

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19632

研究課題名（和文）歯髄感覚機能再生に着目した歯髄再生法の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of p75NTR modulation in the regeneration of pulp sensory function

研究代表者

犬塚 博之（Inuzuka, Hiroyuki）

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：20335863

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：歯科再生医療研究における質の高い歯髄再生には、歯髄における神経細胞および軸索の再生と誘導を介した歯髄感覚の再生が求められる。本研究では、歯髄における効率的な神経分化誘導法開発を目的として、神経細胞の分化・生存・軸索伸長の調節に重要な低親和性神経栄養因子受容体（p75 Neurotrophin Receptor: p75NTR）活性調節の分子基盤に着目した。本解析により翻訳後修飾を介したp75NTRタンパク質活性調節分子機序の一端が明らかとなり、知覚機能再生法の開発につながる有用な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞マーカーおよび神経成長因子受容体として機能するp75NTRの活性調節分子機序を解析し受容体活性化の任意制御を試みることは、効率的な神経分化誘導法の開発に向けた有力なアプローチとなり得る。移植医療分野で応用が進む間葉系幹細胞移植は特に脊髄損傷や脳梗塞など神経変性疾患の分野で顕著な成績を上げていることから、本研究で得られた知見は、神経組織・知覚機能再生法開発の分子機序解明の手がかりとなる可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：Efficient regeneration of pulp sensory function requires neural and axon regeneration and proper axon guidance in the dental pulp. In this study, we focused on the regulatory mechanisms of p75 neurotrophin receptor (p75NTR), an essential factor for neural differentiation, survival, and axon elongation. We found that post-translational modifications play a role in the regulation of p75NTR and modulate its activity. The findings of this study will provide an insight into developing a potential approach for the efficient regeneration of pulp function.

研究分野：分子生物学

キーワード：p75NTR

1. 研究開始当初の背景

歯髄ではこれまで様々な歯髄保存療法や歯髄再生療法が試みられており、骨髄間葉系幹細胞と同等の多分化能を有すると考えられている歯髄幹細胞を用いた歯髄再生療法の臨床研究も開始されている。歯髄は組織学的に象牙芽細胞のほか血管や神経に富んだ組織であり、特に象牙芽細胞と神経組織は歯の知覚に重要である。歯髄再生研究は、血管侵入に伴う象牙芽細胞の誘導による二次象牙質形成を主体に進められているが、さらに質の高い歯髄の再生には神経細胞及び軸索の再生と歯髄への誘導を介した歯髄感覚の再生が重要になると予想される。

低親和性神経栄養因子受容体 (p75 Neurotrophin Receptor: p75NTR) は、その機能が神経細胞の分化や生存・細胞死に関与しているほか、末梢組織への神経突起の誘導にも重要であることが報告されている。p75NTR は間葉系幹細胞マーカーとしても知られ、その発現が幹細胞未分化能維持や生存と相関している。歯髄との関わりにおいて歯髄再生時に p75NTR 陽性の神経線維が再生面に誘導されることから、歯髄組織再生後の神経線維の再進入と軸索の再構築、それに続く象牙芽細胞などとの相互作用による歯髄感覚の再生には歯髄幹細胞における NGF シグナル感受性の制御が重要な役割を果たしていることが考えられる。

2. 研究の目的

歯髄再生には歯髄における神経細胞および軸索の再生とそれら軸索の歯髄への誘導を介した歯髄感覚の再生が重要である。しかしながら、歯髄幹細胞からの精度の高い神経分化誘導法の確立のための詳細な分子機序が解明されるには至っていない。本研究では、間葉系幹細胞マーカーで神経成長因子受容体として機能する p75NTR の活性調節分子機序の詳細を解明することで、p75NTR タンパク質の活性化もしくは活性化抑制の任意制御を試み、NGF シグナル感受性調節を介した効率的な神経細胞分化誘導法の開発に応用することを考えた。

これまでの報告から p75NTR タンパク質の活性調節および量的制御にユビキチンプロテアソーム系の関与が示唆されている。特に p75NTR ポリユビキチン化修飾が NGF シグナル調節に関わっていると考えられているが、その生理的意義や詳細な分子制御メカニズムに関する知見は乏しい。このような背景から、本研究では新規ユビキチンリガーゼ (E3) の同定を含め、p75NTR 翻訳後修飾を介した受容体活性調節分子メカニズムの解明を試みることで、神経細胞分化や幹細胞性維持の制御につなげていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) p75NTR と相互作用する E3 の同定

p75NTR 細胞内ドメインアミノ酸一次配列の精査によりこの領域に結合する E3 分子を推定し、p75NTR と選定した候補 E3 との間の結合を免疫沈降法により確認した。

(2) p75NTR と E3 の結合を制御する分子機構の解析

E3 による基質認識とそのユビキチン化は基質側の翻訳後修飾により調節が働いていることが報告されていることから、本解析でも p75NTR の翻訳後修飾が E3 による基質認識に及ぼす影響について検討した。

(3) p75NTR 細胞内ドメインと E3 の相互作用解析

p75NTR はリガンド結合後に膜貫通ドメイン近傍でプロセッシングを受け、細胞内ドメイン (Intercellular domain: ICD) が膜から遊離することで下流の細胞内シグナル伝達を調節すると考えられている。このことから、免疫蛍光染色と免疫沈降法を用いて p75NTR-ICD の細胞内局在と E3 との相互作用を観察した。

(4) p75NTR タンパク質安定性の評価

同定した E3 が p75NTR タンパク質の安定性調節に関与しているか解析するため、培養細胞 (HeLa, SH-SY5Y) に shRNA 発現ウイルスを感染させて E3 をノックダウンすることで、p75NTR タンパク質の分解抑制に伴う細胞内蓄積が誘導されるかウエスタンブロット解析で評価した。さらに培養細胞に E3 を過剰発現させたのち、タンパク質合成阻害剤 Cycloheximide (CHX) 処理により p75NTR タンパク質半減期を測定することで、E3 の発現が p75NTR タンパク質不安定化を誘導するか検討した。

(5) p75NTR ポリユビキチン化の検討

p75NTR が E3 を介してポリユビキチン化修飾されることを確認するため、培養細胞における過剰発現系と In vitro 反応系を用いて p75NTR ユビキチン化を解析した。

(6) E3 と p75NTR の相互作用が神経細胞生存・分化に及ぼす影響の解析

E3 発現レンチウイルスを感染させた SH-SY5Y ならびに PC-12 細胞株に NGF 刺激を加えた細胞を用いて、E3 の過剰発現が p75NTR 下流シグナル修飾に与える影響についてウエスタンブロット解析により検討したほか、E3 過剰発現、E3 ノックダウンや p75NTR-SA 変異体強制発現が神経細胞の生存・分化に及ぼす影響を、ウエスタンブロット解析、定量 PCR、顕微鏡観察や FACS を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) p75NTR と相互作用する E3 の同定：ユビキチン化修飾の標的となる p75NTR 細胞内ドメインのアミノ酸配列精査によりコンセンサス E3 結合配列を検索し、相互作用の可能性が推定される E3 を p75NTR と共に 293T 細胞に導入して結合の有無を免疫沈降法により検討した。解析の結果、E3 と p75NTR が細胞内で相互作用していること示唆する結果が得られたほか、基質結合ポケットのアミノ酸に変異を導入した E3 変異体との結合が減弱したことから、両者の細胞内における結合は特異的であると結論づけた。

(2) p75NTR と E3 の結合を制御する分子機構の解析：同定した E3 と p75NTR との相互作用に翻訳後修飾による調節が関与している可能性を検討するため、p75NTR 一次配列のコンセンサス E3 結合配列中に存在するリン酸化酵素標的モチーフのセリン残基をアラニンに置換した p75NTR 変異体 (p75NTR-SA) を作製して、免疫沈降法により E3 との結合を検討した。野生型 p75NTR と E3 の間で明らかな相互作用が確認されたが、p75NTR-SA 変異体では結合が消失していたことから、p75NTR と E3 との間の結合は E3 認識配列中セリン残基のリン酸化に依存していることを示唆する結果が得られた。リン酸化モチーフを特異的に認識するリン酸化抗体を用いたウエスタンブロット解析において野生型 p75NTR リン酸化が確認された一方で、p75NTR-SA 変異体ではリン酸化のバンドが消失したことから、E3 による p75NTR の認識は結合配列中のリン酸化を介していることが確認された。

(3) p75NTR 細胞内ドメインと E3 の相互作用解析：E3 と p75NTR-ICD 相互作用解析のため、p75NTR-ICD 発現プラスミドを構築して 293T 細胞に導入し、p75NTR-ICD 細胞内局在と E3 との相互作用を確認した。免疫染色により ICD は核周囲に局在し E3 とは異なる染色像を示した。免疫沈降法による E3 と p75NTR 相互作用の解析でも両者の間に特異的な結合は認められなかった。このことから、E3 は全長 p75NTR とのみ特異的に相互作用している可能性が示唆された。

(4) p75NTR タンパク質安定性の評価：同定した E3 がポリユビキチン化を介して p75NTR のプロテアソーム依存的な分解を誘導するとの仮説のもと E3 を HeLa 細胞と SH-SY5Y 細胞でノックダウンすることにより、タンパク質分解抑制に伴う p75NTR の細胞内蓄積が認められるか観察した。p75NTR タンパク質量はコントロール細胞と比較して E3 ノックダウン HeLa 細胞でわずかに増加していたが、SH-SY5Y 細胞では差異は認められなかった。リガンド刺激が p75NTR 分解を誘導する可能性を検討するため、NGF 処理後の SH-SY5Y 細胞で同様に p75NTR タンパク質量を比較検討した結果、コントロール細胞との間で違いは観察されなかった。さらに、E3 と p75NTR 野生型および p75NTR-SA 変異体過剰発現系での p75NTR タンパク質半減期評価のための CHX chase 実験でも、E3 過剰発現や p75NTR-SA 変異体の使用において p75NTR タンパク質半減期に変化は認められなかったことから、p75NTR 安定性の調節が E3 分子を介しているかについては、さらに詳細な解析による検討が必要であると考えられた。

(5) p75NTR ポリユビキチン化の解析：p75NTR が E3 のリガーゼ活性を介してポリユビキチン化されるか検討するため、293T 細胞に p75NTR と E3 を共発現させたのち p75NTR のポリユビキチン化をウエスタンブロット解析により確認した。野生型 p75NTR では E3 発現後にポリユビキチン化の誘導が認められた一方で、E3 との結合モチーフに変異を導入した p75NTR-SA 変異体では E3 の過剰発現に依存したポリユビキチン化は減少していた。このことから同定した E3 は p75NTR を基質として認識してユビキチン化することで、その活性を制御している可能性が示唆された。付加されるポリユビキチン鎖は K63 連結型であることが示唆されたことから、p75NTR ユビキチン化が受容体の活性調節を介して下流のシグナル伝達の修飾に関与している可能性も考慮して検討する必要があると考えられた。

(6) E3 と p75NTR の相互作用が神経細胞生存・分化に及ぼす影響の解析：p75NTR と E3 の間の相互作用に関してその生理的意義を明らかとするため、E3 過剰発現 SH-SY5Y ならびに PC-12 細胞株を作製して NGF 刺激後の受容体下流シグナルの解析を試みた。MAP キナーゼのリン酸化を指標としたシグナル修飾の評価から、E3 過剰発現細胞で NGF 刺激依存的な ERK リン酸化の亢進が観察された一方で、基質と結合できなくした E3 変異体を過剰発現させた細胞ではそのリン酸化は抑制されていた。E3 過剰発現に加え E3 ノックダウン細胞や p75NTR-SA 過剰発現細胞株を作製し同様に表現型と下流シグナルの解析を進めている。p75NTR のユビキチン化が受容体のプロセッシングや局在制御などの分子調節を介して下流シグナルを修飾している可能性を考え、神経細胞の生存・分化との関連に関してさらに詳細な解析を検討している。

今後は p75NTR ユビキチン化の生理的意義を間葉系幹細胞の神経細胞分化や幹細胞性維持の観点から明らかとするため、マウス歯髄より調整した歯髄幹細胞ならびに不死化間葉系幹細胞株で E3 をノックダウンすることにより未分化能維持や神経細胞分化にどのような影響がみられるか検討するほか、p75NTR 野生型ならびに p75NTR-SA 変異体過剰発現細胞株を作製して同様に検討を試みる。p75NTR 分子制御とシグナル修飾を介した効率的な神経細胞分化誘導条件に関してさらなる知見が得られるよう個体解析も含め多角的に解析を継続していく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu Kouhei, Nihira Naoe Taira, Inuzuka Hiroyuki, Wei Wenyi	4. 巻 46
2. 論文標題 Physiological functions of FBW7 in cancer and metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 15~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2018.02.009	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 該当する
1. 著者名 Ci Yanpeng, Li Xiaoning, Chen Maorong, Zhong Jiateng, North Brian J., Inuzuka Hiroyuki, He Xi, Li Yu, Guo Jianping, Dai Xiangpeng	4. 巻 9
2. 論文標題 SCF ^{E3} -TRCP E3 ubiquitin ligase targets the tumor suppressor ZNRF3 for ubiquitination and degradation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein & Cell	6. 最初と最後の頁 879~889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13238-018-0510-2	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 該当する
1. 著者名 Clement Emilie, Inuzuka Hiroyuki, Nihira Naoe T., Wei Wenyi, Toker Alex	4. 巻 11
2. 論文標題 Skp2-dependent reactivation of AKT drives resistance to PI3K inhibitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 3810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aao3810	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 該当する
1. 著者名 Huang Li-Yu, Zhao Junjie, Chen Hao, Wan Lixin, Inuzuka Hiroyuki, Guo Jianping, Fu Xuhong, Zhai Yangyang, Lu Zhaoning, Wang Xuefei, Han Ze-Guang, Sun Yihong, Wei Wenyi	4. 巻 9
2. 論文標題 SCFFBW7-mediated degradation of Brg1 suppresses gastric cancer metastasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06038-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ma Ying, Cui Danrui, Xiong Xiufang, Inuzuka Hiroyuki, Wei Wenyi, Sun Yi, North Brian J., Zhao Yongchao	4. 巻 13
2. 論文標題 SCF TrCP ubiquitinates CHK1 in an AMPK dependent manner in response to glucose deprivation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 307 ~ 321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12403	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 該当する

1. 著者名 Watahiki Asami, Shimizu Kouhei, Hoshikawa Seira, Chiba Mitsuki, Kitamura Hiroshi, Egusa Hiroshi, Fukumoto Satoshi, Inuzuka Hiroyuki	4. 巻 524
2. 論文標題 Lipin-2 degradation elicits a proinflammatory gene signature in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 477 ~ 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.119	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 清水 康平、千葉 満生、犬塚 博之、福本 敏
2. 発表標題 ユビキチン-プロテアソーム経路の破綻によるMCL1安定化機構とその制御方法の検討
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星川 聖良、千葉 満生、綿引 麻美、清水 康平、犬塚 博之、福本 敏
2. 発表標題 プロテアソーム阻害剤を用いた効率的骨芽細胞分化誘導法の検討
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 綿引麻美、清水康平、瓜生英尚、星川聖良、福本敏、江草宏、犬塚博之
2. 発表標題 Lipin 2タンパク質分解を介したマクロファージ活性化調節機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Inuzuka, Kouhei Shimizu, Mitsuki Chiba, Satoshi Fukumoto, Wenyi Wei
2. 発表標題 Regulation of cell survival through post-translational modifications of MCL-1 in tumorigenesis
3. 学会等名 The Kick-off Symposium of Advanced Graduate Program for Future Medicine and Health Care (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綿引麻美、清水康平、星川聖良、千葉満生、福本敏、江草宏、犬塚博之
2. 発表標題 マクロファージの細菌性炎症応答制御におけるLipin2の役割
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	福本 敏 (Fukumoto Satoshi) (30264253)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

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	齋藤 正寛 (Saito Masahiro) (40215562)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	清水 康平 (Shimizu Kouhei) (70727073)	大阪市立大学・医学研究科・助教 (24402)	