

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11448

研究課題名(和文) エナメル質形成における分子シャペロンGRP78の関与

研究課題名(英文) Involvement of glucose regulated protein 78 in the enamel formation of mouse tooth development

研究代表者

永田 健吾 (Nagata, Kengo)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90189134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：GRP78は、分子シャペロンとして、小胞体ストレス時に小胞体の恒常性維持に作用しているが、歯原性上皮組織のエナメル質形成に関するGRP78の機能については不明な点が多い。本研究は、マウス臼歯歯胚および切歯歯胚を対象に、歯原性上皮組織でのGRP78の役割を明らかにすることを目的とした。マウス臼歯および切歯の分泌期のエナメル芽細胞にGRP78の強発現が見られることから、GRP78は上皮組織の石灰化においても重要な役割を担っ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

発生における器官の形態形成の多くは上皮と間葉の相互作用で進んでいく。歯の形態形成は、細胞の分化段階が細かく観察でき、器官形成のモデルとして優れている。これまでに上皮組織や間葉組織に作用する因子が数多く調べられているが、エナメル質形成に関してのGRPの関与は報告されていない。今回、歯の発生機構を明らかにすることで、生物学的な意義だけでなく、再生医療を見据えた臨床応用にむけての意義が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glucose regulated protein 78 (GRP78) is known to maintain ER environment and promote cell survival against the ER stress. However, it is not well understood the role of GRP78 during enamel formation. To clarify the role of GRP78 on the mineralization of odontogenic epithelium, we examined the immunoeexpression of GRP78 in the mouse molar and incisor tooth germs during tooth development. Enamel organ was negative for GRP78 on embryonic day 15 and day 17. Ameloblasts of molar tooth germ on postnatal days 1 and 5 were intensely positive for GRP78. Hertwig's epithelial root sheath was negative for GRP78. Odontogenic epithelium of molar tooth on postnatal day 15 was negative for GRP78. On the other hand, ameloblasts and preameloblasts of the incisor tooth on postnatal day 15 were also intensely positive for GRP78. In conclusion, an involvement of GRP78 in enamel formation is suggested, because of the intense expression of GRP78 is observed in the secretory ameloblasts.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯の発生 エナメル芽細胞 エナメル質分泌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Glucose regulated protein 78 (GRP78)は小胞体中に恒常的に存在する分子シャペロンの一つで、ヒートショックプロテイン 70 ファミリーに属する分子量 78kDa のタンパクである。小胞体は分泌タンパクが成熟する場として働いているが、何らかのストレスが小胞体に加わると、恒常性が失われて小胞体中に不完全な立体構造をとるタンパクが増加する。それらの不完全なタンパクは GRP78 により凝集を阻止されたり、分解除去されたりすることで、小胞体の恒常性が維持されている。小胞体に加わるストレスとしては、グルコースの欠如、カルシウムイオンの欠如、薬剤などがあげられるが、それらのストレスが過剰に加わると、小胞体の恒常性が維持できなくなり、小胞体から核へ至るシグナル経路が活性化されて、アポトーシスが誘導される。GRP78 は、小胞体だけでなく核や細胞膜にも存在が知られているが、核や細胞膜での機能に関しては不明な点が多い。Ravindran ら (2012) が、間葉細胞の細胞膜に存在する GRP78 が dentin matrix protein 1 と細胞膜上で会合し一緒に分泌されることで、間葉組織の石灰化に関与することを示唆しているが、上皮組織の石灰化に GRP78 が関与するかについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

今回の研究は、歯胚組織での GRP78 の発現局在を検索し、歯原性上皮細胞の石灰化やエナメル質形成における GRP78 の機能的役割を明らかにすることを目的としている。

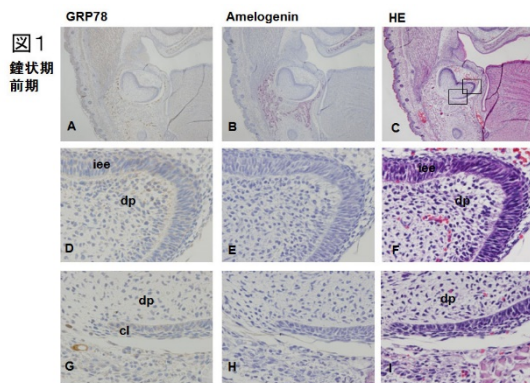
3. 研究の方法

マウス歯胚を対象にして、歯の形態形成期の胎齢 15 日、17 日、生後 1 日齢、5 日齢、15 日齢のマウス下顎第一臼歯、および生後 15 日齢の下顎切歯を試料とした。試料は 4%パラホルムアルデヒド固定液で浸漬固定し、通法によりパラフィン切片を作製した。切片作製後、抗 GRP78 抗体、抗アメロゲン抗体を用いて酵素抗体法にて免疫染色を行い、ジアミノベンチジンにより可視化した。一部の標本については、蛍光抗体法を用いた。

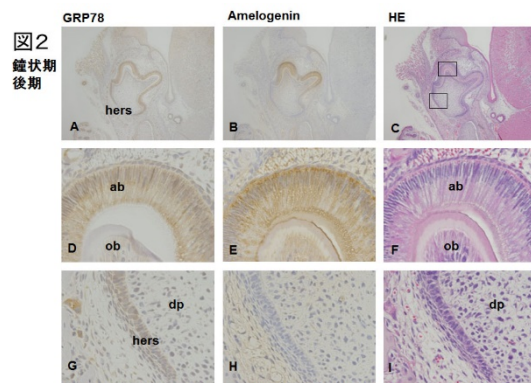
4. 研究成果

マウス大白歯の歯の形成過程で胎齢 15 日から生後 15 日までの歯胚を継続的に調べた。胎齢 15 日の帽状期の歯胚では、上皮性歯胚組織であるエナメル器に、アメロゲンおよび GRP78 の発現はいずれも見られなかった。

胎齢 17 日の鐘状期前期の歯胚では、エナメル器の分化がやや進み、咬頭頂相当部からサービカルループにかけての内エナメル上皮にアメロゲンおよび GRP78 の発現は見られなかった (図 1)。



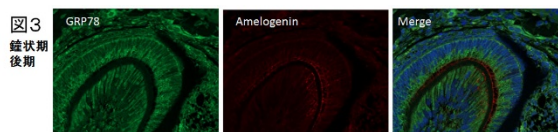
Expression of GRP78 and amelogenin in the molar tooth germ on E17.  
: iee; inner enamel epithelium, dp; dental papilla, cl; cervical loop.



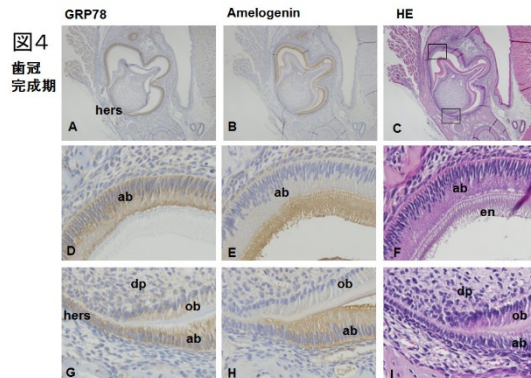
Expression of GRP78 and amelogenin in the molar tooth germ on P1.  
: ab; ameloblast, ob; odontoblast, dp; dental pulp  
hers; Hertwig's epithelial root sheath

生後 1 日齢の鐘状期後期の歯胚では、咬頭頂相当部位から歯頸部にかけてアメロゲンに陽性のエナメル芽細胞が見られ、咬頭頂相当部から歯頸部にかけて歯原性上皮組織に GRP78 の発現が見られた。ヘルトビッチの上皮鞘には発現は見られなかった (図 2)。

蛍光抗体法で、生後 1 日齢の鐘状期後期の歯胚においてアメロゲンと GRP78 の二重染色を試みると、咬頭頂相当部のエナメル芽細胞の細胞質において、それらの局在が一致しているところが見られた (図 3)。



Double expression of GRP78 and amelogenin in the molar tooth germ on P1.

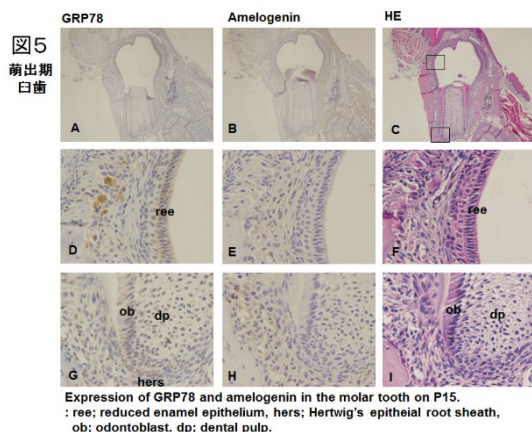


Expression of GRP78 and amelogenin in the molar tooth germ on P5.  
: ab; ameloblast, ob; odontoblast, dp; dental pulp, en; enamel,  
hers; Hertwig's epithelial root sheath.

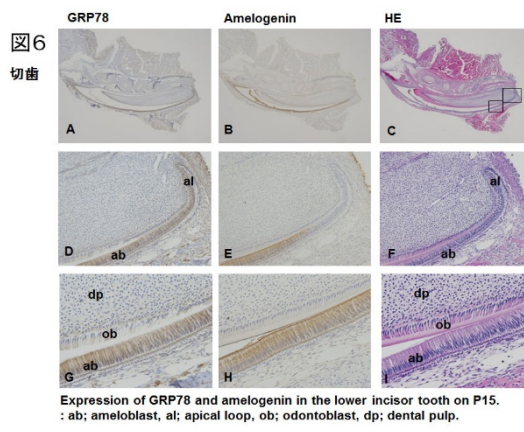
生後 5 日齢、歯冠完成期歯胚の歯原性上皮組織では、GRP78 の発現はアメロゲンにほぼ一致して見られた。咬頭頂相当部位のエナメル芽細胞ではアメロゲンの発現が減少しているが、歯頸部付近のエナメル芽細胞には、アメロゲンの発現が見られた。ヘルトビッチの上皮鞘にはアメロゲンおよび GRP78 の発現は見られなかった (図 4)。

生後 15 日齢、萌出期の歯胚では、アメロゲンおよび GRP78 の発現は歯冠周囲を囲む退縮エナメル上皮、および根尖部のヘルトビッチの上皮鞘には見られなかった。歯周組織においては、破骨細胞に GRP78 の発現が見られた (図 5)。

一方、生後 15 日齢の切歯では、分泌期のエナメル芽細胞および前エナメル芽細胞に GRP78 の強発現を認めたが、未分化な歯原性上皮であるアピカルループには GRP78 は発現していなかった (図 6)。



Expression of GRP78 and amelogenin in the molar tooth on P15.  
: ree; reduced enamel epithelium, hers; Hertwig's epithelial root sheath, ob; odontoblast, dp; dental pulp.



Expression of GRP78 and amelogenin in the lower incisor tooth on P15.  
: ab; ameloblast, al; apical loop, ob; odontoblast, dp; dental pulp.

以上の結果、マウス大白歯および切歯における分泌期のエナメル芽細胞に GRP78 の強発現が見られることから、GRP78 は上皮組織の石灰化においても重要な役割を担っていることが示唆された。

また、歯の発生過程を模倣する歯牙腫に着目した。これまでに、家族性大腸腺腫症における APC 遺伝子変異や遺伝子改変マウスにおける歯原性上皮特異的な Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化により、歯牙腫が発生することが報告されている。しかし、歯牙腫における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化および歯原性上皮におけるその機能については明らかにされていない。歯牙腫における  $\beta$ -catenin の発現と Wnt シグナルが歯原性上皮細胞および歯胚上皮発生過程に与える影響について検討することを目的とした。

ヒト歯牙腫生検標本に対して、免疫組織学的検索を行い、 $\beta$ -catenin が歯原性上皮細胞の核および細胞質に高頻度に発現しており、Wnt シグナルの活性化が示唆された。また、正常歯原性上皮細胞において、Wnt シグナルの活性化により、その増殖能が抑制された。そこで、マイクロアレイ法を用いて、歯原性上皮細胞における Wnt の活性化により発現が抑制される因子として軸索伸張制御因子(Sema3A)を同定し、Sema3A の発現が歯原性上皮細胞の増殖に必要であることを見出した。一方、歯胚器官培養法における Wnt シグナルの活性化による歯胚上皮細胞の増殖抑制は Sema3A 刺激により回復された。

歯原性上皮において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル依存的な Sema3A の発現を介した増殖の制御が歯牙腫の発生に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujii S, Nagata K, Matsumoto S, Kohashi, K, Kikuchi A, Oda Y, Kiyoshima T, Wada N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Wnt/ -catenin signaling, which is activated in odontomas, reduces Sema3A expression to regulate odontogenic epithelial cell proliferation and tooth germ development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4257-4271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39686-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井 慎介、永田 健吾、清島 保、和田 尚久
2. 発表標題 歯牙腫におけるWnt/ -cateninシグナルの活性化は軸索伸張制御因子(Sema3A)を介して増殖を制御する
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡崎 裕紀、稲葉 日和吏、永田 健吾、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 唾液腺腫瘍における カテニン発現に関する免疫組織化学的研究
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	清島 保  (Kiyoshima Tamotsu)  (20264054)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 裕子 (Wada Hiroko)  (70380706)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	
研究分担者	藤井 慎介 (Fujii Shinsuke)  (60452786)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	