

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463117

研究課題名(和文) エナメル上皮細胞石灰化過程におけるエピジェネティクスの関与

研究課題名(英文) Cooperation of Histone Decetylase and Glucose Transporters during tooth development

研究代表者

齊藤 正人 (Masato, Saitoh)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50337036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 歯などの器官発生において、グルコースは必須なエネルギー源であり、細胞膜を介してのグルコース輸送は、主にglucose transporters (GLUTs)が行っている。カルシウムイオンは、神経伝達、筋収縮、腺分泌、発生・分化など様々な生理機構に関与する重要なシグナル分子である。本研究は、歯胚形成過程におけるGLUTsおよびCa動態について観察した。

研究成果の概要(英文)：Glucose, an essential source of energy for determination of size and form during tooth development, is transported across the cell membrane by glucose transporters (GLUTs). Modulation of Ca<sup>2+</sup> is a signaling system involved in the regulation of a wide range of biological processes including contraction, secretion, gene expression, proliferation, and differentiation. In the present study, we observe to plays a role with GLUTs and Ca signaling during tooth development.

研究分野：小児歯科

キーワード：エピジェネティクス 歯胚発生 カルシウムシグナリング

### 1. 研究開始当初の背景

歯などの器官発生において、グルコースは必須なエネルギー源である。細胞膜を介してのグルコース輸送は、主に glucose transporters ( GLUTs ) が行っている。グリコーゲンは胎生期の組織に広く分布し、マウスの歯胚においてもエナメル器や歯小嚢、歯髓の細胞に時期特異的に貯蔵が観察されるとの報告がある。エナメル質の石灰化過程において、エナメル芽細胞は、グリコーゲンの合成分解に寄与しており、一過性に細胞内にグリコーゲンを貯蔵することでその後の細胞分化に必要なエネルギーを確保することが明らかになっている。

### 2. 研究の目的

歯などの器官発生において、グルコースは必須なエネルギー源であり、細胞膜を介してのグルコース輸送は、主に glucose transporters ( GLUTs ) が行っている。GLUTs によって細胞内に取り込まれたグルコースは、必要に応じて細胞質内にグリコーゲンとして貯蔵される。グリコーゲンは胎生期の組織に広く分布し、歯胚においてもエナメル器や歯小嚢、歯髓の細胞に時期特異的に貯蔵が観察される。歯胚発育初期は細胞増殖も盛んでグルコースの需要が高く、発育初期の歯胚において GLUT1 を阻害した場合、歯胚の大きさに影響を与える。また、GLUT3 はマウス胚発生の過程で栄養外胚葉に局在を示し、GLUT3 ノックアウトマウスでは胚発生が停止または胚吸収が起こることが明らかになっている。

細胞内の  $Ca^{2+}$  はセカンドメッセンジャーとして、細胞増殖や細胞分化など様々な細胞機能を制御していることから、エナメル芽細胞の細胞機能には  $Ca^{2+}$  が深く関与する可能性が考えられる。SF2 細胞は、分化誘導するとエナメル芽細胞になる。エナメル芽細胞はエナメルマトリックスタンパクを分泌し、ミネラル沈着に適した細胞外環境を形成する。エナメルマトリックスタンパクは分解され、

カルシウムなどのミネラル沈着が起こり、石灰化してエナメル質が形成される。活性型ビタミン D ( VD3 ) は正常な骨形成や石灰化に関与する。VD3 は紫外線により皮膚で生合成されたビタミン D3 が肝臓と腎臓において水酸化されることにより作られる。VD3 は生体内の血中カルシウム濃度の恒常性に関与していることがよく知られており、血清 VD3 濃度の低下が Molar-Incisor Hypomineralization ( MIH ) を引き起こすという報告もあり、エナメル質の石灰化に深く関与している可能性がある。そこで本研究は、マウスの下顎第一臼歯歯胚において GLUTs の発現および局在を免疫組織化学的に、またグリコーゲンの蓄積を Periodic acid-Schiff ( PAS ) 染色にて観察し、歯胚発育過程におけるグルコース代謝について検証し、VD3 による SF2 細胞の分化誘導作用を明らかにするとともに、VD3 による SF2 細胞の分化誘導を実験モデルとして、遺伝子発現と  $Ca^{2+}$  動態の関係を解析した。さらに、SF2 細胞の細胞遊走に伴う  $Ca^{2+}$  動態と SOCE の関係を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 【実験動物】

動物は Jcl:ICR ( ICR ) マウスを日本クレア株式会社より購入した。

妊娠 14 および 17 日において妊娠 ICR マウスをジエチルエーテルにより麻酔後、安楽死させ、子宮を摘出解剖した。生後 1 日の ICR マウスは、ジエチルエーテルにより麻酔にて安楽死させた。その後、すべてのマウスは、頭部を 4% パラホルムアルデヒドにて 4 条件下で 7~10 日間組織固定を行った。

#### 【免疫組織化学染色】

固定が終了した胎生 14, 17 日および生後 1 日の仔マウスの組織は、4% エチレンジアミン四酢酸にて 4 で 30 日間脱灰処理を行い、通法によりパラフィン包埋後に厚さ 5  $\mu$ m の

切片を作製した。作製した各切片は脱パラフィン後、GLUT3の免疫組織化学染色を行った。使用した抗体は、一次抗体には抗ヒト GLUT1 ウサギポリクローナル抗体、抗マウス GLUT3 ヤギポリクローナル抗体を使用した。1%BSA/PBSにより GLUT1 は 20 倍、GLUT3 は 50 倍希釈し使用した。二次抗体には VECTASTAIN ABC キットを使用し Biotin-Avidin 法で反応させた。さらに 0.004% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride を使用して発色反応を行った。

#### 【PAS 染色】

作製したパラフィン切片の一部は、PAS 染色を行った。0.5% Periodic acid に切片を浸漬し洗浄後、Schiff 試薬に浸漬し封入した。

すべての標本は、光学顕微鏡 OLYMPUS DP20 を用いて観察および撮影した。

#### 【細胞培養】

ラット歯原性上皮細胞 (SF2 細胞) は東北大学福本教授より供与された。培養液には 10%FBS, 含有 DMEM F-12 を使用した。石灰化実験での培養液は 2 mM L-Glutamine, 50  $\mu\text{g/ml}$  L(+)-Ascorbic Acid, 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphate disodium salt hydrate, 10% FBS 含有 MEM, を使用した。

#### 【試薬の調整】

1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 (VD3), は実験に用いる時に 3, 10, 30 および 100 nM となるように調整した。CMV-G-GECO1.1 は Dr. Robert Campbell から供与された。Yellow Cameleon-Nano50 は大阪大学永井教授より供与された。

### 3. 細胞増殖能の測定

VD3 添加による細胞増殖能の変化を確認するために、経時的変化と VD3 濃度による変化を観察した。経時的変化の解析では、SF2 細胞を播種し、細胞定着後、VD3 を 100 nM 添加し、1, 3, 5, 7 および 10 日間培養後の細

胞数を血球計算板にてカウントした。濃度による変化の解析では、SF2 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ml で播種し、VD3 を 3, 10, 30 および 100 nM 添加して 3 日間培養後の細胞数を血球計算板にてカウントした。

#### 【石灰化誘導能の解析】

##### 1) アリザリンレッド S 染色

SF2 細胞を播種し、定着後、VD3 100 nM 存在下で、CaCl<sub>2</sub> を 0 mM, 1 mM もしくは 2 mM 添加し 10 日間培養後、70%エタノールで冷却固定し、アリザリンレッド S で 5 分間染色した。

##### 2) アルカリフォスファターゼ・アッセイ (ALP assay)

アリザリンレッド S 染色後のプレートを Cetylpyridinium chloride で脱色を行い、ラボアッセイ™ ALP にて ALP assay を行った。阻害剤には代謝型グルタミン酸受容体阻害薬 (LY341495), プリン受容体阻害薬 (PPADS), PLC 阻害薬 (U73122), IP<sub>3</sub> 受容体および Ca<sup>2+</sup>流入阻害薬 (2-APB), 非選択的 Ca<sup>2+</sup>流入阻害薬 (CdCl<sub>2</sub>), を用いた。

### 4. 研究成果

#### 【帽状期 (胎生 14 日歯胚)】

胎生 14 日のマウス下顎第一臼歯歯胚は組織学的に帽状期の形態を示し、GLUT1 はエナメル器および歯胚周囲間葉組織に (図 1a), GLUT3 は歯堤および歯胚周囲間葉組織に局在を認めた (図 1b)。PAS 染色は歯堤および歯胚周囲間葉組織に陽性反応を認めた (図 4a)。帽状期では、同様の部位に特異的な陽性像を示し、HDAC5, GLUT3 および PAS 陽性反応の局在がほぼ一致していた。

#### 【鐘状期初期 (胎生 17 日歯胚)】

胎生 17 日のマウス下顎第一臼歯歯胚は組織学的に鐘状期初期の形態を示し、GLUT1 は星状網および歯胚周囲間葉組織に (図 2a), GLUT3 は歯堤および歯胚周囲間葉組織に局在が認められた (図 2b)。PAS 染色は、歯堤および歯胚周囲間葉組織に陽性反応を認め

た(図4b). 鐘状期初期では, GLUT1の局在が, PAS陽性反応の局在がほぼ一致していた.

【鐘状期後期(生後1日歯胚)】

生後1日のマウス下顎第一臼歯歯胚は組織学的に鐘状期後期の形態を示し, GLUT1は星状網歯堤側に局在が認められた(図3a,b). GLUT3は星状網歯乳頭側に面する中間層細胞, 特にエナメル質未形成部と一致する部位に限局し(図3c,d), PAS陽性反応と局在が一致した(図4c,d).

【SF2細胞の増殖に対するVD3の作用】

図1は100 nMのVD3存在下で, 1, 3, 5, 7および10日間の培養後の細胞数を測定した結果である. SF2細胞に3, 10, 30および100 nMのVD3を添加し, 3日間培養後の細胞数を測定すると, VD3濃度に依存して増殖が抑制され, 血中正常値の中央値である100 nMのVD3によって約50%に低下することが分かった(図2).

【VD3による石灰化への影響】

アリザリンレッドS染色による石灰化物の沈着は, VD3添加群でCaCl<sub>2</sub>濃度が1 mM以上のときに顕著であった(図5). ALP assayによるALP活性の測定では, VD3添加群でALP活性の顕著な増加が認められたが, 細胞外へのCaCl<sub>2</sub>の添加はALP活性を変化させなかった(図6).

4. VD3添加時のCa<sup>2+</sup>応答

SF2細胞に発現させたG-GECOの蛍光の変化を2分間隔で観察した結果, 37の培養条件下において, 自発的で間欠的な蛍光強度の増加がVD3添加後2~4時間後に多く認められた(図7). その頻度はコントロールと比較して, VD3の添加によって約3倍に上昇したことから, VD3が自発的なCa<sup>2+</sup>応答を増加させることが示唆された(図8). また, 個々の細胞に注目すると, Ca<sup>2+</sup>応答は細胞のある一点から発生し, 発生した場所とは反対方向に細胞が移動していく様子が観察され

た(図7B). SOCE阻害剤のLaCl<sub>3</sub>の添加は, このCa<sup>2+</sup>応答を阻害しなかった. また, CdCl<sub>2</sub>では, Ca<sup>2+</sup>応答の抑制傾向がみられたが完全には阻害されなかった. 一方, ThGとLaCl<sub>3</sub>の共添加によって, Ca<sup>2+</sup>応答がほぼ完全に阻害された.

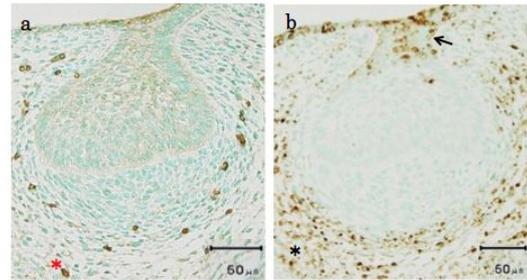


図1: 鐘状期(胎生14日)歯胚における局在

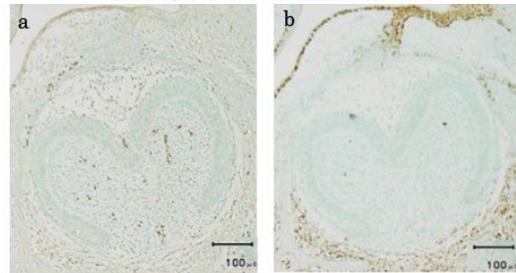


図2: 鐘状期初期(胎生17日)歯胚における局在

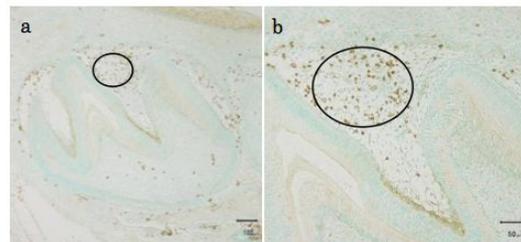


図3: 鐘状期後期(生後1日)歯胚における局在

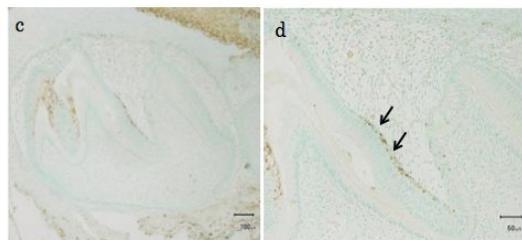


図3: 鐘状期後期(生後1日)歯胚における局在

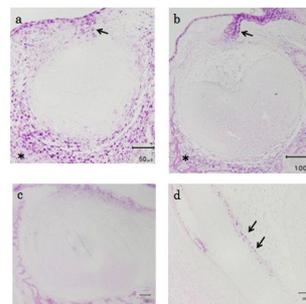


図4: PAS染色

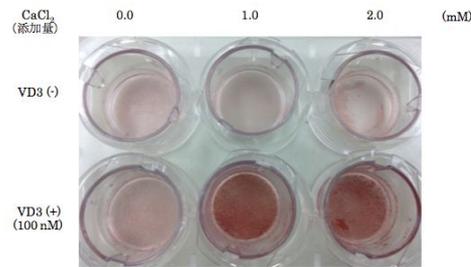


図5. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるアリザリンレッドS染色の変化

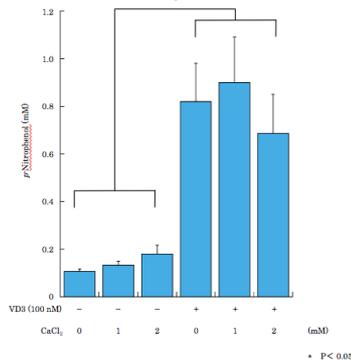


図6. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるALP活性の変化

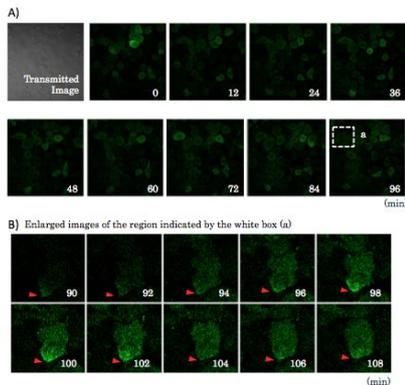


図7. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるCa<sup>2+</sup>応答のライブセルイメージング観察

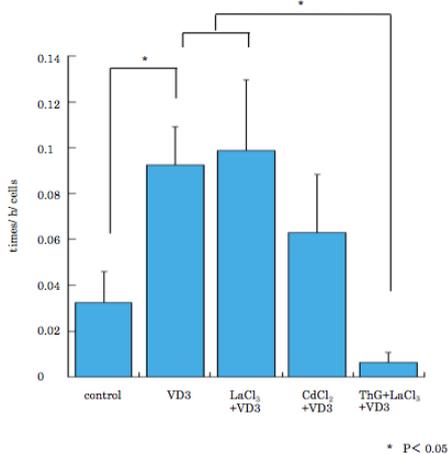


図8. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるCa<sup>2+</sup>応答頻度の変化

## 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 5 件)

1. Murata K, Takahashi A, Morita T, Nezu A, Fukumoto S, Saitoh M, Tanimura A. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on spontaneous calcium responses in rat dental epithelial SF2 cells revealed by long-term imaging. *Biomed Res.* 2016;37(6):329-334.
2. Yoshida K, Sato J, Takai R, Uehara O, Kurashige Y, Nishimura M, Chiba I, Saitoh M, Abiko Y. Differentiation of mouse iPS cells into ameloblast-like cells in cultures using medium conditioned by epithelial cell rests of Malassez and gelatin-coated dishes. *Med Mol Morphol.* 2015 Sep;48(3):138-45.
3. Noro D, Kurashige Y, Shudo K, Takahashi A, Abiko Y, Saitoh M. Effect of epithelial cells derived from periodontal ligament on osteoblast-like cells in a Transwell membrane coculture system. *Arch Oral Biol.* 2015 Jul;60(7):1007-12.
4. 村田佳織, 谷村明彦, 齋藤正人: 歯原性上皮細胞株の分化における活型ビタミンD3の作用, 北海道医療大学歯雑誌, 34: 37-43,
5. 佐々木由希子, 倉重圭史, 齋藤正人, 安彦善裕, 坂倉康則, 歯胚の発育過程におけるエピジェネティクス関連酵素 HDACs と糖代謝関連因子の関与について, 小児歯科学雑誌 52(3):425-432, 2014.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 村田佳織, 倉重圭史, 森田貴雄, 高橋亜友美, 齋藤正人, 谷村明彦. ビタミンDによる分化誘導時の歯原性上皮細胞におけるCa<sup>2+</sup>応答の発生機序. 第57回歯科基礎医学会学術大会.
2. 高橋亜友美, 森田貴雄, 倉重圭史, 村田佳織, 谷村明彦, 齋藤正人. 第57回歯科基礎医学会学術大会.
3. 高橋亜友美, 倉重圭史, 村田佳織, 谷村明彦, 齋藤正人. ヒトリコンピナントアメロジェニンの精製法の確立, 第53回日本小児歯科学会.
4. 村田佳織, 倉重圭史, 林良宣, 高橋亜友美, 谷村明彦, 齋藤正人. ビタミンDによる歯原性上皮細胞の分化とCa<sup>2+</sup>応答の関係. 第52回日本小児歯科学会.
5. 谷村明彦, 村田佳織, 齋藤正人, 森田貴雄, 根津顕弘. 競合的蛍光リガンド結合アッセイ法を活用した新規IP3センサーの開発. 第56回歯科基礎医学会学術大会.
6. 村田佳織, 森田貴雄, 倉重圭史, 高橋亜友美, 齋藤正人, 谷村明彦. ビタミンDによる分化誘導で起こる歯原性上皮細胞の

Ca<sup>2+</sup>の応答

7. Murata y, Tanimura A, Fukumoto S, Kurashige Y, Abiko Y, Saitoh M. Vitamin D-induced calcium signals and differentiation in dental epithelial cell. IA/PER Congress

8.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

齊藤 正人 (SAITOH, Masato)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50337036

##### (2)研究分担者

安彦 善裕 (ABIKO, Yoshihiro)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：90260819

谷村 明彦 (TANIMURA, Akihiko)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：70217149

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )