

平成 22 年 3 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390529

研究課題名 (和文) 糖鎖生物学を応用した歯の再生への基盤的研究

研究課題名 (英文) Possible involvement of sulfation of heparan sulfate proteoglycan in tooth regeneration.

研究代表者

山城 隆 (YAMASHIRO TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70294428

研究成果の概要：

糖鎖は生体のシグナルとしてはたらくタンパク質を多彩に修飾し、その生理的機能および伝達を制御する。本研究の目的は、歯や硬組織における形態形成と分化における糖鎖の役割を明らかにすることである。ヘパラン硫酸プロテオグリカン硫酸基分解酵素である Sulf1 と Sulf2 遺伝子に注目し、その発現部位、ノックアウトマウスの表現型、また *in vitro* の解析の結果から、糖鎖の修飾が少なくとも Wnt シグナルの制御を介して、歯の形態形成と分化に関与していることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 10,900,000 | 3,270,000 | 14,170,000 |
| 2008 年度 | 4,200,000  | 1,260,000 | 5,460,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 15,100,000 | 4,530,000 | 19,630,000 |

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：糖鎖、歯、プロテオグリカン、再生、象牙質、Sulf1、Sulf2

## 1. 研究開始当初の背景

歯の再生医療は歯科における最重要課題のひとつであり、これを実現化させるための基盤として、歯の発生のメカニズムの解明は重要である。糖鎖はタンパク質が翻訳された後に付加し、生体のシグナルとしてはたらくタ

ンパク質を多彩に修飾することで、生物の多様性と複雑な器官形成を可能にしている。このような糖鎖によるタンパク質の修飾は、細胞、臓器、個体などの多様性を生み、タンパク質はゲノム情報では推定できない多くの機能を得ることが可能となる。

一方、ムコ多糖症Ⅳ型 (Hunter症候群) やムコ多糖症Ⅱ型 (Morquio症候群) の臨床症状からも、糖鎖が歯を含む硬組織の形成に重要な役割をはたすことは疑いがない。しかしながら、糖鎖の歯の形成や硬組織の分化制御における機能の詳細な検討は、未だ試みられていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖鎖が歯の形成や硬組織の分化制御においてどのような機能を果たすのかを検討することである。特に、上皮間葉相互作用における基底膜および細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンによる、シグナル分子の伝達のメカニズムに注目した。

具体的には本課題では以下の点を明らかにする。

- (1) 歯の発生における、ヘパラン硫酸6-0エンドスルファターゼであるSulf1とSulf2の発現のパターン解析
- (2) Sulf1とSulf2遺伝子の機能解析
- (3) 歯の形成において硫酸基の果たす機能的役割の解析

## 3. 研究の方法

ヘパラン硫酸 6-0 エンドスルファターゼ Sulf1 と Sulf2 の発現パターンおよび in vitro における機能解析を行う。

- (1) 遺伝子発現の解析

in situ hybridization 法を用いて 歯の発生時の Sulf1 と Sulf2 mRNA の発現パターンを明らかにする。

- (2) 遺伝子改変動物を用いた解析

Sulf1 と Sulf2 のそれぞれのノックアウトマウス、ダブルノックアウトマウスにおける歯の表現型の解析を行う。

①マイクロ CT によって、歯の構造の詳細を検討する。

②in situ hybridization によって、発現が変動する分子を検討する。

(3) 硫酸基の役割についての in vitro 解析  
①塩素酸ナトリウム(chlorate)はヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸基を加水分解する。一方、歯髄由来の MEDP 細胞は象牙質に特異的な細胞外基質である Dspp を発現する。そこで、MEDP 細胞と塩素酸ナトリウムを用いて、硫酸基の状態が Dspp の発現に果たす役割を検討する。

②細胞表面のプロテオグリカンはその硫酸基の状態によってWntタンパクとの親和性が変化する。一方、Wnt10aは象牙芽細胞に特異的に発現し、Wnt10aの強制発現はDsppを誘導することが知られている。このWnt10aによるDsppの誘導が、細胞表面のプロテオグリカンの硫酸基の状態によって変化するかを検討する。

## 4. 研究成果

(1) ヘパラン硫酸6-0エンドスルファターゼであるSulf1とSulf2は歯の発生において、エナメル上皮や歯髄細胞などに特異的に発現することを見出した。その発現分布から、その発現は上皮間葉相互作用によって制御されていることが示唆された。

(2) Sulf1とSulf2の機能的役割を検討するために遺伝子改変動物を用いて歯の表現型を解析した。

①マイクロCTによる解析の結果、Sulf1とSulf2のそれぞれのシングルノックアウトマウスは歯に表現型を示さなかったものの、ダブルノックアウトマウスは、象牙質の形成不全を起こし、更に歯根が短小である事を見出した。このことから、ヘパラン硫酸6-0エンドスルファターゼは歯の形成において歯の形態形成と象牙質の分化に関与すること、Sulf1とSulf2の間に機能的冗長性(functional

redundancy)があることが示唆された。

②Sulf1とSulf2のダブルノックアウトマウスはDsppの発現が減少していることがin situ hybridizationより明らかとなった。

(3) ヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸基が果たす役割について、歯髄由来のMEDP細胞を用いてin vitroで検討を行った。①MEDP細胞に塩素酸ナトリウム(chlorate)を添加すると細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸基が外れ、象牙質の特異的細胞基質のマーカであるDsppの発現が増加した。このことから、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸基の状態は、象牙芽細胞の基質産生に関与することが示唆された。

②MEDP細胞にWnt10aを強制発現させるとDsppの発現が誘導された。さらに、chlorateを添加するとDsppの発現が著しく増加した。また、Wnt10aは象牙芽細胞の分化に関与していることが知られている。これらのことから、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸基の状態は、Wntシグナリングを介して、象牙芽細胞の分化に関与していることが示された。これらの成果は現在、投稿中である。

## 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 6件)

1: Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. Differentiation. 2010, 79(2):74-83. 査読有り

2: Charoenchaikorn K, Yokomizo T, Rice DP, Honjo T, Matsuzaki K, Shintaku Y, Imai Y, Wakamatsu A, Takahashi S, Ito Y, Takano-Yamamoto T, Thesleff I, Yamamoto M, Yamashiro T. Runx1 is involved in the fusion of the primary and the secondary palatal shelves. Dev Biol. 2009, 15;326(2):392-402. 査読有り

3: Fukunaga T, Murakami T, Tanaka H, Miyawaki S, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Dental and craniofacial characteristics in a patient with leprechaunism treated with insulin-like growth factor-I. Angle Orthod. 2008, 78(4):745-51. 査読有り

4: Sugawara Y, Ando R, Kamioka H, Ishihara Y, Murshid SA, Hashimoto K, Kataoka N, Tsubakioka K, Kajiya F, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes. Bone. 2008, 43(1):19-24. 査読有り

5: Yamashiro T, Zheng L, Shintaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T, Thesleff I. Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. Differentiation. 2007, 75(5):452-62. 査読有り

6: Ishihara Y, Kamioka H, Honjo T, Ueda H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Hormonal, pH, and calcium regulation of connexin

43-mediated dye transfer in osteocytes in chick calvaria. J Bone Miner Res. 2008, 23(3):350-60. 査読有り

[学会発表] (計 4件)

1: Hayano S, Kurosaka H, Kalus I, Dierks T, Yamashiro T: The role heparan sulfate 6-O-endosulfatase Sulf1 and Sulf2 in tooth development. Gordon Research Conference-Craniofacial Biology-Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration, April 11-16, 2010, Lucca (Barga), Italy

2: 村田智子、川邊紀章、福島宏明、山城隆: ヒト歯髄幹細胞の性質について、第 68 回日本矯正歯科学会大会、11/16-18、2009、福岡

3: Hayano S, Kurosaka H, Kalus I, Dierks T, Yamashiro T: The role heparan sulfate 6-O-endosulfatase Sulf1 and Sulf2 in tooth development. Gordon Research Conference-Bone & Teeth, July 12-17, 2009, Biddeford, ME, USA

4: 黒坂寛、早野暁、山城隆: 歯の発生におけるヘパラン硫酸の役割について、第 67 回日本矯正歯科学会大会、9/16-18、2008、千葉

[産業財産権]

○出願状況 (計 2件)

1: 名称: 歯髄細胞から象牙芽細胞への分化誘導方法

発明者: 山城隆、黒坂寛、川邊紀章

権利者: 国立大学法人 岡山大学

産業財産権の種類: 特許権

整理番号: 特願 2009-262378 号

出願年月日: 2009/11/17

国内・国外: 両方

2: 名称: 歯または歯周組織からの幹細胞の同定・単離方法ならびに該方法により得られる幹細胞

発明者: 川邊紀章、山城隆

権利者: 国立大学法人 岡山大学

産業財産権の種類: 特許権

整理番号: PCT/JP2009/063811

出願年月日: 2009/08/04

国内・国外: 両方

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山城 隆 (YAMASHIRO TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 70294428

### (2) 研究分担者

斎藤 正寛 (SAITO MASAHIRO)

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号: 40215562

上岡 寛 (KAMIOKA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 80253219

### (3) 連携研究者

原田 英光 (HARADA HIDEMITSU)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号: 70271210