

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09832

研究課題名（和文）脂質メディエーターを介したエナメル芽細胞の制御とその破綻による病態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism of ameloblasts by lipid mediators and the etiology due to their destruction.

研究代表者

大津 圭史（OTSU, Keishi）

岩手医科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：60509066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：成熟期エナメル芽細胞（mAB）はエナメル質の石灰化を担う。本研究ではリゾリン脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸（LPA）シグナルのmABにおける役割とその制御機構を解明することを目的とした。マウスmABではLPA受容体6（LPA6）やLPA合成酵素が強く発現するとともに、全身性LPA6KOマウスでは形態・極性の異常と嚢胞様構造物の形成、活性化型RhoA、細胞接着分子の発現低下が見られた。これらの結果からLPA-LPA6シグナルはmABにおいて細胞の形態、極性を維持することでエナメル質石灰化に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで注目されていなかった脂質の重要性に着目し、成熟期エナメル芽細胞・エナメル質石灰化との関係を明らかにした。本研究結果を基盤に今後LPA-LPA6シグナルと成熟期エナメル芽細胞、エナメル質石灰化の関係がより明らかとなれば、エナメル質形成不全の病因解明や発症リスク予想、予防のための遺伝子治療・創薬開発に向けた新たな分子ターゲットを提示することができる。エナメル質は再生しない組織であるため、その形成過程で異常を未然に防ぐことは重要である。本研究の成果をもとに早期発症リスク予測が可能となれば、重度齲蝕の早期診断・治療が可能となり、臨床分野に対しても大きな波及効果を及ぼすと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Maturation stage ameloblast (mAB) are responsible for the calcification during enamel formation. This study aims to elucidate the role and regulatory mechanisms of lysophosphatidic acid (LPA), a lysophospholipid mediator, in mABs. In mouse mABs, LPA receptor 6 (LPA6) and LPA synthesizing enzymes are strongly expressed. In systemic LPA6 knockout (KO) mice, abnormalities in morphology and polarity, formation of cyst-like structures, and reductions in active RhoA and cell adhesion molecule expression were observed. These results demonstrate that the LPA-LPA6 signaling plays a critical role in maintaining cell morphology and polarity, thereby significantly contributing to enamel calcification.

研究分野：口腔組織・発生学

キーワード：エナメル質 石灰化 脂質 LPA 細胞極性 細胞接着 エナメル芽細胞

1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮細胞は、幹細胞から増殖期・基質形成期・成熟期とダイナミックに形態的・機能的分化を遂げながら、生体で最も高度に石灰化したエナメル質を形成する。特に成熟期エナメル芽細胞は、pH 調節やミネラルの輸送、タンパクの分解吸収を行うことでエナメル質の石灰化を担う一方、その異常は低石灰型エナメル質形成不全を引き起こす。したがって、成熟期エナメル芽細胞の理解は、エナメル質石灰化機構の解明とともに、エナメル質形成不全の病因の解明、予防・診断・治療法の確立において必要不可欠であるが、その詳しい制御メカニズムは不明な点が多い。

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、細胞膜の主要成分であるリン脂質から合成されるリゾリン脂質メディエーターで、組織特異的に発現する受容体 (LPA1~6) を介し、さまざまな生理的機能を有する。哺乳類では細胞内外の複数の代謝経路で常時 LPA が産生・分解されており、その代謝異常が癌の悪性化、動脈硬化や線維症などの誘因と考えられているが、歯の発生・疾患との関連はまったく不明である。

これまでに我々は、細胞骨格制御に関与する低分子 G タンパク質 RhoA が、細胞極性・細胞骨格・細胞接着の形成を介してエナメル芽細胞の分化をコントロールすることを発見した。さらに、成熟期エナメル上皮細胞株を用いた予備実験にて、LPA が RhoA を活性化することを示唆するデータを得た。

このような背景から申請者は、「LPA シグナル が成熟期エナメル芽細胞の石灰化メカニズムを制御しているのではないか？」と問いを立てた。そしてこれを立証することで脂質代謝とエナメル質石灰化との関連性を明らかにすることができると考えた。

2. 研究の目的

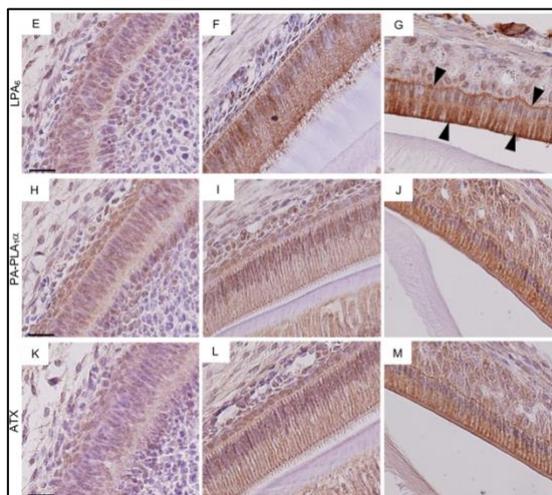
エナメル質石灰化機構の全容解明を目指し、成熟期エナメル芽細胞における LPA シグナルの役割と RhoA シグナルとの関係を解明する。そして、この破綻による成熟期エナメル芽細胞への影響とエナメル質形成不全発症との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

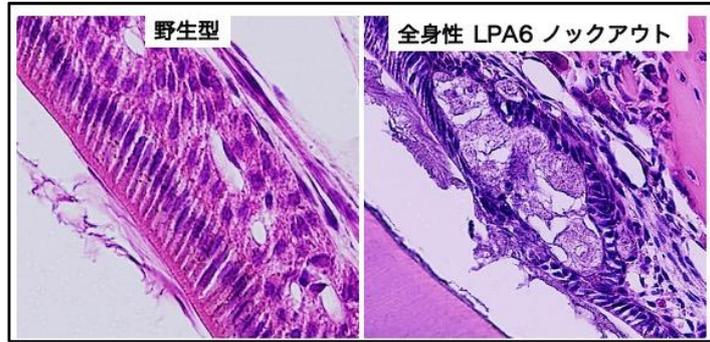
- ① マウス切歯、臼歯パラフィン切片を作成、エナメル芽細胞における、LPA 受容体、LPA 合成酵素を免疫染色にて解析し、局在の特性を明らかにする。
- ② LPA6 ノックアウトマウスにおける歯の組織解析を行い、フェノタイプを解析する。
- ③ LPA6 ノックアウトマウスのエナメル芽細胞における細胞接着因子の発現を解析する。
- ④ LPA6 ノックアウトマウスエナメル芽細胞における活性型 RhoA の発現を解析する。
- ⑤ 培養成熟期エナメル芽細胞において LPA 添加、siRNA による LPA6 阻害を行い、細胞接着、細胞骨格への影響を解析する。
- ⑥ 培養成熟期エナメル芽細胞において LPA 添加時の活性型 RhoA の発現を解析する。
- ⑦ 培養成熟期エナメル芽細胞において RhoA シグナル阻害薬添加による細胞接着、細胞骨格の影響を解析する。

4. 研究成果

- ① 野生型マウス切歯、臼歯における LPA 受容体と LPA 合成酵素 (ATX, PA-PLA1a) の発現を免疫組織化学にて解析したところ、LPA6, ATX, PA-PLA1a が成熟期エナメル芽細胞に特異的に強く発現することがわかった (右写真, G, J, M)

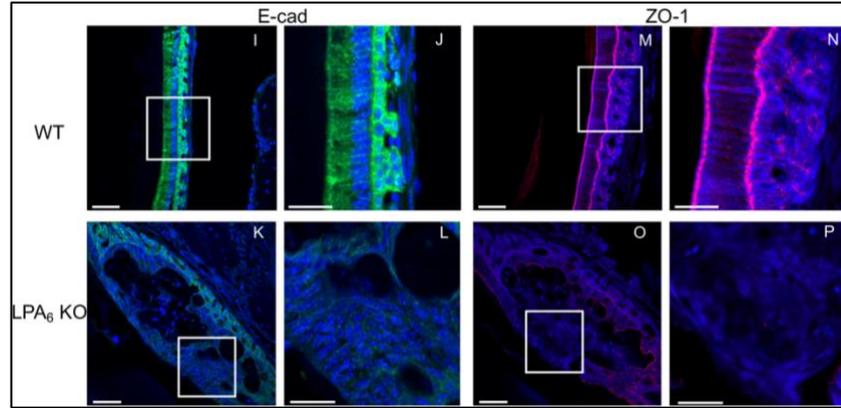


② 全身性 LPA6 ノックアウトマウスの切歯を解析したところ、成熟エナメル芽細胞で形態・極性の異常と嚢胞様構造物の形成が見られた。(右上写真)



③ 全身性 LPA6 ノックアウトマウスの切歯成熟期エナメル芽細胞で

は、細胞接着に関わる E-cadherin や ZO-1 の発現が低下していた。(右中写真)

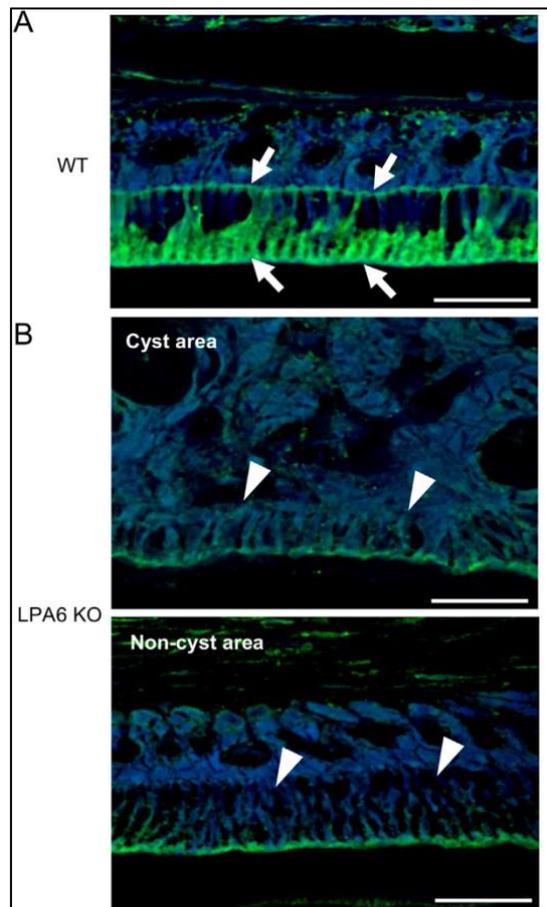


④ 全身性 LPA6 ノックアウトマウスの切歯成熟期エナメル芽細胞では、活性化型 RhoA が低下していた。(右下写真)

⑤ 培養成熟期エナメル芽細胞に LPA を添加すると、E-cadherin や ZO-1, F-actin の発現が強く誘導される一方、LPA6 siRNA の添加によってそれらの発現が抑制された。

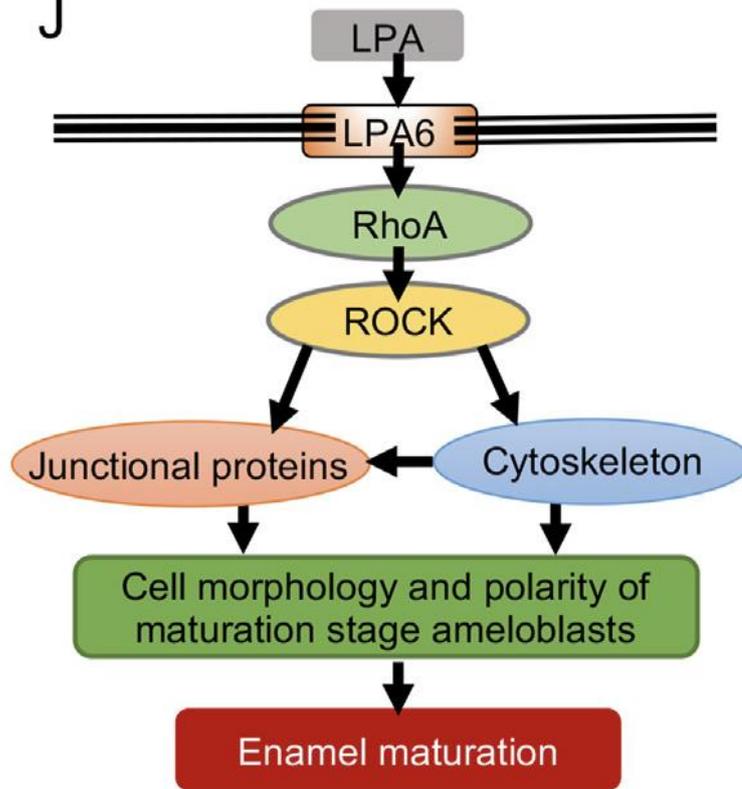
⑥ 培養成熟期エナメル芽細胞に LPA を添加すると、活性化型 RhoA の発現が誘導された。

⑦ 培養成熟期エナメル芽細胞に RhoA シグナル阻害薬 (Y27632)、アクチン重合阻害薬 (LAT-A) を添加すると、E-cadherin, Zo-1, F-actin の発現が抑制された。



以上の結果から、LPA-LPA6-RhoA シグナリングが、細胞接着およびアクチン細胞骨格の発現と安定性を通じて成熟期エナメル芽細胞の細胞形態と極性を確立するのに不可欠であることが示された(次ページ)。本研究は、エナメル質形成における脂質メディエーターの重要性を明らかにし、エナメル芽細胞、エナメル質石灰化の新たな分子制御メカニズムを提示するものである。本研究成果を基盤に今後 LPA-LPA6 シグナルと成熟期エナメル芽細胞、エナメル質石灰化の関係がより明らかとなれば、エナメル質形成不全の病因解明や発症リスク予想、予防のための遺伝子治療・創薬開発に向けた新たな分子ターゲットを提示することができる。エナメル質は再生しない組織であるため、その形成過程で異常を未然に防ぐことは重要である。本研究の成果をもとに早期発症リスク予測が可能となれば、重度齲蝕の早期診断・治療が可能となり、臨床分野に対しても大きな波及効果を及ぼすと期待できる。

J



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arai Haruno, Inaba Akira, Ikezaki Shojiro, Kumakami-Sakano Mika, Azumane Marii, Ohshima Hayato, Morikawa Kazumasa, Harada Hidemitsu, Otsu Keishi	4. 巻 13
2. 論文標題 Energy metabolic shift contributes to the phenotype modulation of maturation stage ameloblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1062042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.1062042	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 -

1. 著者名 Inaba Akira, Harada Hidemitsu, Ikezaki Shojiro, Kumakami-Sakano Mika, Arai Haruno, Azumane Marii, Ohshima Hayato, Morikawa Kazumasa, Kano Kuniyuki, Aoki Junken, Otsu Keishi	4. 巻 64
2. 論文標題 LPA6-RhoA signals regulate junctional complexes for polarity and morphology establishment of maturation stage ameloblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 85～92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2022.01.004	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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 荒井春乃, 稲葉 陽, 大津圭史, 森川和政
2. 発表標題 MIHの病因解明に向けた低酸素環境が成熟期エナメル芽細胞に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第40回日本小児歯科学会北日本地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒井春乃, 稲葉陽, 池崎晶二郎, 熊上深香, 東根まりい, 森川和政, 原田英光, 大津圭史
2. 発表標題 低酸素環境が成熟期エナメル芽細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲葉陽, 池崎晶二郎, 熊上(坂野)深香, 荒井春乃, 東根まりい, 大島勇人, 森川和政, 可野邦行, 青木淳賢, 大津圭史, 原田英光
2. 発表標題 エナメル芽細胞におけるLPA6シグナルの役割
3. 学会等名 第127回日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲葉陽, 荒井春乃, 森川和政
2. 発表標題 エナメル芽細胞におけるLPA-LPA6シグナルの機能的役割
3. 学会等名 39回日本小児歯科学会北日本地方会大会および総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲葉陽, 荒井春乃, 森川和政
2. 発表標題 成熟期エナメル芽細胞におけるLPA6シグナルの機能的役割
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大津圭史, 荒井春乃, 稲葉陽, 池崎晶二郎, 熊上-坂野深香, 東根まりい, 森川和政, 原田英光
2. 発表標題 エネルギー代謝シフトによる成熟期エナメル芽細胞フェノタイプ決定
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大津圭史, 池崎晶二郎, 後藤(松元, 奈緒美, 中西(松井)真弓, 依田浩子, 大島勇人, 原田英光
2. 発表標題 成熟期エナメル芽細胞の酸性環境構築メカニズムの解明と 破骨細胞との比較細胞学
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keishi Otsu, Shojiro Ikezaki, Hidemitsu Harada
2. 発表標題 ENVIRONMENTAL OXYGEN REGULATES DENTAL EPITHELIAL STEM CELL PROLIFERATION VIA ENERGY METABOLIC-EPIGENETICS INTERPLAY
3. 学会等名 ISSCR 2023(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keishi Otsu, Shojiro Ikezaki, Hidemitsu Harada
2. 発表標題 Impact of Hypoxia on Slow-Cycling Dental Epithelial Stem Cells: Insights into the Role of Histone Acetylation
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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	原田 英光 (HARADA Hidemitsu) (70271210)	岩手医科大学・歯学部・教授 (31201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	池崎 晶二郎 (IKEZAKI Shojiro) (00849276)	岩手医科大学・歯学部・講師 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関