

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462777

研究課題名(和文) プロテオグリカンを介した歯胚細胞外環境の構築機序の解明と新規歯胚組織再生法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of construction mechanism of extracellular environment around tooth germs via proteoglycan

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では歯胚発育・再生過程におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の局在と機能を明らかにし、CS鎖の歯胚組織再生法への応用の可能性について検討した。正常歯胚では、CS鎖は幼若歯乳頭、神経・骨・軟骨周囲の間葉に強く発現し、歯髄組織の成熟とともに歯根先端部に限局したことより、歯髄の神経誘導と歯髄幹細胞ニッチの形成に関与している可能性が示された。また、CS合成酵素ノックアウト(CSKO)マウスでは、顎顔面奇形、頭蓋骨の形態変化と骨・軟骨の低形成、歯髄再生の変化が確認された。以上より、CSPGは歯ならびに頭蓋顔面の発生・再生を調節する重要な分子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) is one of major extracellular matrices and is known to play an important part in organogenesis. To elucidate the role of CS in tooth and craniofacial development and regeneration, we analyzed the craniofacial morphology in chondroitin sulfate synthetic enzyme knockout (CSKO) mice. In normal odontogenesis, the CS chain localized in immature dental papilla and periodontal ligament. In the differentiated dental pulp, CS chain restricted to the apex of tooth root. In CSKO mice, some of KO mice exhibited severe facial developmental defect. Although most of CSKO mice showed normal postnatal development, they exhibited the deformation of cranial bone and malocclusion. These results suggest that CS chain is necessary for normal tooth and craniofacial morphogenesis.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：プロテオグリカン コンドロイチン硫酸 歯胚 細胞外環境 顎顔面発育

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は周囲に細胞外マトリックス(ECM)を分泌し、そこに必要なシグナル分子やプロテアーゼを配備することにより細胞外環境を形成していく。歯胚発育過程においては、それら細胞外環境が時期特異的にダイナミックに改変されながら、歯の形態形成が成し遂げられていく。その ECM の主体を占めるのがプロテオグリカンであり、コア蛋白質ならびに糖鎖に結合する種々のシグナル分子と特異的に結合しないしは解離しながら、それらの時空間配置を調節することにより、細胞内シグナリングを制御して歯胚細胞の増殖および分化を誘導していると想定される。しかし、歯の形態形成におけるプロテオグリカン、特にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの時期特異的な発現調節とその分解機構、コア蛋白質と糖鎖の動態、細胞外シグナル分子との相互作用、ならびに細胞内情報伝達機構に関しては、ほとんどが未解明のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究ではヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)と共に細胞外基質の主要構成分子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)を中心に歯胚の細胞外環境の構築とその変化、幹細胞ニッチとしての役割、歯胚細胞内シグナル伝達と細胞分化機構の解明を目的に、遺伝子改変マウスを用いて解析する。さらに、これまでの HSPG の結果と合わせて、プロテオグリカンと歯の形態形成について要約し、細胞外環境の調節により幹細胞分化調節、ならびに血管・神経再生を誘導可能とする新たな歯胚再生誘導法を確立するための基礎的知見を得ることを目的とした。

具体的には、第一にマウス歯胚発育過程における CSPG 分子ならびに CSPG 分解酵素、CSPG 受容体について、とくに幹細胞、血管および神経の局在との関係性に注目しながら *in vivo* での局在変化を組織学的に検索する。

第二に、プロテオグリカンを介したシグナル分子の細胞内情報伝達機構と細胞分化との関係を明らかにするために、歯胚器官培養および歯胚上皮・間葉細胞を用いて *in vitro* 系にて検索する。とくに、器官培養系では、種々の発育段階の歯胚を使用することにより、時期特異的な歯胚細胞外環境の形成機構を検索可能と予想される。

第三に、CS 合成のキーエンザイムである Chondroitin sulfate N-acetylglact-

saminyltransferase-1 (Csgalact-1) の遺伝子ノックアウト (KO)マウスの歯の表現系の解析を行う。また、同 CSKO マウスより樹立した歯胚細胞を用いた *in vitro* 実験では、CS 鎖を介するシグナル伝達が歯胚上皮・間葉細胞へ及ぼす影響について解析する。

第四に、歯胚組織再生へのプロテオグリカンの応用のための基礎データを得る目的で、歯の再植実験系をもちいて、歯髓組織ならびに歯根膜組織の再生過程における CS 鎖の動態について、正常マウスおよび CSKO マウスを用いた実験系にて、神経および血管再生、幹細胞動態について比較検討する。得られた知見をもとに、歯の再生治療において、プロテオグリカンとシグナル分子を配備させ、幹細胞分化誘導、血管ならびに神経誘導を制御しながら歯胚分化を促進させるという、新たな歯胚再生法の確立を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯胚発育過程におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの動態

#### ① 免疫組織学的検索

胎生期から生後の各歯胚発育段階のマウス切歯・臼歯組織において、CSPG コア蛋白質、CS 鎖、CSPG 受容体 (integrin) の経時的局在について検索した。その際、血管および神経組織との関係性にも着目し、CSPG を中心とした細胞外環境の構成と歯胚発育過程に伴う変化の概要をとらえた。また、CS 鎖との比較のためにヘパラン硫酸鎖 (HS 鎖) も同時に解析した。

### (2) コンドロイチン硫酸合成酵素ノックアウト (CSKO)マウスの解析

#### ① 歯および顎顔面の形態学的観察

CS 鎖合成のキーエンザイムである Chondroitin sulfate N-acetylglactosaminyltransferase-1 の遺伝子ノックアウトマウス (CSKO マウス)の顎顔面形態変化について組織学的に解析し、顎顔面発育過程における CS の機能的役割について検討した。具体的には胎生 15 日齢から生後1年齢までの各発育段階の CSKO マウスを 4% PFA にて灌流固定し、頭部組織についてマイクロ CT、EPMA 解析、組織切片を用いた形態学的検索を行った。さらに CS 関連分子について、顎顔面部より採取した組織を用いて、ウエスタンブロッティング法、RT-PCR

法にて蛋白質および遺伝子レベルでの発現変化について解析した。

## ② CS 鎖および CS 鎖結合分子の解析と顎顔面発育変化との対応

CS 鎖のノックダウン量と顎顔面発育変化を厳密に検討するために、マウスの組織の一部を採取し、糖鎖解析を行い CS 鎖の定量解析を行った。同時に CSPG 結合分子の量的変化も検索し、それら分子の増減と歯および顎顔面の形態変化との関係を詳細に解析した。

## ③ CSKO マウスの口腔粘膜細胞の初代培養系の確立

正常および CSKO マウスの口腔粘膜組織より、上皮細胞と間葉細胞を分離培養し、初代培養系を確立した。その後、正常細胞と CSKO 細胞について、細胞増殖および細胞分化能の差異について RT-PCR 法およびウエスタンブロット法にて解析した。

## (3) コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの歯の再生過程での役割の解明

### ① CSKO マウスを用いた臼歯再植実験系による歯髄・歯根膜再生と CS 鎖の関連性の解析

生後3週齢の正常マウスおよび CSKO マウスを用いて、深麻酔下にて上顎第一臼歯を抜去後再植した。術後3日～14 日後にマウスを深麻酔下で灌流固定し、上顎骨を摘出し組織切片を作成し、歯髄ならびに歯周組織の再生過程を経時的に観察した。とくに神経組織および血管組織の再生に着目して比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 歯胚発育過程におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの動態

胎生 13 日齢から生後4週齢のマウス切歯・臼歯組織における CS 鎖、HS 鎖の経時的局在について、血管および神経組織との関係性に着目しながら免疫組織化学的に検索した。その結果、胎生 13 日齢の蕾状期から帽状期歯胚では CS 鎖はエナメル器と歯小嚢に局在し、胎生15日齢以降の鐘状期歯胚では歯乳頭にび漫性に局在し

ており、さらに神経・骨・軟骨周囲の間葉にも強く発現していた。生後の歯髄組織の成熟とともに CS 鎖の発現は消失し、生後4週齢臼歯では歯根先端部の歯髄組織(歯髄幹細胞を含む SCAP 領域)に局限していた。同時に歯根膜組織には全域にわたり強陽性を示した。一方、HS 鎖は CS 鎖とは相反的な局在を示し、胎生 13 日齢の蕾状期では歯乳頭に強陽性をしめし、胎生15日齢以降の鐘状期では徐々に消失し、血管および神経組織周囲の基底膜、上皮基底膜に局限した。以上より、CS 鎖はとくに神経組織ならびに骨組織形成の際の誘導、さらに歯髄幹細胞ニッチの形成に関与している可能性が示された。

### (2) コンドロイチン硫酸合成酵素ノックアウト(CSKO) マウスの解析

#### ① 頭蓋顔面発育と歯の形態学的観察

CSKO マウスには、眼および鼻腔の形成不全、唇裂・口蓋裂を生じる個体が観察された。それらの顔面奇形を伴わない個体はほぼ正常な発育を示したが、頭蓋骨に前後径の短縮と幅径の減少、容積の減少等の形態異常が認められた。さらに、幾つかの個体には下顎前突を主とする不正咬合が確認された。組織学的には頭蓋底軟骨結合、下顎頭軟骨および鼻軟骨に、細胞増殖の減少ならびに軟骨組織の低形成が確認された。歯の形態形成には明らかな異常は確認されなかったが、EPMA 解析にて歯ならびに周囲歯槽骨のカルシウム濃度が低く、低石灰化を示すものも見られた。以上より、コンドロイチン硫酸は顎顔面部の軟骨形成および骨形成を制御し、顎顔面形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### ② CS 鎖および CS 鎖結合分子の解析と顎顔面発育変化との対応

正常および CSKO マウスより、筋組織、軟骨組織、骨組織を採取し、RT-PCR 法にて CSPG 関連シグナル分子の発現変化を解析した。その結果、CSKO マウスでは beta-catenin、Lef1 などの WNT 関連分子の発現低下、FGF-2、BMPs の遺伝子および蛋白質の発現低下が確認された。

#### ③ CSKO マウスの口腔粘膜細胞の初代培養系の確立

生後1日～3日齢の正常およびCSKOマウスより、口蓋粘膜細胞と歯髄細胞を採取し、初代培養実験を行った。細胞分化度の差異をRT-PCRならびにウエスタンブロッティング法にて検索した結果、CSKO細胞では細胞増殖マーカーであるcyclin D1およびbeta-cateninの発現変動が確認された。

### (3) コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの歯の再生過程での役割の解明

#### ① CSKOマウスを用いた臼歯再植実験系による歯髄・歯根膜再生とCS鎖の関連性の解析

生後3週齢の正常マウスおよびCSKOマウスを用いて、上顎第一臼歯の再植実験を行った。その結果、CS鎖は再植7日後に歯髄内の血管および神経再生部の周囲に集積し、14日後では歯根先端部の歯髄幹細胞が局在している未分化領域に局限していた。CSKOマウスでは、それらCS鎖の集積が減少し、血管および神経組織の再生状況が変化しており、正常マウスと比較して損傷後の歯髄再生が早期に開始されている可能性が示唆された。従って、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは歯の発生ならびに再生過程において、血管や神経組織を誘導制御するとともに、幹細胞ニッチを形成し、組織の未分化性の維持にも関与しながら歯髄組織や歯根膜組織の形成を制御している重要な分子であることが示された。

#### 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5件)

1. Ida-Yonemochi H, Yamada Y, Yoshikawa H, Seo K. BDNF promotes sclerotic change in alveolar bone after nerve injury. *PLoS One*. 12(1):e0169201, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0169201 (査読有).
2. Ida-Yonemochi H, Otsu K, Ohshima H, Harada H: The glycogen metabolism via Akt signalling is important for the secretion of enamel matrix in tooth development. *Mech Dev*. 139:18-30, 2016. doi: 10.1016/j.mod.2016.01.002 (査読有).

3. Otsu K, Ida-Yonemochi H, Fujiwara N, Harada H. The Semaphorin 4D-RhoA-Akt Signal Cascade Regulates Enamel Matrix Secretion in Coordination with Cell Polarization During Ameloblast Differentiation. *J Bone Miner Res*. 31(11): 1943-1954, 2016. doi: 10.1002/jbmr.2876 (査読有).
4. Nakaki T, Saito K, Ida-Yonemochi H, Nakagawa E, Kenmotsu S, Ohshima H: Contribution of donor and host mesenchyme to the transplanted tooth germs. *J Dent Res* 94(1): 112-120, 2015. doi: 10.1177/0022034514556536 (査読有).
5. Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Ohshima H: Establishment of in vitro culture system for evaluating dentin-pulp complex regeneration with special reference to the differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells. *Histochem Cell Biol*. 142(3): 23-33, 2014. doi: 10.1007/s00418-014-1200-7 (査読有).

[学会発表] (計9件)

1. 依田浩子, 大津圭史, 原田英光, 大島勇人: エナメル芽細胞分化過程におけるAMP-activated protein kinase (AMPK)の発現と機能. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎大学坂本キャンパス(長崎県・長崎市), 2017年3月28-30日.
2. 依田浩子, 森田航, 柴田俊一, 大島勇人: コンドロイチン硫酸は頭蓋顔面形態形成を制御している. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 2016年8月24-26日.
3. 依田浩子: 成熟期エナメル芽細胞の分化制御と糖代謝の役割. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 2016年8月24-26日.
4. Ida-Yonemochi H, Harada H, Ohshima H: Functional significance of

sodium-dependent glucose transporters during murine ameloblast differentiation. 12<sup>th</sup> International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD) 2016, Porvoo (Finland), 2016年6月13-18日.

5. 依田浩子, 森田 航, 柴田俊一, 和田芳野, 五十嵐道弘, 武内恒成, 大島勇人: コンドロイチン硫酸合成酵素遺伝子欠損マウスに生じる顎顔面発育異常. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会ワークショップ, ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市), 2016年3月28-30日.
6. 依田浩子, 大津圭史, 大島勇人, 原田英光: Aktシグナルがグルコース代謝を促進しエナメル芽細胞分化を誘導する. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市), 2015年12月1-4日.
7. 依田浩子, 大島勇人: エナメル芽細胞分化過程におけるナトリウム依存性グルコース輸送体の局在と機能. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市), 2015年9月11-13日.
8. Ida-Yonemochi H, Harada H, Ohshima H: Role of glucose metabolism during ameloblast differentiation. 2015 4th Tripartite Conference on Tooth and Bone Development & Regeneration, Narita View Hotel (Chiba・Narita), 2015年6月12-15日.
9. Morita W, Morimoto N, Ida-Yonemochi H, Wada Y, Takeuchi K, Igarashi M, Ohshima H: Linking genotype to phenotype in mice molars by means of morphometric mapping. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会, 神戸, 2015年3月21-23日, J Physiol Sci 65(Suppl1): S307, 2015.

[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

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

武内 恒成 (TAKEUCHI, Kosei)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90206946

柴田 俊一 (SHIBATA, Shunich)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授  
研究者番号: 80187400

##### (3) 連携研究者

大島 勇人 (OHSHIMA, Hayato)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 70251824