

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592321
 研究課題名（和文）歯胚エナメル器星状網形成におけるパールカンシグナル伝達機構の解明
 研究課題名（英文）The mechanism of signal transduction of perlecan in the tooth enamel organ morphogenesis
 研究代表者
 依田 浩子（IDA HIROKO）
 新潟大学・医歯学系・准教授
 研究者番号：60293213

研究成果の概要（和文）：

基底膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカン・パールカンがエナメル器形成にどのように関与しているかを解明するために、パールカン上皮細胞過剰発現系トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを用いて、星状網形成からエナメル器退縮までの全過程におけるパールカンおよびパールカン関連シグナル分子の経時的変化について検索した。胎生期歯胚では星状網の形成に伴い、パールカンおよびパールカン関連分子が細胞間隙に沈着し、星状網細胞によるパールカン合成はエナメル器の成長ならびに退縮にあわせて時期特異的に厳密に制御されていた。従って、パールカンは巧妙に時間的発現調節がなされながら、歯の発育を制御する重要なシグナル分子と相互作用を示し、エナメル器形態形成に必要な時空間特異的な細胞外環境を形成していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, plays an important role in cellular growth, differentiation, adhesion and motility by its interaction with growth factors and cytokines. During odontogenesis, perlecan started to be localized in the central area of the epithelial tooth bud, and with the maturation of the enamel organ, it accumulated in the intercellular spaces of the stellate reticulum.

To understand the role of perlecan in enamel organ morphogenesis, we analyzed a keratin 5-perlecan transgenic mice that over-express perlecan in epithelial cells, and examined their tooth germs. The overexpression of perlecan in the enamel organ resulted in irregular morphology of teeth, suggesting that the expression of perlecan regulates growth factor signaling in a stage-dependent manner during each step of the interaction between ameloblast-lineage cells and mesenchymal cells. The time schedule of the intraepithelial expression of perlecan seems to be controlled critically in the process of odontogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：発生・分化、シグナル伝達、歯胚エナメル器、パールカン

1. 研究開始当初の背景

歯胚発生初期において、エナメル器内には細胞間隙が拡大した星状網構造が形成され、将来の歯冠形成の発育スペースの確保とともに、乏血管環境におけるエナメル器細胞分化に必要な栄養輸送に重要な役割をはたすと考えられている。また、エナメル器星状網の発育は将来の歯冠形態の決定にも重要であることが予想される。しかし、星状網構造の形成機構についてはほとんど研究がなされておらず、その具体的機能に関しても未解決のままであった。近年、我々はマウス歯胚エナメル器発育過程において、星状網細胞が基底膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカン・パールカンを産生し、細胞間隙にパールカンを多量に沈着させていく過程をあきらかにした。さらにケラチン5プロモータをもちいて歯胚エナメル器細胞にパールカンを過剰発現させるパールカントランスジェニックマウスの作製に成功し、同マウスの臼歯歯胚では星状網細胞間隙の拡大とエナメル器内の細胞分化に乱れが生じ、完成臼歯においては歯冠形態の鈍縁化が生じることが予想されている。つまり、星状網細胞による細胞外基質としてのパールカン発現量がエナメル器の発育、ひいては歯冠および歯根形態に影響をあたえる可能性が示されたのである。それでは、星状網細胞による時期特異的なパールカンの発現調節には、どのようなシグナル伝達経路が関与しているのだろうか？

現在までに、歯の発生・発育にかかわる多数の成長因子や転写因子の発現が明らかにされており、星状網形成初期においてはFGF・TGF- β ・Wnt・Msxなどのシグナル分子が星状網に発現することが判明している。したがって、パールカンがこれらの因子により制御あるいは相互作用を示しながら発現調節がなされ、星状網構造を形作ると予想されるが、歯胚におけるパールカンシグナル調節機構と星状網形成との関係についての研究はなされていない。そこで、本研究課題では、エナメル器星状網においてパールカン遺伝子発現を制御しているシグナル分子を

特定し、特徴的な星状網構造の形成機構について解析した。

2. 研究の目的

第一に、正常およびパールカントランスジェニック (TG) マウスにおいて、パールカンと相互作用を示すことが予想される成長因子、転写因子などのシグナル分子のエナメル器星状網形成過程における動態について、*in vivo* で組織学的に検索する。

第二に、パールカンノックアウト (KO) マウスの歯胚の経時的な形態変化を組織学的に検索する。次にエナメル器星状網に焦点を絞り、上記と同様の実験手法にてパールカンTGマウスの結果と比較しながら、パールカン遺伝子発現を制御しているシグナル分子を特定する。

第三に、正常マウス、パールカンTGマウス、パールカンKOマウスより単離した星状網細胞の初代培養系を確立し、上記までに特定されたパールカン関連シグナル分子の遺伝子ノックダウン法にて、星状網細胞の形態変化、各種因子の蛋白質発現と遺伝子発現変化を検索することにより、星状網細胞におけるパールカン関連シグナル伝達経路を再検証する。

3. 研究の方法

正常マウス、パールカンTGマウスおよびパールカンKOマウス歯胚組織を用いて、パールカン関連シグナル分子の星状網形成過程における動態について、*in vivo* での免疫組織化学的検索ならびに遺伝子発現解析を行った。次に、各々のマウス歯胚の器官培養ならびに星状網細胞の初代培養系にて、パールカン関連シグナル分子の蛋白質発現と遺伝子発現変化を検索し、星状網細胞におけるパールカン関連シグナル伝達経路を検索した。

(1) 正常マウスおよびパールカンTGマウス歯胚組織での検索

①免疫組織化学的検索

胎生期から出生後の正常およびパールカンTGマウス下顎骨を切除後、パラフィン連続切片を作製し、臼歯歯胚組織の星

状網形成からエナメル器退縮までの全過程におけるパールカン関連シグナル分子 (BMP・FGF・TGF- β ・VEGF・Wnt・Hedgehog) およびパールカン受容体 (dystroglycan, integrin- β 1) の経時的局在について酵素抗体法にて検索し、パールカンの局在と比較した。

②RNA ハイブリッド組織化学的実験

上記パールカン関連分子およびパールカン受容体の RNA プローブを作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法にて星状網細胞での遺伝子発現の有無を検索し、パールカン発現細胞との関係を明らかにした。

③星状網細胞の遺伝子発現解析

上記項目(1)-①の一部を凍結切片とし、レーザーマイクロダイセクションにより各発育段階のエナメル器星状網細胞のみを分離して採取し、RT-PCR法にて上記のパールカン関連シグナル分子の発現変化について検索し、パールカン遺伝子発現と比較した。以上までの結果より、星状網細胞におけるパールカン遺伝子発現変動と関連している分子種を予想した。

(2)パールカン KO マウス歯胚組織における検索

①病理組織学的検索

NIDCR・山田吉彦博士(研究協力者)より供与されたパールカン KO マウスについて、胎生期から出生後の頭部組織のパラフィン切片作製後 HE 染色を行い、各歯胚発育段階におけるエナメル器の形態変化や細胞分化、ならびにパールカン TG マウス歯胚で観察された歯冠・歯根形態の変化に着目しながら、パールカン欠失における歯胚発育異常の有無を観察した。

②免疫組織化学的検索

胎生期から出生後の臼歯歯胚星状網の形成から退縮過程におけるパールカン関連シグナル分子およびパールカン受容体の経時的局在について酵素抗体法にて検索した。

③RNA ハイブリッド組織化学的実験

パールカン関連分子の RNA プローブ

をもちいて、*in situ* ハイブリダイゼーション法にて星状網細胞での遺伝子発現の有無を検索した。

④星状網細胞の遺伝子発現解析

パールカン KO マウス歯胚組織より凍結切片を作製し、LMDにより各発育段階のエナメル器星状網細胞を採取し、RT-PCR法にて上記のパールカン関連シグナル分子の発現変動について検索した。

(3)パールカン過剰発現およびパールカン欠失星状網細胞をもちいた *in vitro* 解析

①星状網細胞の初代培養系の確立

正常およびパールカン TG マウスの歯胚組織より星状網細胞を分離培養し、各々の初代培養系を確立した。同細胞株をもちいて、星状網細胞の形態変化、蛍光抗体法によるパールカン関連分子の蛋白質発現を確認するとともに、RT-PCR法にて遺伝子発現変化を検索し、星状網細胞におけるパールカン関連シグナル伝達経路を再検証した。

②遺伝子抑制実験

正常マウスの胎生 13 日齢臼歯歯胚組織を摘出し、Trowell法にて7日間器官培養を行った。その際、パールカンアンチセンスオリゴを添加し、パールカン発現制御と星状網形成との関係を明らかにした。

4. 研究成果

(1)正常マウスおよびパールカン TG マウス歯胚組織におけるパールカン関連分子の動態

マウス胎生期臼歯歯胚では、星状網の形成とともにパールカンが星状網細胞間隙に局在しはじめ、同時に星状網細胞はパールカン受容体 (α -dystroglycan) を発現し、FGF・TGF- β 1・VEGF も細胞間隙に沈着していた。胎生期後期のエナメル器内への血管侵入の時期にはそれら増殖因子の発現が強調されていた。次いで、出生後のエナメル器退縮過程では、星状網細胞によるヘパラーゼ産生が亢進し、パールカン合成の停止・糖鎖の切断が生じ、増殖因子も血管周囲のみに限局してエナメル器の容積の急激な減少をもたらしていた。TG マウスでは、星状網におけるパールカンの過剰

発現により、胎生期後期でパールカン関連増殖因子ならびにパールカン受容体の発現亢進が確認され、エナメル器の膨張と星状網細胞間隙の拡大がみとめられた。したがって、歯胚エナメル器におけるパールカンの局在ならびにパールカン関連シグナル分子の細胞間隙への沈着が星状網形成ならびに血管侵入に始まるエナメル器退縮の制御に重要であることがあきらかになった。

(2) パールカン KO マウスにおける歯胚発育変化とパールカン関連分子の局在

正常マウスおよびパールカン KO マウスを用いて、臼歯歯胚組織の各発育段階において、歯胚形態の変化およびパールカン関連分子 (FGF-2・fibronectin・tenascin・heparanase・heparan sulfate)、パールカン受容体 (dystroglycan, integrin-β1)、基底膜分子 (laminin・collagen type IV) ならびにエナメル器細胞の分化マーカー

(amelogenin・ameloblastin) の経時的局在について免疫組織化学的ならびに *in situ* hybridization 法をもちいて検索した。その結果、パールカン KO マウス臼歯歯胚は正常同腹マウスの歯胚と比較して小さく、エナメル器細胞の発育分化の不良が確認された。免疫組織化学的には、胎生 18 日齢の正常マウスではエナメル芽細胞分化マーカーである amelogenin ならびに ameloblastin の発現が認められるものの、パールカン KO マウスではそれらの発現がみられず、さらに中間層細胞の分化も確認されなかった。パールカン以外の基底膜分子の局在変化は認められなかった。したがって、パールカンはエナメル器細胞の増殖ならびに分化過程に重要な役割を担っていることが示唆された。前項のパールカントランスジェニックマウスでの結果と合わせ、歯胚エナメル器におけるパールカンの局在ならびにパールカン関連シグナル分子の細胞間隙への沈着が、エナメル器の形態形成に重要であることが示唆された。

(3) *in vitro* 系におけるパールカン過剰発現およびパールカン発現抑制による歯胚発育変化

マウスエナメル器細胞の初代培養細胞を用いて、パールカンと星状網細胞分化について *in vitro* 系にて検索した。さらに、マウス歯胚器官培養系にて、アンチセンス法によりパールカン遺伝子発現を制御し、歯胚発育変化について組織学的に解析した。エナメル器細胞培養実験では、通常培養皿およびパールカン含有マトリゲル上にて培養後、細胞骨格 (サイトケラチン 14、ファロイジン)、パールカン受容体 (α -dystroglycan, integrin-β1)、ならびにエナメル器細胞の分化マーカー

(ALP, amelogenin, ameloblastin) の発現変化について、蛍光抗体法にて観察した。その結果、マトリゲル上ではエナメル器上皮細胞は細胞骨格が放射状に走行する紡錘形の星状網細胞様に変化し、細胞表面にはパールカン受容体 (α -dystroglycan) の発現を伴っており、*in vivo* での星状網細胞の染色結果が反映されていた。従って、細胞外のパールカンが星状網細胞分化に重要であることが証明された。さらに、器官培養実験では、パールカンアンチセンス DNA を胎生 13 日齢臼歯歯胚に遺伝子導入し、7 日間培養した。その結果、エナメル器の形成は認められたものの、エナメル器内での細胞分化が悪く、さらに、歯乳頭細胞の細胞密度も低下していた。したがって、パールカンはエナメル器細胞分化に重要な役割を果たしていることが示された。

以上のパールカントランスジェニックマウスおよびパールカンノックアウトマウスでの結果と合わせ、歯胚エナメル器におけるパールカンの局在ならびにパールカン関連シグナル分子の細胞間隙への沈着が、エナメル器の形態形成に重要であることが初めて証明された。

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 12 件)

1. Ida-Yonemochi H, Maruyama S, Kobayashi T, Yamazaki M, Cheng J, Saku T: Loss of keratin 13 in oral carcinoma in-situ: a comparative study of protein and gene

- expression levels using paraffin sections. *Modern Pathology Epub 2012 Feb 3*. (査読有)
2. Quispe-Salcedo A, [Ida-Yonemochi H](#), Nakatomi M, [Ohshima H](#): Expression patterns of nestin and dentin sialoprotein in the process of dentinogenesis and aging. *Biomed Res* 33(2): 119-132, 2012. (査読有)
 3. Ishikawa Y, [Ida-Yonemochi H](#), Nakakura-Ohshima K, [Ohshima H](#): The relationship between cell proliferation and differentiation and mapping of putative dental pulp stem cells during mouse molar development by chasing BrdU-labeling. *Cell Tissue Res* 348(1): 95-107, 2012. (査読有)
 4. [Ida-Yonemochi H](#), Satokata I, [Ohshima H](#), Sato T, Yokoyama M, Yamada Y, [Saku T](#): Morphogenetic roles of perlecan in the tooth enamel organ: An analysis of overexpression using transgenic mice. *Matrix Biol* 30(7-8): 379-388, 2011. (査読有)
 5. [Ida-Yonemochi H](#), Nakatomi M, Harada H, Takata H, Baba O, [Ohshima H](#): Glucose uptake mediated by glucose transporter 1 is essential for early tooth morphogenesis and size determination of murine molars. *Dev Biol* 363(1): 52-61, 2011. (査読有)
 6. [Ida-Yonemochi H](#), Shahidul A, [Saku T](#): Differential expression profiles between α -dystroglycan and integrin β 1 in ameloblastoma: two possible perlecan signaling pathways for cellular growth and differentiation. *Histopathology*, 58: 234-245, 2011. (査読有)
 7. Saito K, Nakatomi M, [Ida-Yonemochi H](#), Kenmotsu S, [Ohshima H](#): The Expression of GM-CSF and Osteopontin in Immunocompetent Cells Precedes the Odontoblast Differentiation Following Allogenic Tooth Transplantation in Mice. *J Histochem Cytochem*. 59(5): 518-29, 2011. (査読有)
 8. Mutoh N, Nakatomi M, [Ida-Yonemochi H](#), Nakagawa E, Tani-Ishii N, [Ohshima H](#): Responses of BrdU label-retaining dental pulp cells to allogenic tooth transplantation into mouse maxilla. *Histochem Cell Biol* 136(6): 649-661, 2011. (査読有)
 9. Ishikawa Y, [Ida-Yonemochi H](#), Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Jung HS, Honda MJ, Ishii Y, Watanabe N, [Ohshima H](#): Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries. *Histochem Cell Biol* 134 (3): 227-241, 2010. (査読有)
 10. [Ida-Yonemochi H](#), Tanabe Y, Ono Y, Murata M and [Saku T](#): Focal osteoporotic bone marrow defects associated with a cystic change of the maxilla: a possible histopathogenetic background of simple bone cyst. *J Oral Med Pathol* 15 (1): 35-38, 2010. (査読有)
 11. [Ida-Yonemochi H](#), Nakajima M, [Saku T](#): Heparanase, heparan sulfate and perlecan distribution along with the vascular penetration during stellate reticulum retraction in the mouse enamel organ. *Arch Oral Biol*, 55:778-787, 2010. (査読有)
 12. Tilakaratne WM, Kobayashi T, [Ida-Yonemochi H](#), Swelam W, Yamazaki M, Mikami T, Alvarado CG, Shahidul AM, Maruyama S, Cheng J, [Saku T](#): Matrix metalloproteinase 7 and perlecan in oral epithelial dysplasia and carcinoma in situ: an aid for histopathologic recognition of their cell proliferation centers. *J Oral Pathol Med* 38: 348-55, 2009. (査読有)
- [学会発表] (計 10 件)
1. [依田浩子](#), [高田洋樹](#), [大島勇人](#): 酵素合成グリコーゲンによる歯胚形成促進作用の検証. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 甲府, 2012. 3. 26-28, 解剖雑誌 87(Suppl): 108, 2012.
 2. [依田浩子](#): 歯の形態形成における基底膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカン・パーレカンの機能. 歯科基礎医学会学術シンポジウム (メインシンポジウム 1) 「歯の形態形成を制御する細胞外環境のダイナミズム」. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岐阜, 2011. 9. 30-10. 2, *J Oral Biosci* 53(Suppl): 67, 2011.
 3. [Ida-Yonemochi H](#), Takata H, Tanaka M, Nakagawa E, Kenmotsu S, [Ohshima H](#):

- Enzymatically synthesized glycogen has osteogenic potential *in vitro* and *in vivo*. 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 横浜, 2011. 3. 28-30, J Physiol Sci 61(Suppl 1): S182, 2011.
4. 依田浩子, 中富満城, 大島勇人: 象牙質・歯髄複合体培養法による歯髄再生モデルの確立と歯髄組織幹細胞の動態. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 2010. 9. 20-22, J Oral Biosci 52(Suppl): 122, 2010.
 5. Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Harada H, Ohshima H: Differential expression and functional significance of glucose transporters during murine tooth development. 10th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, Berlin, Germany, 2010. 9. 1-4.
 6. 安樂純子, 葛城美德, 中富満城, 依田浩子, 西川 敦, 児玉泰光, 大島勇人, 木南 凌, 高木律男: *Bcl11b/ Ctip2/Rit1* 転写因子機能低下がもたらすマウス切歯発育異常. 第 64 回日本口腔外科学会学術集会, 札幌, 2010. 6. 24-25.
 7. 依田浩子: マウス歯胚発育過程における ATBF-1 の局在. 第 3 回 ATBF1 研究会, 金沢, 2010. 6. 12.
 8. 依田浩子, 中富満城, 中川英蔵, 大島勇人: マウス歯胚発育におけるグルコース輸送体の局在と機能. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 盛岡, 2010. 3. 28-30, 解剖雑誌 85(Suppl): 175, 2010.
 9. Ida-Yonemochi H: Functional significance of glucose transporters during murine tooth development. 平成 20 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業連絡会議, 東京, 2010. 2. 19-20.
 10. Ida-Yonemochi H: Perlecan, a basement membrane-type heparan sulfate proteoglycan, regulates enamel organ morphogenesis. 平成 20 年度戦略的研究基盤形成支援事業研究集会, 東京, 2009. 2. 20-21.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依田 浩子 (IDA HIROKO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 60293213

(2) 研究分担者

大島 勇人 (OHSIMA HAYATO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 70251824

(3) 連携研究者

朔 敬 (SAKU TAKASHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 40145264