

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K21002

研究課題名（和文）神経成長因子受容体p75による歯原上皮の細胞増殖制御機構の解明

研究課題名（英文）The molecular mechanisms by which the nerve growth factor receptor p75NTR regulates odontogenic epithelial cell proliferation

研究代表者

星川 聖良（Hoshikawa, Seira）

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：40900981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：歯科再生分野において歯の発生機序の解明と臨床応用への取り組みは必須課題である。我々は、歯の発生過程で神経栄養因子の一つ、NGFがp75NTRを介し歯原性上皮細胞増殖を促進する事を発見した。p75NTRの細胞内ドメイン（p75NTR-ICD）は膜から遊離し下流にシグナルを伝える別経路が見出されているが、p75NTR-ICDを介した細胞機能調節機構の大部分が未解明である事から、その分子基盤と細胞増殖における役割解明を進める事とした。解析の結果、p75NTR-ICDのタンパク質半減期が極めて短く不安定である事が確認され、その安定性制御にユビキチンプロテアソーム機構が関連していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じ、p75NTR-ICDのタンパク質の安定性の制御には、ユビキチンプロテアソーム機構が関連し、その中でもSCF複合体により特異的に基質認識されている可能性が示唆された。これらのことから、p75NTRタンパク質分解を司る細胞機能調節分子メカニズムの一端が明らかとなった。これらより新たなp75NTR-ICD特異的な細胞機能の制御が可能となり、その分子メカニズムの応用によって、歯科再生分野におけるより詳細な歯の発生メカニズムの解明とその臨床応用技術に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Elucidating the molecular mechanisms of tooth development is crucial for clinical applications in dental regeneration. We discovered that NGF promotes the proliferation of odontogenic epithelial cells via p75NTR during tooth development. This study aimed to elucidate the detailed molecular mechanisms underlying p75NTR-mediated regulation of cell proliferation in odontogenic epithelial cells. p75NTR has been found to undergo protease-dependent cleavage of its intracellular domain (p75NTR-ICD), which transmits signals downstream and is considered an alternative pathway to normal NGF signaling. However, details of the molecular mechanism of p75NTR-ICD-mediated regulation of cellular functions are still largely unknown. This analysis revealed that p75NTR-ICD has an extremely short protein half-life. The results also suggest that the ubiquitin-proteasome system (UPS) is involved in the regulation of p75NTR-ICD protein stability.

研究分野：歯

キーワード：シグナル伝達 歯 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

歯の発生は、歯原性上皮細胞と神経堤由来間葉細胞の相互作用により促進され、増殖因子や成長因子のシグナルが互いに影響しあうことにより調節されている。このような背景から歯の発生メカニズムの解明や臨床応用には、FGF や BMP 等の増殖因子や成長因子により駆動される下流シグナル伝達経路や関連するシグナル分子の同定が重要である。その中でも我々は神経栄養因子 NGF に着目した。NGF は歯髄における神経突起成長や創傷治癒への関与が報告されているが、歯胚の発生段階における役割については明らかにされていなかった。そこで我々は、mRNA 発現解析から NGF とその受容体 p75NTR の両分子が歯胚発生過程で共に発現していることを確認した。一方、同じく NGF をリガンドとする高親和型受容体 TrkA の発現は認めなかった。このことから、歯胚発生段階における NGF シグナルは、おもに p75NTR を介して細胞内に伝達されることが示唆された。さらに、歯原性上皮細胞株 SF2 を用いた解析から、NGF 添加により SF2 の細胞増殖が促進されることを確認した。

神経栄養因子刺激による p75NTR の分子制御メカニズムに関してはこれまで多様なモデルが提唱されている。p75NTR 受容体は、単量体での機能のほか、TrkA とのヘテロ二量体形成や、リガンド結合依存的・非依存的な調節による異なる下流シグナル伝達様式が報告されている。さらに p75NTR は、プロテアーゼ依存的に細胞内ドメイン (p75NTR-ICD) が切断を受け膜から遊離し、下流にシグナルを伝える機構が見出されており、通常の NGF シグナルとは別ルートのオルタナティブ経路と位置づけられている。しかしながら p75NTR-ICD を介した細胞機能調節分子メカニズムの詳細に関してその大部分は依然未解明である。本研究では、それら分子基盤の一端を明らかにし、歯原性上皮細胞増殖における p75NTR-ICD の役割解明に取り組むこととした。

2. 研究の目的

p75NTR-ICD を介した細胞機能調節分子メカニズムの同定が、歯科再生分野における詳細な歯の発生メカニズムの解明とその臨床応用技術の貢献に重要であると考えた。このことから、本解析において NGF シグナルにおける p75NTR-ICD の生理的役割を明らかにするため、p75NTR-ICD タンパク質安定性制御に関わる分子やその制御機構を同定することを主要な目的とした。

3. 研究の方法

(1) p75NTR-ICD のタンパク質分解機構の解析と E3 リガーゼの同定

これまでの知見から p75NTR-ICD はプロテアーゼ依存的なプロセッシングを受けて p75NTR より切り出され、シグナル伝達分子として機能することが示唆されている。予備的な解析において、p75NTR-ICD はそのタンパク質半減期が極めて短く、不安定な特性を有することを、CHX (タンパク質翻訳阻害剤) 処理細胞を用いたウエスタンブロッティング法によるタンパク質量の変化を経時的に追跡する手法で確認した (図 1)。はじめに全長 p75NTR 過剰発現細胞において p75NTR-ICD 分解制御に関わる機構について検討するため、p75NTR からのプロセッシング後の p75NTR の挙動についてプロテアソーム阻害剤を用いて解析した。さらに p75NTR のアミノ酸配列を調べることで p75NTR に結合する E3 リガーゼを選定し、結合配列に変異を導入して免疫沈降法により、その E3 リガーゼと野生型および変異体との間での相互作用、p75NTR ポリユビキチン化を解析した。

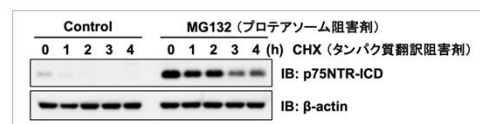


図1. プロテアソーム依存的に迅速な分解を受けるp75NTR-ICDタンパク質

(2) p75NTR-ICD の分解制御分子メカニズムの解析

同定された E3 リガーゼによる p75NTR-ICD 分解制御分子メカニズムを詳しく解析するため、p75NTR-ICD の野生型と E3 結合変異体を細胞内で E3 リガーゼと共発現させ、p75NTR-ICD のタンパク質量の変化を観察した。さらに免疫沈降法、ユビキチン化解析と CHX を用いたタンパク質安定性の解析により p75NTR-ICD がその E3 リガーゼによりプロテアソーム依存的に分解を受けるか検討した。さらに p75NTR-ICD の機能ならびに p75NTR-ICD タンパク質分解の生理的意義を解析する目的で、p75NTR-ICD の野生型と変異型を安定発現する歯原性上皮細胞株を作製し、細胞分化や増殖への影響を検討することとした。

4. 研究成果

(1) p75NTR-ICD のタンパク質分解機構の解析と E3 リガーゼの同定
はじめに全長 p75NTR から p75NTR-ICD がプロセシングにより切り出されてくることを確認するため、p75NTR の安定発現 293T 細胞を作製し、ウエスタンブロッティング法により p75NTR と p75NTR-ICD の細胞内におけるタンパク質量を同定した。作製した細胞内では、p75NTR-ICD は恒常的なプロセシングにより細胞内に存在しており、以前に報告のあった TPA 刺激による p75NTR-ICD の増加は認められなかった (図 2)。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理により全長 p75NTR タンパク質量に変化はなかったが、p75NTR-ICD タンパク質の細胞内集積が観察された (図 2)。このことから、プロセシングにより産生される p75NTR-ICD がプロテアソームによる選択的な調節を受けていることが示唆された。次に p75NTR-ICD を分解する E3 リガーゼを同定するため、p75NTR アミノ酸配列精査したところ、ICD 領域内に SCF E3 リガーゼ複合体の基質認識受容体サブユニット F-Box タンパク質の 1 つが特異的に認識する配列が認められた。結合配列に変異を導入して、免疫沈降法により E3 リガーゼとの結合を p75NTR 野生型と比較したところ、その E3 リガーゼは p75NTR 野生型と結合し、変異型との結合は消失していた。さらに、E3 リガーゼと結合した p75NTR 野生型が *in vitro* ユビキチン化反応によりポリユビキチン化修飾を受けることをあわせて確認した (図 3)。これらのことから、同定した E3 リガーゼは p75NTR の ICD 内に存在するコンセンサスモチーフを介して p75NTR に結合し、p75 をユビキチン化することが示された。また、プロテアソーム阻害剤を用いた解析から p75NTR-ICD タンパク質の分解、安定性の制御にはユビキチンプロテアソーム機構が関連していることが示唆された。

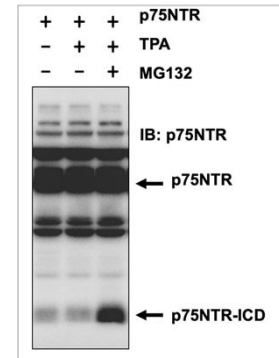


図2. プロテアソーム阻害剤処理後の p75NTR-ICD タンパク質の細胞内集積

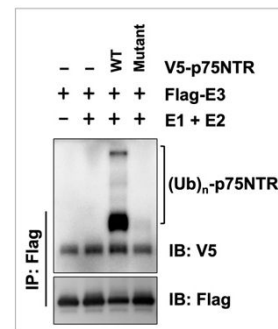


図3. E3 リガーゼによる p75NTR への結合とポリユビキチン化修飾

(2) p75NTR-ICD の分解制御分子メカニズムの解析

全長 p75NTR を用いた解析の結果、p75NTR-ICD タンパク質がプロテアソームによる迅速な分解を受けていることから、p75NTR-ICD 発現プラスミドを用いて p75NTR-ICD 分解制御分子メカニズムを詳細に解析することとした。CHX アッセイによるタンパク質半減期の解析から、p75NTR-ICD タンパク質の半減期は 1 時間程度と極めて短く、不安定な特性を有することが確認された (図 4)。さらに F-Box タンパク質認識配列に変異を導入したところ、p75NTR-ICD のタンパク質半減期延長が観察され、E3 リガーゼと p75NTR-ICD の機能的相互作用が確認できた。E3 リガーゼ結合コンセンサスモチーフを介した E3 リガーゼと p75NTR-ICD の特異的相互作用とユビキチン化の解析については、p75NTR-ICD タンパク質の極めて不安定な特性から、さらなる条件の検討が必要である。加えて、歯原性上皮細胞株 SF2 細胞において野生型および E3 リガーゼコンセンサスモチーフに変異を導入した安定化型 p75NTR-ICD を発現させることが可能であることを確認した。

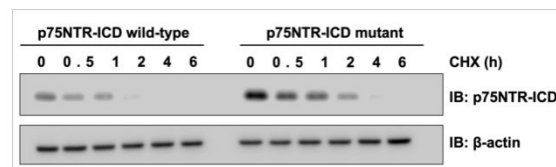


図4. E3 リガーゼ結合配列変異導入による p75NTR-ICD タンパク質安定化

今後は、野生型と安定化型 p75NTR-ICD 過剰発現に伴う細胞内シグナル変化を比較・解析し、p75NTR 下流シグナルについて詳細な解析を進める予定である。また、安定化型 p75NTR-ICD 発現 SF2 細胞株や p75NTR ノックアウトマウス由来臼歯歯胚への安定化型 p75NTR-ICD 再導入細胞の培養を行い、効率的なエナメル芽細胞分化の増幅法について更なる解析を進めていく予定である。これら p75NTR-ICD 分子機能の有効な解析モデルを確立することで、これまで歯の発生において詳細が不明であった p75-NTR 下流シグナルの生理的な意義の解明とそれら知見を応用した再生技術への貢献が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------