

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11475

研究課題名(和文)細胞外環境感知センサーを介した象牙芽細胞の規則的配列機構の解明

研究課題名(英文)The investigation of the mechanism of regular arrangement of odontoblasts via extracellular environment sensing sensors

研究代表者

高江洲 かずみ(河田かずみ)(Takaesu, Kazumi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10457228

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文):我々は、象牙芽細胞分化培地に添加するデキサメタゾン(DEX)による象牙芽前駆細胞であるKN3細胞の増殖抑制を、一次繊毛の形成や細胞周期の制御に機能するIntraflagellar transport(Ift)88のノックダウンが解除する機構を探索した。その結果、一次繊毛の制御するシグナル経路の関与は認められなかったが、古典的Wntシグナル関連遺伝子であるCcn4、5の関与が疑われた。このため、Ccn4、5を強制発現させたKN3細胞を作製し、その影響を検討したが、DEXによる細胞増殖抑制をIft88ノックダウンが解除する機構には、Ccn4、5は関与していないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ift88が形成の一端を担う一次繊毛を介したシグナル経路の活性は、合成コルチコイドの添加により変動する(Wang Y., et al., Chem Biol., 2012)。しかし、合成コルチコイドとIft88の関連を検討した報告はまだ数少ない。そのようななかで、我々は、DEX刺激に対して、Ift88が生理的機能を果たすというデータを得ることが出来た。さらに研究を進め、より理想的な歯牙組織再生法を開拓し、咀嚼機能の維持を通して健康寿命の延伸に貢献する計画である。また、臨床で頻用されるDEXとIft88との関連をさらに解明できれば、歯牙組織だけでなく、様々な組織の再生へ応用が出来ると考えている。

研究成果の概要(英文):We studied the mechanism that the inhibition of proliferation by dexamethasone (DEX), which is added to odontoblast differentiation culture medium, is canceled for Intraflagellar transport (Ift) 88 knocked-down pre-odontoblastic KN3 cells (Ift88 is known to function in primary cilia formation and cell cycle control.). As a result, while involvement of signal pathways via the primary cilia was not recognized, involvement of Ccn4 and Ccn5, which are canonical Wnt signal pathway related genes, was suspected. We then established and analyzed KN3 cells where Ccn4 and Ccn5 were overexpressed. However, it was revealed that Ccn4 and Ccn5 are not involved in the mechanism that cancels the inhibition of odontoblast proliferation by DEX in the Ift88 knocked-down KN3 cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：象牙芽前駆細胞 IFT88 細胞増殖 デキサメタゾン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の平均寿命は年々伸びている。しかし、そのうち多くの高齢者は、運動器障害による移動機能の低下(ロコモティブ・シンドローム)、生活習慣病、認知症などに長期間苦しめられ、健康寿命は伸びていない。これらの疾患は一度発症すると根治困難であるため普段から予防が重要である。それには咀嚼機能の維持が鍵となるため、組織再生による歯牙の再建治療法の開拓がいま歯科領域には望まれている。個々の歯牙の再建には象牙質の再生がカギとなるが、自然状態での象牙質再生能力は不十分である。

2. 研究の目的

この問題を解決するためには、象牙芽細胞の“一次繊毛”の機能制御が不可欠であると申請者は考えている。一次繊毛とは細胞外環境感知センサーとして機能する細胞器官であり、細胞極性を制御する。よって本研究では、象牙芽細胞における一次繊毛を介した極性制御機構を解明し、これを制御することで、整然とした細管構造を有する「正常象牙質」再生の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) IFT88 による象牙芽前駆細胞の増殖制御機構の解明

象牙質再生には、今後、明らかにする予定の象牙芽細胞の規則的な配列、そして現在までに明らかにした象牙芽細胞分化より先立って、象牙芽前駆細胞の増殖という段階も重要である。

また、IFT 88 は、細胞分裂期には細胞周期の制御にも機能しているという報告がある (Robert A. et al., JCS., 2007)。

このため、一次繊毛形成に機能する intraflagellar transport (IFT) 88 の細胞周期制御機構を介して、細胞接着・増殖が制御されている可能性を探索した。

レンチウイルスベクターシステムを用いて、*Ift 88* をノックダウンした象牙芽前駆細胞 (KN-3 細胞) の樹立を行った。

Ift 88 をノックダウンした KN-3 細胞 (sh-*Ift88* KN3 細胞) を用いて、細胞接着能力や細胞増殖速度の評価を WST-8 assay, Array Scan System により細胞播種後 48 時間で行った。

(2) β -グリセロリン酸やステロイド系抗炎症薬が及ぼす象牙芽前駆細胞の接着・増殖への影響の検討

次に象牙質再生をより効率的に行う方法を我々は探索した。象牙芽前駆細胞培養時にリン脂質の構成成分である β -グリセロリン酸 (β -GP) とステロイド系抗炎症薬であるデキサメタゾン (DEX) を添加し、分化の誘導を行うことが多い。しかし、両物質の細胞接着や増殖における詳細な役割は明らかとなっていない。そこで、KN-3 細胞の接着や増殖における β -GP と DEX の役割の解析を行った。

KN3 細胞に、10 mM β -GP と 10 nM DEX をそれぞれ添加し、添加後 2 時間で細胞接着能力の評価を WST-8 assay により行った。

KN3 細胞に、10 mM β -GP と 10 nM DEX をそれぞれ添加し、添加後 24 時間と 48 時間で細胞増殖速度の評価を WST-8 assay, Array Scan System により行った。

(3) ステロイド系抗炎症薬による象牙芽前駆細胞の増殖における IFT88 の役割の解析

sh-*Ift88* KN3 細胞に、10 nM DEX を添加し、添加後 48 時間で細胞増殖速度の評価を WST-8 assay, Array Scan System により行った。

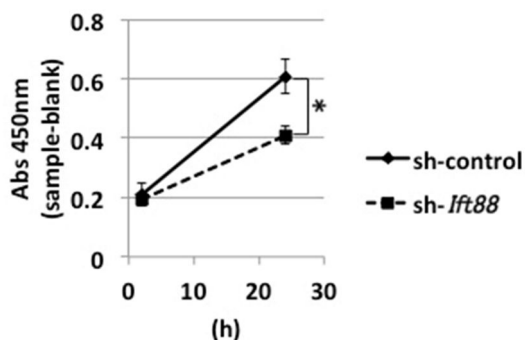
4. 研究成果

(1) IFT88 による象牙芽前駆細胞の増殖制御機構の解明

まず、*Ift 88* をノックダウンした KN-3 細胞の樹立を行った。

その細胞を用いて、KN-3 細胞の接着や増殖における IFT88 の役割の解析を行った。その結果、sh-*Ift88* KN3 細胞では、細胞接着能力や細胞増殖速度が減少することを明らかにした (図 1)。

図 1. 【細胞増殖】



(2) β -グリセロリン酸やステロイド系抗炎症薬が及ぼす象牙芽前駆細胞の接着・増殖への影響の検討

次に、KN-3 細胞の接着や増殖における β -GP と DEX の役割の解析を行った。WST-8 assay により細胞接着への影響の検討を行った結果、 β -GP では変化が認められなかったが、DEX はそれを促進することが明らかとなった。また、WST-8 assay と Array Scan System を用いた細胞数のカウントにより細胞増殖への影響の検討をそれぞれの試薬添加後、24 時間と 48 時間でそれぞれ行った。その結果、試薬添加後、24、48 時間とも、 β -GP では変化が認められなかったが、DEX は 24 時間ではそれを促進し、48 時間では反対に抑制することが明らかとなった。

(3) ステロイド系抗炎症薬による象牙芽前駆細胞の増殖における IFT88 の役割の解析

さらに、sh-*Ift88* KN3 細胞を用いて、DEX 添加から 48 時間後の細胞増殖への影響を評価した。その結果、sh-*Ift88* KN3 細胞では DEX を添加しても細胞増殖抑制は認められなかった。

次に、DEX による細胞増殖抑制を *Ift88* ノックダウンが解除する機構を探索したところ、ヘッジホッグシグナル経路や古典的 Wnt シグナル経路の関与は認められなかったが、古典的 Wnt シグナル関連遺伝子である *Ccn4*, *Ccn5* が何らかの関与をしていることが示唆された。

このため、CCN4, CCN5 を強制発現させた KN3 細胞を作製し、その影響を検討した。しかしながら、DEX による細胞増殖抑制を *Ift88* ノックダウンが解除する機構には、CCN4, CCN5 は関与していないことが明らかになった。

日本では、人口の 4 人に 1 人が 65 歳以上となっている。しかし、そのうち多くの高齢者は、運動器障害による移動機能の低下(ロコモティブ・シンドローム)、生活習慣病、認知症などに長期間苦しめられている。これらの疾患は一度発症すると根治困難であり、健康寿命を短縮してしまうため普段から予防に取り組む必要がある。そして、それを根底から支えるのが咀嚼機能である。しかし残念なことに、現状では、多くの高齢者は、残存歯数の減少により咀嚼能力の低下を感じている。この歯牙喪失原因の一つには齲蝕が挙げられる。現在の齲蝕治療では十分な歯質再生は望めないうえ、齲蝕の再発などにより再治療が避けられない。そして、最終的には歯牙喪失という悪循環をたどることが多いのである。

歯牙の構成要素の一つである、象牙質を造り上げる象牙芽細胞には「一次繊毛」が存在する (Magloire H, et al., Cell Biol. Int., 2004)。一次繊毛は象牙芽細胞以外にも体を構成する殆どの細胞に存在している。その機能は多様で、発生期には、動物の身体の左右軸を決定している (Nonaka S, et al., Cell, 1998)。また、細胞外環境感知センサーとして、Hedgehog (Hh) シグナル (Chiang C, Nature, 1996) や WNT シグナル (Germino GG, Nat. Genet., 2005) を伝え、細胞極性の調節も行っている。しかし、象牙芽細胞上の一次繊毛の機能に関しては殆ど研究が進んでいない。そのような状況で、本研究で「DEX による象牙芽細胞増殖抑制は IFT88 により制御されている」という事実を掴むことが出来た。

現在は、DEX による細胞増殖抑制と、*Ccn4*, *Ccn5* の発現レベルの減少を *Ift88* ノックダウンが解除する機構について探索を進めている。

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 0件）

1. 著者名 Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Aoyama E, Moritani NH, Oka M, Kawaki H, Takigawa M.	4. 巻 118(11)
2. 論文標題 A tumor suppressor gene product, platelet-derived growth factor receptor-like protein controls controls chondrocyte proliferation and differentiation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 4033-4044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1002/jcb.26059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河田 かずみ, 久保田 聡, 滝川 正春
2. 発表標題 癌抑制遺伝子PDGFR α はCCN2、CCN3のデコイ受容体として軟骨細胞増殖と分化を制御する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山 依理子, 河田 かずみ, 青山 絵里子, 成田 啓之, 竹田 扇, 西原 達次, 北村 知昭, 西藤 法子, 滝川 正春, 吉山 昌宏, 久保田 聡
2. 発表標題 象牙芽細胞に対するグルココルチコイドの作用におけるIFT88の役割
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 依理子, 河田 かずみ, 青山 絵理子, 成田 啓之, 竹田 扇, 西原 達次, 北村 知昭, 西藤 法子, 滝川 正春, 吉山 昌宏, 久保田 聡
2. 発表標題 DEX刺激によるIFT88を介した細胞増殖抑制とCcn4, 5発現抑制.
3. 学会等名 第38回 岡山歯学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河田かずみ、久保田聡、服部高子、青山絵理子、滝川正春
2. 発表標題 骨格形成における低密度リポタンパク受容体関連タンパク1(LRP1)の役割
3. 学会等名 第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 河田かずみ、久保田聡、江口傑徳、青山絵理子、森谷徳文、岡森彦、川木晴美、滝川正春
2. 発表標題 CCN2による軟骨細胞増殖・分化促進に対する癌抑制遺伝子PDGFR-like (PDGFRL)の効果
3. 学会等名 第8回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 河田かずみ、久保田聡、服部高子、青山絵理子、滝川正春
2. 発表標題 骨形成における低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1 (LRP1)の役割
3. 学会等名 第30回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 Eguchi T, Ono K, Kazumi Kawata K, Okamoto K, Calderwood SK (ed. Alexzander A A Asea, Punit Kaur)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature Switzerland AG,	5. 総ページ数 15
3. 書名 Regulatory Roles Of HSP90-rich Extracellular Vesicles. in Heat Shock Protein 90 in Human Diseases and Disorders.	

1. 著者名 河田かずみ	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 骨・軟骨組織における一次繊毛 in 腎と透析	

1. 著者名 河田 かずみ	4. 発行年 2018年
2. 出版社 洋土社	5. 総ページ数 141 (960-965)
3. 書名 マルチに働く硬組織の一次繊毛—一次繊毛は細胞を並べている？ in 実験医学：一次繊毛の世界：細胞から突き出した1本の毛を巡る論争（井上尊生/企画）	

1. 著者名 1. Kawata K, Kubota S, Takigawa M	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 576 (405-413)
3. 書名 Analysis of transcytosis of CCN2 by chondrocytes. in Methods in Molecular Biology: CCN Proteins: Methods and Protocols (ed. M. Takigawa)	

〔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	服部 高子 (Hattori Takako) (00228488)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	青山 絵理子 (Aoyama Eriko) (10432650)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

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	滝川 正春 (Takigawa Masaharu) (20112063)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	西田 崇 (Nishida Takashi) (30322233)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	
研究分担者	久保田 聡 (Kubota Satoshi) (90221936)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	