて有意に亢進していたが、CDK1、CDK4及びCDK6の遺伝子発現には差は認められなかった。

- (2) エナメル器由来の細胞におけるアメロブラスチン発現抑制の影響：マウス切歯のcervical loopから単離したアメロブラスチン、アメロゲニン、エナメルリンを恒常的に発現しているエナメル芽細胞様細胞を、設計した数種類のアメロブラスチン siRNA 存在下で2日間培養し、アメロブラスチン遺伝子発現をRT-PCRで調べた。その結果、アメロブラスチンの遺伝子発現を約60%低下させるアメロブラスチン siRNA が得られた。そこで、このアメロブラスチン siRNA 存在下でのアメロゲニン、エナメルリンの遺伝子発現をRT-PCRで、また細胞増殖活性をBrdUの取り込みを指標として調べた。この結果、アメロブラスチン siRNA を作用させ群では対照群に比べアメロゲニン、エナメルリンの遺伝子発現は有意に低下していた。一方、細胞増殖の指標となるBrdUの取り込み量は有意に増加していた。
- (3) 培養歯胚におけるアメロブラスチン発現抑制の影響：生後10日のマウス下顎骨より第1臼歯歯胚(歯根形成初期の状態)を取り出し、培養下でのcervical loopの成長、歯根形成過程を観察した。しかし、歯胚周囲の骨組織の付着状況、歯胚採取時の外力等による影響を均一に保つことができず、培養下でのcervical loopの成長は歯胚毎に様々であり、定量的解析は不可能であった。そのため、培養歯胚に対するアメロブラスチン siRNA の影響についての検討は断念した。
- (4) *in vivo* でのアメロブラスチン発現抑制の影響：まず、マウスの歯根形成初期歯胚に *in vivo* でアメロブラスチン siRNA を作用させ得るか否かを検討するため、生後10日のマウス下顎骨第1臼歯歯胚の近心舌側部に、トルイジンブルーを注入した。この結果、

トルイジンブルーは歯胚周囲だけでなく、歯胚の近心部から遠心部に浸透していることが分かった。そこで同様の方法でアメロブラスチン siRNA を注入し、5日後に注入時の障害を受けにくく、かつ siRNA が浸透していると考えられる第1臼歯遠心舌側根のヘルトビッチ上皮鞘の形態を、エナメル上皮のマーカであるサイトケラチン14の免疫染色で調べた。また、細胞増殖については、アメロブラスチン siRNA 注入4日後に動物にBrdUを腹腔内投与し、1日後のBrdUの取り込みを調べた。対照群には、siRNAの代わりに生理食塩水を同様の方法で注入した。また、アメロブラスチン siRNA の注入量を変えて、注入後5日と10日の下顎第1臼歯遠心舌側根を通る矢状断面で組織標本を作製し、歯根長を計測した。この結果、アメロブラスチン siRNA を注入した群においては、ヘルトビッチ上皮鞘の細胞配列が乱れ、時に数層の細胞よりなる部分も認められた。また、ヘルトビッチ上皮鞘細胞においてBrdUを取り込んでいた細胞数は、対照群に比べて有意に多かった。さらに歯根長を対照群と比較すると、アメロブラスチン siRNA 注入後5日では対照群との間に差は認められなかったが、注入後10日では対照群に比べて有意に短く、歯根形成の阻害程度は、注入した siRNA の量に依存していた。

- (5) 以上の結果から、アメロブラスチンは歯の発生において基質蛋白としてエナメル質基質形成の機能を果たすだけでなく、細胞の増殖あるいは分化調節因子として、以下の機能を果たしていると考えられた。①エナメル芽細胞様細胞におけるアメロブラスチンの発現低下は増殖を促進し、ameloblast lineage cell line における強制発現は細胞増殖を抑制し、この際 p21Cip1 と p27Kip1 の発現が低下していたことから、CDK 活性を阻害することにより、アメロブラスチンはエナメル器に由来する細胞の増殖活性を調節している。② ameloblast lineage cell line におけるアメロブラスチンの強制発現は、他のエナメル蛋白、即ちアメロゲニン、エナメルリンの発現を亢進し、エナメル芽細胞様細胞におけるアメロブラスチンの発現低下は、アメロゲニン、エナメルリンの発現を低下させたことから、アメロブラスチンは細胞の分

化を促進し、この結果として、他のエナメル蛋白の発現を亢進する。③生後10日齢のマウス臼歯歯胚において、アメロブラスチンの発現低下は、ヘルトビツヒ上皮鞘の形態異常、細胞増殖の亢進、歯根の成長阻害を引き起こしたことから、歯根形成過程でエナメル器由来の細胞の増殖や機能を調節しているだけでなく、象牙芽細胞あるいはセメント芽細胞の分化あるいは機能を調節している。

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

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4件)

①Sasagawa I., Yokosuka H., Ishiyama M., Mikami M., Shimokawa H. Uchida T., Fine structural and immunohistochemical detection of collar enamel in the teeth of *Polypterus senegalus*, an actinopterygian fish. *Cell Tissue Res.*, 347(2):369-381, 2012. (査読あり)

②Sawada T., Sekiguchi H., Uchida T., Yamashita H., Shintani S., Yanagisawa T., Histological and immunohistochemical analyses of molar tooth germ in enamelin-deficient mouse., *Acta Histochem.* 113(5):542-546, 2011. (査読あり)

③Iizuka S., Kudo Y., Yoshida M., Tsunematsu T., Yoshiko Y., Uchida T., Ogawa I., Miyauchi M., Takata T., Ameloblastin regulates osteogenic differentiation by inhibiting Src kinase via cross talk between integrin beta1 and CD63., *Mol Cell Biol.* 31(4):783-792, 2011. (査読あり)

④Kitagawa M, Kitagawa S, Nagasaki A, Miyauchi M, Uchida T, Takata T., Synthetic ameloblastin peptide stimulates differentiation of human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 56(4):374-379, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 隆 (UCHIDA TAKASHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50150305