

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390466

研究課題名（和文） 歯胚形成過程における新規膜蛋白を介した細胞内外分子相互作用の解析

研究課題名（英文） Functional analysis for molecular interaction through a new member of the immunoglobulin superfamily in tooth germ development

研究代表者

坂井 英隆(SAKAI HIDETAKA)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：80136499

研究成果の概要（和文）：

マウス胎齢 10.5 日 (E10.5) 下顎に高発現する新規膜蛋白 Protogenin (Prtg) の歯胚形成における機能的役割について検討した。Prtg は E10.5 下顎で顕著に発現し、その後劇的に減弱するが、歯胚に特異的な発現を示した。Prtg の機能阻害で著明な歯胚の発育抑制が生じ、Prtg が歯胚形成において機能的役割を担うことが示唆された。また、歯胚形成初期に高発現する Pkg 1 他 の発現様式より、これらも歯胚の発生・形態形成に重要な役割を果たすことが示された。Tβ4 が、歯胚発生関連因子の発現調節によって歯胚発生初期に関わることも捉えられた。

研究成果の概要（英文）：

Protogenin (Prtg) has been identified as a gene that is highly expressed in the mouse mandible at embryonic day 10.5 (E10.5). Prtg is a new member of the deleted in colorectal carcinoma (DCC) family. This study examined the functional implications of Prtg in the developing tooth germ of the mouse lower first molar. Prtg is preferentially expressed in the early stage of organogenesis. Prtg was widely expressed in the mesenchymal and oral epithelial cells in the E10.5 mandible. The expression of Prtg after E12.0 was markedly reduced in the mandible, and was restricted to the area where the tooth bud was likely to be formed. An antisense inhibition assay for Prtg in cultured E10.5 mandibles showed a significant growth inhibition in the tooth germ. Bmp-4 expression had significantly been decreased in the mouse E10.5 mandible at 24 hr after Prtg inhibition. These results indicated that the Prtg might be related to the initial morphogenesis of the tooth germ in the mouse lower first molar.

In addition, *in situ* expression of Ifrg15, L21 and ATPase6 genes suggest that these genes participate in the initiation and the development of the tooth germ as well as those of the other craniofacial organs. Other examination results also demonstrated that Tβ4 is involved in the early stage of tooth germ development by regulation of the odontogenesis-related gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 7,500,000 | 2250,000 | 9,750,000 |
| 2009年度 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |
| 2010年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2011年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,800,000 | 4,440,000 | 19,240,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔病理学、歯の発生・再生、歯原性幹細胞、器官培養

1. 研究開始当初の背景

我々は、歯の発生初期に関わる新たな因子を同定する目的で、cDNA Subtraction 法および半定量 RT-PCR 法を用いて、歯堤形成期のマウス下顎に差別的に発現する遺伝子群の検索を行った (Yamaza *et al.*, 2001a)。同定された遺伝子は、歯胚の発生・形態形成との関与が過去に報告されていないものであった。これらの発現様式や器官培養などの検索により、同定された遺伝子が歯胚の発生から形態形成に関与していることを報告してきた (Yamaza *et al.*, 2001b; Wada *et al.*, 2002; Akter *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2007)。

胎齢 10.5 日 (E10.5) の下顎に高発現した遺伝子群の中には、当時まだ NCBI データベースに未登録の新規遺伝子も含まれていた。我々が *Clone15* と称した新規遺伝子は、アミノ酸構造解析より膜蛋白と想定された。また、歯堤形成直前の E10.5 の下顎に高発現することから、歯の発生に密接に関連するものと考えられた。

データベース改訂に伴い、この *Clone15* は、Vesque ら (2006) が報告した Mouse Potogenin (*Prtg*) と同一のものであることが判明した。彼らの報告によると、*Prtg* は主に胎生期中枢神経組織の発生と分化に関わることが示唆された。しかし、非神経系組織における *Prtg* の発現様式や機能の解析はまだ不十分であり、歯胚形成における *Prtg* の機能的役割の報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が新規膜蛋白 *Prtg* を検出・同定した経緯に基づき、歯の発生過程における発現様式と機能解析を行い、歯胚の発生・形態形成過程における *Prtg* を介した相互作用について明らかにする。また、*Prtg* と同様に同定された遺伝子の歯胚の発生・形態形成への関与を検索する。

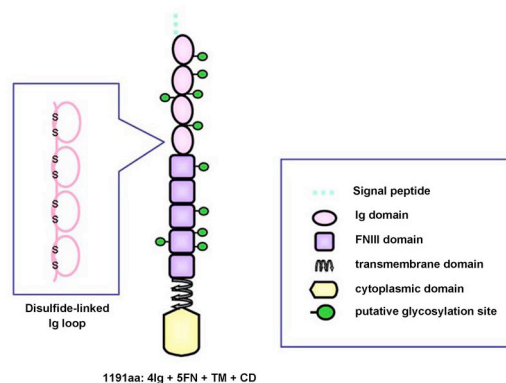
3. 研究の方法

- (1) *Prtg*-GFP 融合蛋白の細胞内局在および蛋白修飾の検索
- (2) マウス胎生期における *Prtg* の経時的発現変化
- (3) 歯胚の発生・形態形成における *Prtg* の mRNA および蛋白発現様式の検索
- (4) *Prtg* ノックダウン法による歯胚の形態形成への影響
- (5) *Prtg* 発現による細胞形質変化の検索
- (6) 歯胚の発生・形態形成におけるその他遺伝子の発現様式および歯胚の形態形成への影響の検索

- (7) 歯胚上皮・歯髓由来細胞株を用いた遺伝子の発現阻害による機能解析

4. 研究成果

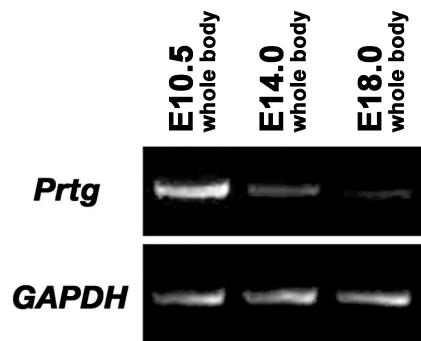
- (1) アミノ酸配列に基づいてドメイン構造解析により、シグナルペプチドによって誘導される 1 回膜貫通型の膜蛋白と想定された。GFP 融合蛋白を培養細胞に発現させると、細胞膜への局在が確認された。また Western blotting を行うと、*Prtg* 蛋白の分子量は、アミノ酸配列に基づく推定分子量を大きく上回った。そこで蛋白に酵素的脱糖鎖化を施すと、蛋白は推定分子量へ移動し、*Prtg* が高度に糖鎖修飾されていることが分かった。



Prtg の基本構造

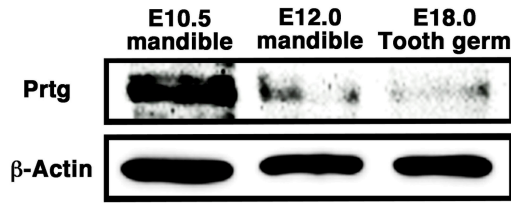
(Takahashi *et al.*, BMC Dev Biol 2010 より引用)

- (2) 胎生期における *Prtg* の mRNA および蛋白発現を検索すると、E10.5 で最も強く発現し、その後劇的に減弱していった。3, 5, 10 週齢マウスの各臓器での *Prtg* の mRNA 発現は脳において認められたが、E10.5 の発現と比較すると僅かな量であった。また、*Prtg* 発現の経時的減弱は、胎生期の下顎においても確認された。



胎生期における *Prtg* mRNA の発現

(Takahashi *et al.*, BMC Dev Biol 2010 より引用)



胎生期下顎・歯胚における Prtg の発現

(Takahashi et al., BMC Dev Biol 2010 より引用)

- (3) Prtg の組織内発現は、mRNA・蛋白ともに E10.5 で最も強く、第一鰓弓全体に認められた。その後、劇的に減弱していくものの、歯原性上皮やそれを取り巻く間葉において特異的な発現を呈した。また、間葉における Prtg の時空的発現様式は、頭部神経堤細胞の分布と類似していた。
- (4) E10.5 下顎の器官培養開始 48 時間で、Prtg の発現は 1/10 に減弱した。E10.5 下顎の器官培養下にアンチセンスオリゴ (AS S-ODN) を用いて Prtg のノックダウンアッセイを行うと、多くの歯胚が蓄状期に留まり、Prtg はエナメル器の形成において重要な機能を担っていることが示唆された。同様に器官培養を行った歯胚に Ki-67 免疫組織化学染色を施し、細胞増殖活性度を検索した。Prtg AS S-ODN 処理した歯胚とコントロール間に有意な差を認めなかったが、コントロールに認められていた歯胚上皮と歯胚周囲間葉細胞の細胞増殖活性度の有意な差が、AS S-ODN 処理群では認められなくなっていた。また、Prtg の AS S-ODN 処理した E10.5 下顎の器官培養では、Bmp4 の発現に有意な低下が認められた。
- (5) Prtg 強制発現系を扁平上皮組織由来細胞に導入して細胞の形質変化を検索したところ、石灰化誘導培地で石灰化物を形成が認められた。このことから歯原性上皮細胞の誘導の可能性が示唆された。現在、in vitro における実験を継続中である。
- (6) 上述の cDNA サブトラクション法により検出された E10.5 の下顎に高発現する遺伝子 Pgk 1 や E 12.0 に高発現する遺伝子 15 kDa interferon alpha responsive gene (Ifrg15), ribosomal protein L21 および adenosine triphosphate synthase subunit a (ATPase6) の歯胚における発現様式の解析を行った。これらの遺伝子が歯胚の発

生やエナメル質の形成に重要な役割を果たしている可能性を報告した。

また、E 12.0 に高発現する T84 の ノックダウンアッセイにより器官培養歯胚に発育抑制を認めた。その際、歯原性因子の Dspp, amelogenin, ameloblastin, Dmp1 や matrix metalloproteinase 2/9 (Mmp 2/9) の発現に有意な変化を認めた。さらにこれらの発現に関与する転写因子 type II/III Runx2 の発現にも影響がみられた。歯原性上皮細胞に T84 ノックダウンアッセイを行うと、細胞移動度の有意な低下や E-cadherin mRNA 発現上昇が認められ、歯胚発生関連因子の発現調節によって歯胚発生初期に関わる因子として T84 の役割が捉えられた。

近年、ATP 合成酵素を介した T84 の ATP 調節への関与が新たな機能として報告(Freeman et al., 2010)され、上記の各因子間の相互作用が明らかになりつつある。

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 9 件)

- ① 藤原弘明、小林家吉、清島保、永田健吾、和田裕子、大隈由紀子、塩塚真帆、木原楨子、坂井英隆、左側上顎に発生した石灰化嚢胞性歯原性腫瘍の 1 例、診断病理 査読有 28 巻 1 号 2011 pp.117-121
- ② Honda JY, Kobayashi I, Kiyoshima T, Nagata K, Wada H, Ookuma Y, Fujiwara H, Shiotsuka M, Takahashi I, Sakai H, In situ expression of the mitochondrial ATPase6 gene in the developing tooth germ of the mouse lower first molar, Journal Molecular Histology 査読有 Vol. 42 No. 1 2011 pp.83-90
- ③ Uchimaru M, Sakai T, Moroi R, Shiota S, Shibata Y, Deguchi M, Sakai H, Yamashita Y and Yoshihiro Terada Y Antimicrobial and antifungal effects of tissue conditioners containing a photocatalyst Dent Mater J 査読有 Vol. 30 No. 5 2011 pp.691-699
- ④ Kukita A, Kukita T, Nagata K, Teramachi J, Li YJ, Yoshida H, Miyamoto H, Gay S, Pessler F, Shobuike T The transcription factor FBI-1/OCZF/LRF is expressed in osteoclasts and regulates RANKL-induced osteoclast formation in vitro and in vivo. Arthritis Rheum 査

読有 Vol. 63 No. 9 2011
pp.2744-2754

- ⑤ Takahashi KF, Kiyoshima T, Kobayashi I, Xie M, Yamaza H, Fujiwara H, Ookuma Y, Nagata K, Wada H, Sakai T, Terada Y, and Sakai H Protogenin, a new member of the immunoglobulin superfamily, is implicated in the development of the mouse lower first molar BMC Dev Biol 査読有 Vol. 10 No. 115 2010
- ⑥ Akhter M, Kobayashi I, Kiyoshima T, Nagata K, Wada H, Ookuma Y, Fujiwara H, Honda JY and Sakai H In situ expression of 15 kDa interferon alpha responsive gene in the developing tooth germ of the mouse lower first molar J Mol Histol 査読有 Vol. 41 No. 4-5 2010 pp.185-191
- ⑦ Xie M, Kobayashi I, Kiyoshima T, Nagata K, Ookuma Y, Fujiwara H and Sakai H In situ expression of ribosomal protein L21 in developing tooth germ of the mouse lower first molar J Mol Histol 査読有 Vol. 40 No. 5-6 2009 pp. 361-367
- ⑧ Cheng Y, Sakai T, Moroi R, Nakagawa M, Sakai H, Ogata T and Terada Y Self-cleaning Ability of a Denture Base Material containing a Photocatalys. Dent mater J 査読有 Vol. 27 No. 2 2008 pp.179-186
- ⑨ Honda JY, Kobayashi I, Kiyoshima T, Yamaza H, Xie M, Takahashi K, Enoki N, Nagata K, Nakashima A and Sakai H Glycolytic enzyme Pfkfb3 is strongly expressed in the developing tooth germ of the mouse lower first molar Histol Histopathol 査読有 Vol. 23 No. 4 2008 pp.423-432

[学会発表] (計 19 件)

- ① 小林家吉、清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、塩塚真帆、坂井英隆 Thymosin beta 4 のノックダウンによる歯原性細胞の変化について 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 横浜
- ② 和田裕子、塩塚真帆、清島保、小林家吉、永田健吾、藤原弘明、坂井英隆 歯胚形成過程における Thymosin b-10 の役割～Thymosin b-4 との比較検討～ 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 横浜
- ③ 古庄克宏、和田裕子、清島保、小林家吉、永田健吾、藤原弘明、塩塚真帆、坂井英

隆 癌治療用アポトーシス誘導ベクターの作成と導入の試み 第 53 回歯科基礎医学学会学術大会ならびに総会 2011 年 10 月 岐阜

- ④ 藤原弘明、坂井英隆 遺伝子 X の導入による歯原性上皮細胞誘導の試み 第 88 回九大病理研究会 2011 年 12 月 福岡
- ⑤ M. Shiotsuka, H. Wada, T. Kiyoshima, I. Kobayashi, K. Nagata, H. Fujiwara, I. Takahashi and H. Sakai Expression pattern and possible function of thymosin beta-10 in developing tooth germ compared with thymosin beta-4 The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science”, 2011 年 3 月、福岡
- ⑥ Y. Ookuma, I. Kobayashi, T. Kiyoshima, K. Nagata, H. Wada, K. Nonaka and H. Sakai Functional implication of thymosin beta-4 in the morphogenesis of the tooth germ via the regulation of odontogenic gene expressions The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science” 2011 年 3 月 福岡
- ⑦ 和田裕子、清島保、小林家吉、塩塚真帆、永田健吾、大隈由紀子、藤原弘明、高橋一郎、坂井英隆 マウス歯胚形成過程における Thymosin beta 10 と Thymosin beta 4 との発現様式の比較検討 第 52 回歯科基礎医学学会学術大会、2010 年 9 月 東京
- ⑧ 塩塚真帆、和田裕子、坂井英隆 歯胚発生期から咬合完成期における thymosin b-10 発現様式と機能について -thymosin b-4 との比較検討- 第 87 回九大病理研究会 2010 年 12 月 福岡
- ⑨ Y. Ookuma, I. Kobayashi, T. Kiyoshima, K. Nagata, K. Nonaka and H. Sakai Functional implication of thymosin beta 4 on the morphogenesis of tooth germ in the mouse lower first molar The 4th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science” 2009 年 2 月 福岡
- ⑩ 清島保、小林家吉、坂井英隆 ヒト扁平上皮癌における IL-22 シグナル経路 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 京都
- ⑪ Y. Ookuma, I. Kobayashi, T.

Kiyoshima, K. Nagata, H. Fujiwara, H. Yamaza, K. Nonaka and H. Sakai Functional implication of Thymosin beta 4 in the tooth development the 88th IADR General Session 2010年7月 バルセロナ

- ⑫ 小林家吉、清島 保、永田健吾、大隈由紀子、藤原弘明、坂井英隆 歯胚形成過程における Rpl21 および Ifrg15 の発現様式について 第51回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会 2009年9月 新潟
- ⑬ 大隈由紀子、小林家吉、坂井英隆 歯胚の形態形成における Thymosin beta 4 の機能的役割について 第86回九大病理研究会 2009年12月 福岡
- ⑭ 清島保、小林家吉、坂井英隆 歯胚発生過程における膜蛋白 Protogenin の発現と歯胚発育への関与 第97回日本病理学会総会 2008年5月 金沢
- ⑮ 小林家吉、清島保、坂井英隆 歯胚発生過程における膜蛋白 Protogenin の発現と歯胚発育への関与 第97回日本病理学会総会 2008年5月 金沢
- ⑯ K. Fukiwake, T. Kiyoshima, I. Kobayashi, K. Nagata and H. Sakai Possible functions of Protogenin in the tooth development the 86th IADR/AADR 2009年7月 トロント
- ⑰ 大隈由紀子、小林家吉、清島保、吹譚景子、永田健吾、藤原弘明、野中和明、坂井英隆 歯原性細胞における Thymosin b4 を介した Matrix metalloproteinase の発現調節について 第50回歯科基礎医学会 2008年9月 東京
- ⑱ 寺町順平、久木田明子、李銀姫、永田健吾、久木田敏夫 葉酸拮抗剤による破骨細胞形成阻害はアデノシンにより解除される 第50回歯科基礎医学会 2008年9月 東京
- ⑲ 小林家吉、大隈由紀子、清島 保、永田健吾、吹譚景子、藤原弘明、Naher Lutfan、野中和明、坂井英隆 歯原性細胞の Matrix metalloproteinase 発現調節機構における Thymosinβ 4 の効果について 第49回日本組織細胞化学総会・学術集会 2008年10月 長崎

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂井 英隆 (SAKAI HIDETAKA)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：80136499

(2)研究分担者

小林 家吉 (KOBAYASHI IEYOSHI)
九州大学・歯学研究院・准教授
研究者番号：40243951

清島 保 (KIYOSHIMA TAMOTSU)
九州大学・歯学研究院・講師
研究者番号：20264054

永田 健吾 (NAGATA KENGO)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：90189134