

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11368

研究課題名(和文) 基質小胞分泌メカニズムの解明と石灰化への応用

研究課題名(英文) Elucidation of matrix vesicles secretion mechanism and application to calcification

研究代表者

上田 公子(山口公子)(UEDA, Kimiko)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：40335807

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)：象牙芽細胞やエナメル芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞は、それぞれ象牙質、エナメル質、骨、軟骨の形成を担う細胞であるが、これらの細胞がどのように硬組織を形成していくのか詳細な分子機構については不明な点も多い。本研究では硬組織形成の詳細な分子機構の解明のために、硬組織形成細胞から分泌される基質小胞の分泌メカニズムの解明とその応用方法の開発を目指し実験を行った。細胞は、象牙質の形成を担う歯原性間葉細胞とエナメル質の形成を担う歯原性上皮細胞を用いた。この結果、歯原性間葉細胞より歯原性上皮細胞の方が基質小胞発現により関与している可能性が示唆された。

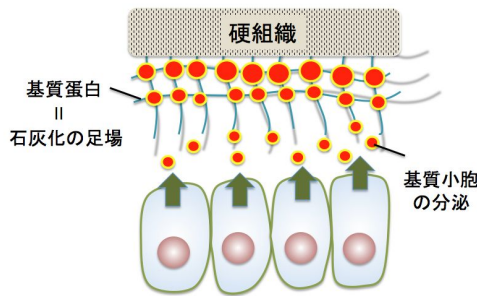
研究成果の概要(英文)：Odontoblast, ameloblast, osteoblast and chondrocyte plays a role of dentin, enamel, bone and cartilage formation, respectively. However, these molecular mechanisms remain unknown that how these cells form these hard tissue. This experiment was carried out to elucidate of secretion mechanism of matrix vesicles that were secreted from hard tissue-forming cells and application to calcification, for the elucidation of the detailed molecular mechanism about hard tissue formation. Dental mesenchymal cells and dental epithelial cells differentiate into dentin-forming odontoblasts and enamel-forming ameloblasts, respectively were used. These results suggested that dental epithelial cells are more closely related to secretion of matrix vesicles than dental mesenchymal cells.

研究分野：小児歯科学

キーワード：硬組織形成

1. 研究開始当初の背景

象牙芽細胞やエナメル芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞は、それぞれ象牙質、エナメル質、骨、軟骨の形成を担う細胞であるが、これらの細胞がどのように硬組織を形成していくのか詳細な分子機構については不明な点も多い。これらの細胞はそれぞれ硬組織形成の基盤になる基質蛋白質の合成を担っているが、それだけでは石灰化は起きない。それらと同時に分泌される様々な酵素や生理活性物質を含む脂質二重膜で囲まれた基質小胞が石灰化部位の決定と初期石灰化に重要な役割を担っている。しかしながら、どのようにこの基質小胞の分泌が制御されているのか多くの点で不明とされている。



2. 研究の目的

本研究では基質小胞の分泌メカニズムの解明と石灰化誘導への応用方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

基質小胞の回収について、

歯原性間葉細胞株として mDP 細胞、歯原性上皮細胞株として HAT7 細胞と SF2 細胞を用いた。

これらの細胞培養上清サンプルから基質小胞を分離、回収するために、PureExo エクソソーム単離キットと Total Exosome Isolation の 2 種類のキットを使用した。

培養液はウシ胎児血清(FBS)由来のエクソソームの混入をさけるため、FBS なしと 100,000g にて 18 時間超遠心を行い、基質小胞(エクソソーム)を除去し、その上清を回収した FBS を使用した。それぞれの培養条件(培養液の量、培養時間、FBS の濃度、細胞の量)の設定について検討した。

目指す基質小胞が単離できたかどうかの確認として、タンパクを回収し、ウエスタンブロット法を行った。基質小胞(エクソソーム)中に含まれるタンパクの発現を確認するため、1 次抗体として CD9 と CD81 を用いた。培養細胞からもタンパクを回収し、同抗体を用いて、ウエスタンブロット法を行った。

超遠心した FBS 上清は 3 分画に分かれる(図 1)。これまでに、マウスの歯胚では分化の過程で CD9 の発現の消失が確認されている。

このため、各層が細胞の増殖や分化にどの

ように影響し、どの層が基質小胞回収に有利かどうか確認することにした。

超遠心した FBS から回収した 3 つの層をそれぞれ含む培地にて SF2 の培養を行い、増殖試験(細胞カウント・BrdU)と分化(Amelogenin・Ameloblastin)についての実験を行った。



図 1

超遠心前の通常の FBS(図 1 左側)を含む培地をコントロールとして、超遠心法により得られた FBS の分画(図 1 右側、上方より第 1 層、第 2 層、第 3 層)をそれぞれ 10 パーセント含む培地にて実験を行った。

第 3 層を用いて、SF2 の細胞培養上清から、基質小胞の分離、回収を目指した。

第 3 層の次に増殖能のある第 2 層を用いて同様の実験を行った。

4. 研究成果

mDP 細胞、HAT7 細胞、SF2 細胞とも、培養細胞では CD9 と CD81 のタンパク発現が確認できた。

FBS なしの培養上清からは CD9、CD81 と十分な発現は確認できなかった。

超遠心した FBS を用いた mDP 細胞の培養上清からは、CD9、CD81 の発現は確認できなかった。一方、超遠心した FBS を用いた SF2 細胞の培養上清では CD9 のわずかな発現を認めた。

超遠心前の通常の FBS を含む培地をコントロールとして、超遠心法により得られた FBS の 3 つの分画をそれぞれ 10 パーセント含む培地にて、歯原性上皮細胞を培養し増殖試験を行った結果、細胞数のカウントでは、コントロールと比較して、最上方の第 1 層の使用で、細胞の増殖は有意に抑制され、中間層の第 2 層と最下層の第 3 層の使用で細胞の増殖が有意に促進された(図 2)。

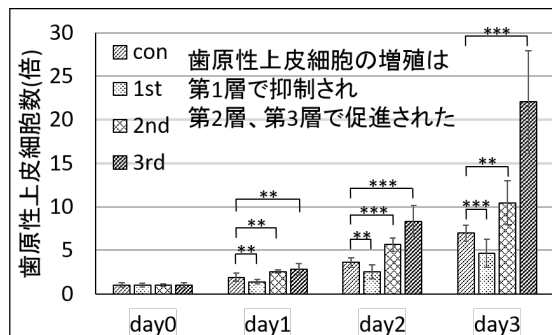


図 2

BrdU 陽性細胞率では、第 1 層の使用で、BrdU 陽性細胞率はコントロールと比較して有意に減少した。第 3 層の使用で、BrdU 陽性細胞率はコントロールと比較して有意に増加した。

Amelogenin・Ameloblastin を用いた、分化の実験では、Ameloblastin において、その発現範囲が、第1層の使用で、コントロールと比較して有意に広がった。

これらの実験により、超遠心法により得られた FBS 分画抽出液により、第1層では歯原性上皮細胞の増殖が抑制され、第2層、第3層では歯原性上皮細胞の増殖が促進された。その一方で、第1層では細胞分化が促進される所見を得た。

そこで、第3層を用いて、SF2 の細胞培養上清から、基質小胞の分離、回収を目指したが、今回試みた細胞培養条件では、十分な量の基質小胞の回収には至らなかった。

第3層の次に増殖能のある第2層を用いても結果は同じであった。

これらの結果より、歯原性間葉細胞より歯原性上皮細胞の方が基質小胞発現により関与している可能性が示唆された。

今回使用した FBS には Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 、リン酸、尿酸、アルカリホスファターゼ、LDH、sGOT、sGPT、GGT、コレステロール、ビリルビン、グルコース、尿素、クレアチニン、トリグリセリド、ヘモグロビン、鉄が含まれる。これらの中で、超遠心した際に下方の層に含まれる物質が、歯原性細胞のような硬組織を形成する細胞の良好な増殖に関わるのではないかと考えられた。

FBS 超遠心分画の効果については、最も上方の第1層を使用するとウシ受精卵の成熟が遅れ、下層の第3層を使用すると成熟が促進される (Momozawa K et al. J Mamm Ova Res 2011) と報告されている。しかし、成熟の促進に関与する成分は明らかにされていない。

FBS の成分であるコレステロールは、血液中ではタンパク質と複合体を形成し、リポ蛋白として存在する。リポ蛋白のうちコレステロールを主に運んでいるのが高比重リポ蛋白 (HDL) と低比重リポ蛋白 (LDL) である。LDL 受容体 (Brown MS and Goldstein JL Science 1986, Goldstein JL and Brown MS Nature 1990) の働きは非常に重要かつ多様である。Lrp4 (Weatherbee SD et al. Development 2006) は LDL 受容体ファミリーに属し、骨の形成や代謝の異常、歯の形成異常に関わる。さらに Lrp4 は Shh や Bmp のシグナル伝達を調整し、歯の形態維持に重要な役割を持つ (Ohazama A et al. PNAS 2010)。しかしながら、歯原性細胞への細胞レベルでのリポ蛋白の影響を調べた研究は見当たらない。

また、歯の発生は胎生期に始まり、歯冠の形態形成、石灰化を経て歯根の形成と完成にいたるまで、永久歯ではおよそ 10 年から 15 年の年月を要する。このように歯の形成には長い期間を必要とする。今日の歯に関する研究の進歩にも関わらず、歯の再生技術の実用化が難しい原因の一つに、歯の形成には長期の時間がかかることが考えられる。すなわち、

硬組織の形成を促進する因子やその詳細な機構については不明な点が多い。

そこで FBS に含まれる硬組織形成促進因子が同定され、その機構が明らかになれば、硬組織形成細胞の増殖・分化の促進が可能となる。特に、これまで長い時間を要した石灰化についての研究で、今後の同研究を期間短縮という点で大きく後押しし、これまで不明だった様々な分子メカニズムの解明に大きく貢献できると考えられた。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 公子 (UEDA, Kimiko)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：40335807

(2) 研究分担者

岩本 勉 (IWAMOTO, Tsutomu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授
研究者番号：90346916

長谷川 智一 (HASEGAWA, Tomokazu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学系）・講師
研究者番号：50274668

北村 尚正（KITAMURA, Takamasa）
徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学系）・助教
研究者番号：50614020

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()