

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592735

研究課題名(和文)鉄代謝異常モデルラットを用いた病態メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathological mechanism on abnormal iron metabolism using a rat model

研究代表者

野間 隆文(NOMA, Takafumi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40189428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Sp6は歯において形態と鉄代謝調節に働くことを見出したことから、Sp6の分化制御における鉄代謝の役割を明らかにするための研究を行った。Sp6 Tgでは、エナメル芽細胞に対する鉄供給は正常コントロールと同じで、細胞内リソソームからのフェリチン・鉄複合体からの遊離不全が、またはその後のエナメル芽細胞からの分泌不全の可能性が明らかになった。そこで、Sp6とリソソーム機能およびSp6と分泌機転との関わりについて、詳細に検討するためのin vitroのアッセイ系の構築を試みたが、tet誘導系の確立に至らなかった。その一方で、Sp6はrock1遺伝子の発現制御を通して分泌制御に関わる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Based on our finding that Sp6 functions in not only morphological differentiation but also iron metabolism during tooth development, I performed a study to clarify a role of iron metabolism in the developmental control of Sp6. The iron supply for the ameloblast was the same as normal control in Sp6 Tg rat, suggesting two possibilities of the release imperfection from lysosomal ferritin and iron complex in the cell, or the secretion imperfection from the ameloblasts. Then, to further analyze the relationship between Sp6 and lysosomal function or secreting mechanism, I tried to construct the tet induction system for Sp6 using the dental epithelial cells that were originally established in my laboratory. Unfortunately, I could not lead to establish the tet inducible system by this moment. In addition, I found the involvement of Sp6 in Rock1 gene regulation, which is related to secretion mechanism.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：Sp6 歯原性上皮細胞 鉄代謝 テトラサイクリン遺伝子誘導系 細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

エナメル芽細胞における鉄代謝については、肝臓や脾臓といった組織に比べ、これまで研究がなされていなかった。Sp6 Tg ラットは歯の色素沈着に異常を示したことから、肝臓や脾臓以外の組織での鉄代謝異常のメカニズムを明らかにする貴重なモデルとなることが唆された。

2. 研究の目的

Sp6 によるエナメル芽細胞の分化制御における鉄代謝機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

P-1 Sp6 Tg におけるエナメル芽細胞に対する鉄供給量の変化の検討

血清鉄の測定により、鉄供給のレベルの違いについてその有無を確認する。

P-2 鉄負荷時における Sp6 発現の影響評価の検討

Sp6 Tg ラットを作出した同系ラット切歯エナメル上皮細胞から樹立したラットエナメル芽細胞株 G5 細胞の培養液にクエン酸鉄を負荷し、一過性の Sp6 過剰発現をした場合のリソソームでの鉄沈着またはリソソームから鉄遊離の程度を細胞染色で調べた。Sp6 の過剰発現は組織染色と Western blot 解析によってモニターする。

P-3 Sp6 による鉄代謝関連分子の発現調節の検討

G5 細胞に Sp6 発現ベクターを導入し過剰発現させ、鉄代謝関連遺伝子の発現を RT-PCR で調べる。

P-4 Sp6 誘導型発現ベクターによる安定細胞株の樹立

Sp6 の安定的誘導株の樹立による Sp6 レベルの安定化をはかるために、tet 誘導型 Sp6 発現ベクターを導入した歯原性上皮細胞株の作製を試みる。

P-5 分泌制御に関わる Sp6 標的遺伝子 *Rock1* の解析

Sp6 の分泌代謝における役割について検討を進めるために、分泌制御に関わる *Rock1* 分子の遺伝子発現制御機構を検討する。

4. 研究成果

P-1 Sp6 Tg におけるエナメル芽細胞に対する鉄供給量の変化の検討

Sp6Tg における歯の表現型について：

図1で示されるように、生後6週後の野生型とSp6Tgでは、明らかに切歯での黄色の色素沈着が認められなかった。



図1 . Sp6 Tg における歯の表現型 (J Med Invest.59,59-68,2012 より)

歯の組織学的検査では歯の成熟期での Sp6 の異所性発現が認められるとともに、対エナメル芽細胞の退縮が認められず、成熟期の背の高い細胞のまま存在していた。

そこで、鉄沈着不全の原因を探る目的で、血清中の鉄レベルを測定したところ、Sp6Tg とコントロールで有意な差は認められなかった(図2)。

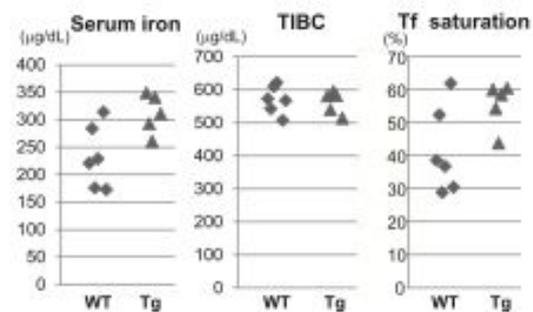


図2 . 血清鉄量、鉄結合能、トランスフェリン飽和度について (J Med Invest.59,59-68,2012 より)

P-2 鉄負荷時における Sp6 発現の影響評価の検討

Sp6 過剰発現時における歯の細胞での鉄の過剰沈着機序の仮説として図3のように Sp6 が遺伝子発現を介して生じていると想定した。

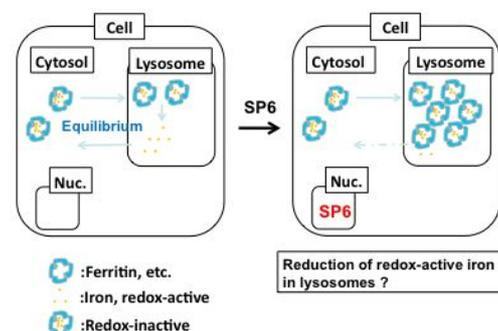


図3 . Sp6 過剰発現による細胞内鉄貯留の機序についての仮説

歯原性上皮細胞クローン G5 細胞に *Sp6* 遺伝子を導入した結果、*Sp6* の過剰発現は確認されたものの、リソソームからの鉄遊離についての所見については再現性を持って確認できなかった。*Sp6* の発現レベルのバラツキによることが、その原因として示唆された。

P-3 *Sp6* による鉄代謝関連分子の発現調節の検討

G5細胞に*Sp6*発現ベクターを導入し過剰発現を誘導した。コントロールとともに、経時的にRNAを抽出し、*Sp6*標的分子の発現レベルをRT-PCRによって確認した。既知の鉄の分泌に関する分子には*Sp6*の過剰発現との相関は認められなかった。

P-4 *Sp6* 誘導型発現ベクターによる安定細胞株の樹立

鉄代謝における*Sp6*の効果を評価するために、同じ遺伝的背景の歯原性上皮細胞クローンG5に図4で示されるTet*Sp6*発現誘導系を考案し、遺伝子導入細胞クローンを作製することとした。

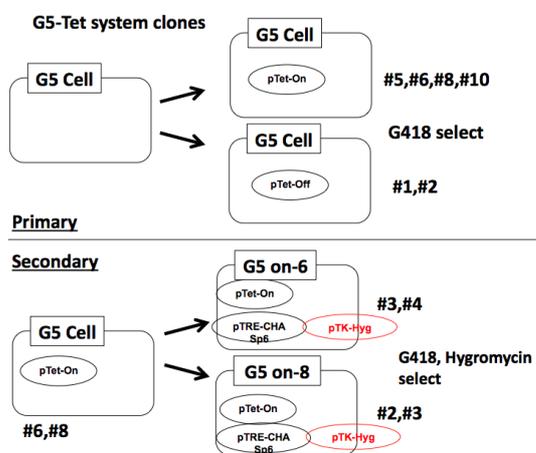


図4 . Tet *Sp6* 発現誘導系構築のステップ

Tet on ベクター導入安定的発現株と Tet off ベクター導入安定的発現株のそれぞれについて、pTRE-*Sp6* ベクターをリポフェクション法で導入し、G418 で薬剤選択により Tet on-*Sp6* を 4 系統 (計 6 クローン)、Tet-off-*Sp6* を 2 系統 (計 4 クローン) を樹立した。細胞増殖の安定性から Tet-on-*Sp6* の 4 クローンについて、*Sp6* 遺伝子発現誘導・増強能を RT-PCR にて検討した。その結果、いずれのクローンについてもコントロールと同程度の mRNA 発現が認められた。しかしながら、いずれもドキシサイクリンによる発現の誘導や増強が認められなかった。

P-5 分泌制御に関わる *Sp6* 標的遺伝子 *Rock1* の解析

Sp6 は *Rock1* 遺伝子プロモーターの活性増強作用を有することを見出した。*Rock1* 遺伝子プロモーター領域 DNA への *Sp6* 結合部位を

同定した。さらに、*Sp6* と同じ DNA 結合部位を有すると言われる Sp 転写因子ファミリーの *Sp1* は *Rock1* 遺伝子プロモーターに対して、影響を与えていないことも見出し、*Sp6* は歯原性上皮細胞特異的な働きをしていることを見出した。

Rock1 タンパク質は遺伝子発現、細胞内輸送、細胞形態等において機能しており、*Sp6* の発現とリンクすることから、鉄代謝に関わるフェリチン等の細胞内輸送を介した鉄代謝への関与が示唆された。今後、*Sp6* が *Rock1* を介して、鉄顆粒の分泌機転に働いている事を確かめ、*Sp6* の新たな役割について、報告したい。

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4件)

1. Yanuaryska RD, Miyoshi K, Adiningrat A, Horiguchi T, Tanimura A, Hagita H, and Noma T.

Sp6 regulation of *Rock1* promoter activity in dental epithelial cells.

J Med Invest 2014 in press. (査読有)

2. Adiningrat A, Tanimura A, Miyoshi K, Yanuaryska RD, Hagita H, Horiguchi T, and Noma T.

Ctip2-mediated *Sp6* transcriptional regulation in dental epithelium-derived cells.

J Med Invest 61, 126-136,2014. (査読有)

3. Muto T, Miyoshi K, Horiguchi T, Hagita H, Noma T.

Novel genetic linkage of rat *Sp6* mutation to Amelogenesis imperfect.

Orphanet Journal of Rare Diseases 7, 1-11, 2012.doi:10.1186/1750-1172-7-34. (査読有)

4. Muto T, Miyoshi K, Horiguchi T, Hagita H, Noma T.

Dissection of morphological and metabolic differentiation of ameloblasts via ectopic *SP6* expression.

J Med Invest 59, 59-68,2012. (査読有)

[学会発表](計7件)

1. Adiningrat A, Tanimura A, Miyoshi K, Yanuaryska RD, Horiguchi T, Hagita H, and Noma T.

Role of Ctip2 in *Sp6* gene regulation.

第36回日本分子生物学会年会 2013.12.4 神戸ポートアイランド(兵庫県)

2. Yanuaryska RD, Miyoshi K, Horiguchi T, Tanimura A, Adiningrat A, and Noma T. SP6 Positively Regulates Rock1 Promoter Activity in Dental Epithelial Cells
第 55 回歯科基礎医学会 2013.9.21、岡山コンベンションセンター（岡山県）

3.三好圭子, Yanuaryska RD, Adiningrat A, 萩田浩子, 谷村綾子, 堀口大吾, 野間隆文
転写因子 SP6 の構造と機能解析.
第 54 回 日本生化学会中国・四国支部例会 2013.6.1、徳島大学大塚講堂（徳島県）

4. Yanuaryska RD, Miyoshi K, Horiguchi T, Tanimura A, Hagita H, and Noma T. SP6 and AP2 regulate Rock1 expression in dental epithelial cells.
第 54 回 日本生化学会 中国・四国支部例会 2013.6.1、徳島大学大塚講堂（徳島県）

5.三好圭子,武藤太郎,堀口大吾,萩田浩子,野間隆文
エナメル質形成不全症の新規遺伝子の発見
第 57 回日本人類遺伝学会 2012.10.25、京王プラザホテル（東京都）

6.Yanuaryska RD, Miyoshi K, Utami TW, Horiguchi T, and Noma T. Identification of SP6 target genes in rat dental epithelial cell.
第 53 回歯科基礎医学会 2011.10.1、長良川国際会議場（岐阜県）

7.Utami TW, Miyoshi K, Hagita H, Yanuaryska RD, Horiguchi T, and Noma T. SP6 stability and functional linkage during amelogenesis.
第 84 回 日本生化学会 2011.9.22、国立京都国際会館（京都府）

〔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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野間 隆文 (NOMA Takafumi)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：40189428

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：