

平成 2 8 年 5 月 3 1 日現在

機関番号 : 1 1 3 0 1

研究種目 : 研究活動スタート支援

研究期間 : 2014 ~ 2015

課題番号 : 2 6 8 9 3 0 2 2

研究課題名 (和文) 歯原性上皮細胞におけるNGF-p75シグナルによる細胞増殖制御機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of cell proliferation control mechanism in dental epithelial cell by NGF-p75 signaling pathway.

研究代表者

小野 真理子 (Ono, Mariko)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号 : 6 0 7 3 6 0 3 1

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,100,000 円

研究成果の概要 (和文) : これまでの我々の研究から、歯原性上皮細胞においてNGFが低親和性受容体p75を介して細胞増殖を促進することが明らかとなっている。今回完全長p75およびp75細胞内ドメインを欠失させた発現ベクターを作製、それぞれを歯原性上皮細胞に遺伝子導入し、細胞増殖の比較を行った。その結果、完全長p75過剰発現細胞において、有意に細胞増殖が誘導された。これより、細胞内ドメインがNGF-p75シグナルによる増殖促進に必要であることが示された。また、NGFがp75に結合後のシグナル伝達経路について解析した結果、その下流においてERK1/2をリン酸化することにより細胞増殖シグナルを伝達していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : In the present study, we revealed that NGF promoted dental epithelial cells via p75. Next, we transfected the expression constructs for p75-FL and deletion of p75 intracellular domain into SF2 cells, and compared cell proliferation. In p75-FL-transfected cells, NGF-mediated cell proliferation was significantly promoted. This result indicates that p75 intracellular domain is important for promotion of cell proliferation via NGF-p75 signaling. To analyze downstream cellular signaling after NGF binds to p75, we performed Western blotting. It was demonstrated that NGF induced ERK1/2 phosphorylations. Then we tested whether ERK signaling pathway was involved in dental epithelial cell proliferation with MEK inhibitor U0126. Cell proliferation was inhibited by U0126 in dose dependency. These results suggest that NGF induces dental epithelial cell proliferation via p75-ERK1/2 signaling pathway.

研究分野 : 歯の発生学

キーワード : 歯原性上皮細胞 NGF p75

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との相互作用により行われる。上皮-間葉細胞間で展開される複雑な相互作用は、両細胞の分化と増殖を厳密に制御し、エナメル質・象牙質・歯髄組織を有する機能的な歯の形成を可能にしている。

歯の発生過程においては BMPs や FGFs、Wnts といった増殖因子や成長因子が関与していることが明らかにされてきている (Thesleff and Sharpe 1997)。歯の発生メカニズムの解明、さらには臨床に応用できる再生医療に至るまでには、新たな因子の同定や機能の解析が必要であり、その中で我々は神経栄養因子に着目した。

神経軸索の伸長や神経伝達物質の合成、神経細胞の維持生存に重要な分子として同定されてきたが、近年では線維芽細胞や内皮細胞、肺、毛といった非神経組織・細胞において重要な機能をもつことが明らかにされ、その機能が多岐に及ぶことが示唆されてきている。

我々の研究グループでは歯において、NT-4 が歯原性上皮細胞において TrkB 受容体を介してその増殖を抑制、分化を促進し、NT-4 欠損マウスにおいて、エナメル質形成に遅延がみられることを明らかにした (Yoshizaki et al., *J Biol Chem* 2009)。また、歯胚の発生過程において NGF およびその受容体が発現していることが報告されている (Lukko et al., *Dev Dyn* 1997, Iwamoto et al., *J Oral Biosci* 2011)。

これまで NGF は歯髄において、神経突起成長や創傷治癒など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おらず、我々はこの解析を進めて行くこととした。

まず、歯胚発生過程における NGF およびその受容体 (TrkA, p75) の発現について RT-PCR を用いた解析から、NGF および p75 の発現が認められ、TrkA の発現は認められなかったことから、歯胚発生段階における NGF シグナルは、低親和性受容体 p75 を介して細胞内に伝達されると考えられた。

また、免疫組織染色の結果、帽状期の歯胚において、p75 は歯原性上皮細胞の内エナメル上皮に発現が認められた。さらに、歯の分化シグナルセンターとして働くエナメルノットにその発現を認めず、周囲の内エナメル芽細胞に発現していた。これより、p75 シグナルは歯胚形成初期の歯原性上皮細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

そこで、歯原性上皮細胞株 SF2 における p75 の発現を免疫染色にて解析したところ、歯原性上皮細胞の分化マーカーであるアメロプラスチン (Ambl) やアメロジェニン (Amel) が細胞

塊の中心に発現していたのに対し、p75 発現陽性細胞はその周囲に発現が認められた。さらに、NGF による歯原性上皮細胞株 SF2 の細胞増殖について検討したところ、NGF の添加により SF2 細胞の増殖が促進された。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究成果から、NGF は歯原性上皮細胞において、TrkA ではなく p75 を介して細胞増殖の促進を行なうことが明らかとなった。

そこで本研究期間内では、NGF-p75 シグナルによる歯原性上皮細胞の増殖メカニズムの詳細な解明を目的とする。

p75 は TNF レセプターファミリーに属し、TRAF2 を介してその下流で MAPK カスケードや NF- κ B を活性化する。SF2 細胞を NGF で刺激後、ERK1/2, p38, NF- κ B のリン酸化をウエスタンブロット法にて検討を行っていく。神経栄養因子ファミリーのうち NT-4 が TrkB に結合後、ERK1/2 を介して歯原性上皮細胞の分化を促進することが明らかになっているが、こちらのシグナルとの違いも含めてシグナル伝達の過程に介在する分子および細胞動態に与える影響について解析を進めていく。

また、p75 受容体はメタロプロテアーゼにより細胞外ドメインと C 末端断片に切断され、さらに γ -セクレターゼにより細胞内ドメインが細胞基質に遊離される。最近では様々な組織・細胞においてこの p75 の切断、遊離が細胞の生存や成長、死に関与していることや、また NGF がこのトリガーとなっているという報告がなされている。歯において、同様の現象がみられるかはまだ明らかにされていない。先に挙げた過剰発現細胞を用いて増殖実験やウエスタンブロット法による検討を行っていく。

現在再生医療に対する期待は非常に高まっており、歯科の領域における歯の再生実用化への関心も同様である。他の組織再生医療にも共通する、再生医療実現化に向けた問題点の一つに、細胞供給源の問題があげられる。

歯の再生には、エナメル・象牙質・歯髄・歯周組織を形成あるいは校正する細胞への分化能を有する幹細胞が必要となる。間葉細胞由来である象牙芽細胞、歯髄細胞、歯周組織を構成する細胞は、乳歯や智歯の歯髄細胞から誘導可能であるが、エナメル形成に必要な歯原性上皮細胞は、完成した歯には残存しておらず、十分な量のエナメル芽細胞を成体から得ることは困難である。このため歯原性上皮細胞の調達には、発生智歯歯胚の上皮細胞を効率よく増殖させる、上皮細胞の大量調整法の開発が求められる。これまでの我々の研究

から、p75 は未分化な歯原性上皮細胞に発現し、NGF の刺激により細胞の増殖が促進されることが明らかとなっているので、NGF-p75 を利用することにより、より未分化な状態の歯原性上皮細胞を大量に効率的に採取する手法の開発に貢献できるものと考えている。

また、p75 受容体はこれまで細胞生存から増殖、細胞死まで、実に多様な生物活性の制御に関与していることがわかっているが、歯や歯の発生における機能、詳細なシグナル経路については不明であり、本研究により明らかとなれば、歯の発生メカニズムの解明に向けた新たな知見となるとともに、p75 受容体の新たな細胞活性、シグナル経路を見出すことともなり、細胞生物学においても新たな概念となりうると考えている。

3. 研究の方法

(1) NGF 刺激による p75 下流に存在する分子のリン酸化解析

NGF 刺激により、神経細胞において TrkA および p75 を介したシグナル伝達が行われる。両方の受容体が発現している状況では、高親和型受容体の TrkA を介したシグナルが優位に働くが、TrkA の発現レベルにより、TrkA と p75 のヘテロ二量体として機能したり、または p75 単独でシグナル伝達を行うことも予想される。

歯原性上皮細胞においては、これまでの結果からも p75 単独シグナルによりその細胞増殖が制御されて、いると予想されることから、TNF ファミリー受容体に共通した分子群、TRAF ファミリー、Src ファミリーや MAPK ファミリーの、NGF 刺激後のリン酸化についてウエスタンブロット法にて検討を行う。

さらに、未知の分子シグナルを検討するために、リン酸化蛋白アレーを用いた包括的な蛋白スクリーニングを行う。

(2) p75 下流分子の阻害剤を用いて歯原性上皮細胞増殖への影響を検討

上記の実験により、NGF 刺激によりリン酸化された分子に対して、その阻害剤を用いて NGF 誘導性の細胞増殖について、セルカウンティングキットあるいは BrdU の取り込み試験により検討し、細胞増殖促進に関わる分子シグナルの同定を行う。

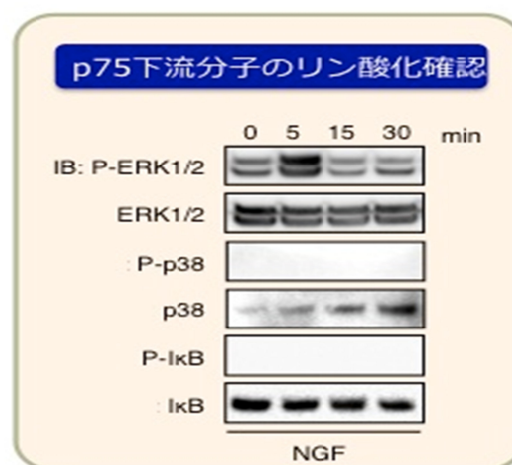
(3) 変異 p75 受容体を用いた NGF シグナル伝達の動態の解析

p75 受容体は、最近の研究によりメタロプロテアーゼにより細胞外ドメインと C 末端断

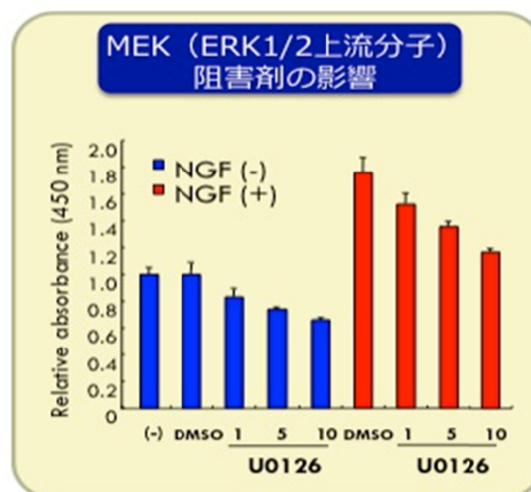
片に切断され、さらに γ -セクレターゼにより細胞内ドメインが細胞基質に遊離されることが明らかになってきた。このような切断は、毛の発生で重要な Notch シグナルでも観察されることから、この p75 の細胞内切断は、歯の発生において重要な役割を演じている可能性が示唆される。そこで、p75 発現ベクターにおいて、完全長、細胞外領域のみの発現ベクターを作製し、各領域の NGF 誘導性細胞増殖に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) SF2 細胞を NGF で刺激後、ERK1/2, p38, NF- κ B のリン酸化をウエスタンブロット法にて検討を行った。その結果、p38 や Ik-B と比較して、ERK1/2 のリン酸化が強く認められた。(下図)



さらに、ERK1/2 の上流分子 MEK の阻害剤 U0126 による処理を行ったところ、U0126 の濃度依存的に NGF による SF2 細胞の増殖が抑制された。(下図)

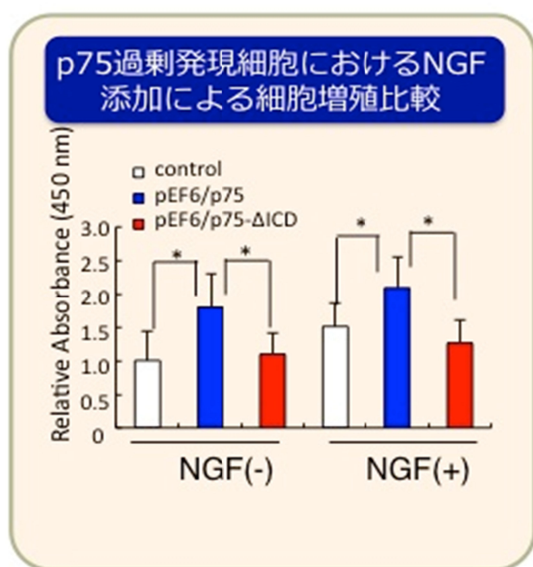


これらより、NGF は p75 に結合後、その下流で ERK1/2 をリン酸化することにより歯原性上皮細胞の増殖シグナルを伝達していること

が示唆された。

これまで、同じ神経栄養因子ファミリー分子である NT-4 は、TrkB-ERK1/2 シグナルを介し、SF2 細胞の増殖を抑制し、エナメル芽細胞への分化を促進することが明らかとなっている。今回、NGF と NT-4 刺激でのリン酸化のレベルおよびその時期についても比較したところ、NGF が刺激 5 分後にリン酸化のピークを迎え、その後 60 分に向けて徐々にリン酸化が減少するのに対し、NT-4 で刺激した場合は 60 分の間に 15 分、60 分の二峰性の会陰参加のピークが認められた。このことから、NGF と NT-4 の ERK1/2 の活性化において、異なったシグナル伝達経路が存在することが示唆された。

(2) 完全長 p75(pEF6/p75)および p75 細胞内ドメインを欠失させた発現ベクター(pEF6/p75-ΔICD)を作製、それぞれ歯原性上皮細胞株(SF2 細胞)に遺伝子導入した。細胞増殖の比較を行ったところ、完全長 p75 過剰発現細胞において、有意に細胞増殖が誘導された。一方、p75-ΔICD 過剰発現細胞では増殖促進は認められなかった。(下図)



次に、完全長 p75、p75-ΔICD 過剰発現細胞を用いて、NGF 刺激による ERK1/2 のリン酸化を解析したところ、完全長 p75 過剰発現細胞において、ERK1/2 は著しくリン酸化が亢進するのに対し、p75-ΔICD 過剰発現細胞においては ERK1/2 のリン酸化誘導は観察されなかった。これより、細胞内ドメインが NGF-p75 シグナルによる増殖促進に必要であることが示された。

NGF は、他の神経栄養因子の BDNF、NT-3、NT-4 と約 50% の相同性を持っているが、特にアミノ酸の類似性としては NGF と NT-3 が約 74%、BDNF と NT-4 が約 68% と高い (Iwamoto et al., 2011)。したがって、BDNF と NT-4 は TrkB 受容体に対し競合的に結合することが予想され

る。実際、NT-4 は歯原性上皮細胞株 SF2 の増殖を抑制する (Yoshizaki et al., 2008) が、BDNF も同様に SF2 の増殖を抑制した (data not shown)。この結果から歯の発生過程において、NT-4 と BDNF は機能面においても一部類似している可能性が考えられる。また、NGF と類似性が高い NT-3 が、NGF と同様に歯原性上皮細胞の増殖を促進する可能性が考えられるが、NGF は TrkA と、NT-3 は TrkC とそれぞれの特異的高親和性受容体が異なること、また p75 のみを発現するニューロン細胞において、NGF、BDNF、NT-3 が平衡状態の時に、いずれも同じように低親和性に結合するが、解離速度定数が顕著に異なっている報告があることから、p75 は結合するリガンドによって、機能が異なる可能性も考えられる。それ故、NGF と NT-3 は異なる機能を有している可能性も考えられる。今回神経栄養因子のうち NGF が歯原性上皮細胞で増殖促進作用をもつことが明らかになったが、NT-3 についても同様に解析を進めて行く予定である。

これまで主として、p75 は NGF の TrkA に対する親和性を高め、TrkA のシグナルを増強し、増殖や神経ネットワークの構築を促進、p75 欠損マウスではシナプス形成が抑制されることから、p75 が Trk 受容体に対して補助的機能を行っていると考えられた。一方で、p75 自体も TNF ファミリー受容体として多量体形成を行い、シグナル伝達を行う。Trk 受容体はチロシンキナーゼ受容体であり、活性化して細胞内情報伝達を行うが、細胞死に関わるデスドメインを有している。しかしながら、その機能は多彩であり、細胞死に関わる一方で、細胞生存に機能し、神経軸索の伸展を促す一方で、ある細胞種においては逆に阻害に関与するなど、そのシグナルが条件によっては正反対の機能を発揮することがわかってきた。アポトーシスに関わる経路としては、オリゴデンドロサイトにおいては、NGF 刺激によって JNK(SAPK)経路が活性化されアポトーシスが誘導されたことから、NGF-p75-JNK 経路はアポトーシスに関わっているとされた (Yeiser et al., 2004)。さらに、NGF-p75 シグナルによって、スフィンゴミエリナーゼ活性が誘導され、セラミドの蓄積が起こることによってアポトーシスが誘発されることも報告された。また、p75 のデスドメインに存在する 2 つのチロシン残基 (Y337 と Y336) が Ras/EAK 経路を活性化し、Ras が PI3-K とそれに続く Akt 経路を活性化し、細胞の生存を促すことが報告された (Roux et al., 2002, Blöchl et al., 2004)。さらに、p75 と会合する TRAF6 を介して、NF-κB が活性化し、抗アポトーシス作用を示すことも報告されている (Carter et al., 1996, Ye et al., 1999)。このように p75 の下流シグナルは非常に多岐に亘ることが知られているが、本研究より歯原性上皮細胞株 SF2 において、NGF が誘導する細胞内シグナル伝達経路を解析したところ、ERK1/2 が強くリン酸化されることがわかった。

さらに、ERK の上流分子である MEK の阻害剤で細胞を処理した所、濃度依存的に NGF で誘導される細胞増殖が阻害されたことから、歯原性上皮細胞において NGF-p75-ERK1/2 シグナル伝達経路が細胞増殖に重要な役割を担っていることが示唆された。

これまで著者らの研究グループでは NT-4 が TrkB を介し、歯原性上皮細胞株 SF2 の増殖を抑制し、分化を促進することを報告してきた(Yosizaki et al., 2008)が、その際にも TrkB を介した ERK1/2 が重要なシグナル伝達経路であった。そこで、NT-4 と ERK1/2 のリン酸化を比較したところ、NGF と NT-4 において、リン酸化の時間的なパターンが異なっていた。さらに、NGF は非受容体型チロシンキナーゼを有する Src のリン酸化を誘導することも明らかとなった。このことから NGF-p75-ERK1/2 経路と NT-4-TrkB-ERK1/2 経路を比較した時に、NGF-p75 の場合、Src を介している可能性も示唆された。

また、p75 受容体は軸索突起伸展阻害因子である MAG や OMgp の受容体である Nogo 受容体と共受容体を形成する (Yamashita T and Toyama M, 2003)。Nogo 受容体は GPI アンカー型蛋白質であることから、p75 シグナルが軸索阻害に関わっていることを示している。この機構においては、p75 は Rho の活性化を促進あるいは抑制する両方向を制御しており、活性型(Rho-GTP)は突起伸展抑制に動き、不活性型(Rho-GDP)は突起伸展に働いている。このとき p75 によって Rho と Rho の活性化阻害蛋白質である Rho-GDI が解離することで、Rho が活性化することが明らかとなっている。TAT-Pep5 は、Rho-GDI と Rho-GDP の解離を妨げることで p75NTR のシグナル伝達を阻害すると考えられているが、TAT-Pep5 による歯原性上皮細胞の増殖が抑制されたことより、Rho シグナルも歯原性上皮細胞において重要なシグナル伝達経路であることが示唆された。Rho は、アクチン細胞骨格系の再編成を介し、細胞運動や細胞接着等細胞の基本機能の調整を担っている。歯原性上皮細胞において、中間層細胞あるいは星状網細胞の機能についてはほとんど明らかにされていないが、歯の発生でダイナミックに変化する歯冠形態の鍵を握っている可能性があり、中間層細胞あるいは星状網細胞に発現する p75 からのシグナルが歯胚の基本形態やエナメル芽細胞の分化の要になっている可能性が考えられる。実際、p75 欠損マウスは発生段階における異常はみられないが、加齢と共に著しく咬耗が進む(Sarram et al., 1997)。このことはエナメル質自体が弱く、エナメル芽細胞の分化に異常をきたし、エナメル質形成不全用の表現系を示している可能性が推測される。p75 は分化したエナメル芽細胞には発現していないが、中間層細胞、星状網細胞に発現しており、間接的にエナメル芽細胞の分化、成熟において重要な役割を担っていると推察される。本研究によって、NGF は p75 を介して歯原性上皮細胞の増殖を

促進する因子であることが明らかとなった。歯の再生を考えた場合、細胞の供給源をどうするか、さらには歯を作るまでの時間をどのようにコントロールするかが課題であるが、NGF による歯原性上皮細胞増殖促進機構の発見は、未分化歯原性上皮細胞の NGF を用いた効率的な大量精製法開発への応用も期待でき、歯科再生医療の発展に貢献できる知見と言える。

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)

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野 真理子 (ONO, Mariko)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：60736031