

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5月1日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791768

研究課題名（和文）リン酸代謝調節の側面からみた歯の形成機構：歯の形成不全の基礎的および前臨床的研究

研究課題名（英文）Tooth morphogenesis and the regulation of phosphate homeostasis: basic and preclinical studies of tooth hypoplasia

研究代表者

吉岡 広陽 (YOSHIOKA HIROTAKA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50523411

研究成果の概要（和文）：

培養歯胚へのリン酸（Pi）負荷により発現調節される遺伝子群を DNA マイクロアレイにより網羅的に同定した。その中でも Fibromodulin 遺伝子が、培養歯胚と同様、分化エナメル芽細胞株において Pi 負荷により発現抑制し、その制御には ERK1/2-Egr-1 経路の活性化が重要であることを確認した。以上のことから、Fibromodulin は Pi 代謝異常を伴うエナメル質形成不全に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Microarray analysis identified the odontogenesis-related genes influenced by inorganic phosphate (Pi) overload. Among the genes identified by microarray analysis, fibromodulin was downregulated in an extracellular Pi level-dependent manner in both cultured tooth germs and differentiated ameloblast lineage cells. This suppression of fibromodulin gene was dependent on ERK1/2-Egr1 signaling pathway in differentiated ameloblast lineage cells. These data suggest that the fibromodulin may be involved in the etiology of enamel hypoplasia caused by hyperphosphatemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：硬組織代謝生物学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：リン酸代謝，歯牙形成，石灰化，エナメル質

1. 研究開始当初の背景

歯や骨などの硬組織においては、主に2つのIII型ナトリウム依存性リン酸(Na/Pi)トランスポーター(Pit1, Pit2)が細胞内へのリン酸(Pi)の取り込みを担っていることが報告されている。近年、我々は、ラット胎仔頭蓋冠由来細胞を用いた研究で、Pit1の発現が骨芽細胞の成熟前にピークに達し、これに呼応してPiの取り込みが増加することを明らかにした(Yoshiko et al., Mol. Cell Biol., 2007)。これは発生・分化を伴った細胞局所での精密なPi代謝調節が骨石灰化に不可欠であることを示唆している。

骨と歯の形成、とりわけ石灰化過程には共通点も多く、実際、マウス象牙芽細胞株やセメント芽細胞株を用いてPit1の象牙質・セメント質形成への関与を示した報告もある。また、我々はPit1を過剰発現するトランスジェニック(Pit1-Tg)ラットがエナメル質形成不全や象牙質の増生など石灰化に異常を認めることを報告している(2009年日本骨代謝学会など)。この歯の異常は、血清Pi濃度が正常である生後4週齢より認められることから、全身性のPi代謝ではなく、歯局所でのPit1によるPiの過剰な取り込みが歯の形成(石灰化)に影響を及ぼしていると考えられる。つまり、歯や骨において、Pit1によるPiの細胞内への取り込みは、過剰であっても不足であっても石灰化に異常を来たし、局所でのPi代謝調節の重要性が示唆される。

2. 研究の目的

近年、Piがシグナル分子として機能し、Pi代謝調節因子と協調して、歯や骨における細胞の分化や石灰化に関与していることが明らかになっている。特に、低リン血症性骨軟化症/くる病等の疾患では、骨のみでなく歯の形成異常を伴う症例も多く、全身性のPi代謝調節(血清Pi濃度の恒常性)と硬組織の石灰化との関連が詳細に検討されている。しかし、III型Na/PiトランスポーターPit1が担う局所での細胞内へのPiの取り込みが歯の石灰化(歯牙形成)に果たす役割は不明な点が多い。本研究では、Pi負荷によって変動する固有のシグナル分子を歯胚の発生・分化段階を追って網羅的に検索し、石灰化におけるPi代謝調節機構の解明を目的とする。また、新規Pi代謝調節因子および石灰化不全の治療ターゲット候補の同定に結びつける。

3. 研究の方法

(1) 正常マウス培養歯胚における細胞外Pi

濃度に対する細胞応答(遺伝子発現変動)の検索

- ① 胎生17.5日齢正常マウス胎仔から歯胚を回収し、器官培養を行う。通常の培地(コントロール群)あるいはβ-グリセロリン酸(10 mM)を添加した培地にて培養し、以下の実験に用いる。
- ② マイクロアレイ(Affymetrix社 Mouse Gene 1.0 ST Array)により発現変動する遺伝子を網羅的に解析する。
- ③ 有意な発現変動の見られた遺伝子について、リアルタイムPCRにて発現変動の再現性を確認する。
- ④ Na/Piトランスポーター阻害剤による歯胚(細胞)内へのPi取り込み阻害の影響を検討する。

(2) エナメル芽細胞株におけるPi負荷によるシグナル伝達機構の解析

- ① (1)の実験でPi負荷により発現変動の見られた遺伝子について、エナメル芽細胞株(未分化あるいは分化)へのPi負荷による発現変動を確認する。
- ② MAPキナーゼのリン酸化反応をウエスタンブロットティングにより解析する。
- ③ リアルタイムPCRによるEarly growth response gene (Egr)-1の発現応答を解析する。
- ④ MAPキナーゼ阻害剤によるシグナル抑制の影響を検討する。
- ⑤ Pi負荷によるアポトーシスや細胞生存率への影響をTUNEL染色あるいはMTTアッセイにより解析する。

4. 研究成果

- (1) 正常マウス培養歯胚における細胞外Pi濃度に対する細胞応答(遺伝子発現変動)の検索
 - ① マイクロアレイ解析から、培養歯胚へのPi負荷により発現上昇を認める遺伝子が11個、発現減少を認める遺伝子が7個同定された。
 - ② 既知の情報をもとに、歯牙形成および石灰化に関連する分子であり、small leucine-rich proteoglycanファミリーに属するFibromodulinに着目した。
 - ③ 培養歯胚へのPi負荷により、Fibromodulin遺伝子の発現が減少した。また、その作用はNa/Piトランスポーター阻害剤の添加により阻害された。
- (2) エナメル芽細胞株におけるPi負荷によるシグナル伝達機構の解析
 - ① 未分化エナメル芽細胞株へのPi負荷では、Fibromodulin遺伝子の発現変動は

- 認められなかった。
- ② 分化エナメル芽細胞株への Pi 負荷により、培養歯胚と同様、Fibromodulin 遺伝子の発現が減少することを確認した。また、この作用は Na/Pi トランスポーターおよび MEK 阻害剤により阻害された。
 - ③ 分化エナメル芽細胞株への Pi 負荷により、ERK1/2 のリン酸化および Egr-1 の発現増加が確認された。
 - ④ 分化エナメル芽細胞株への Pi 負荷によるアポトーシスおよび細胞生存率への影響は認められなかった。

以上の結果より、Fibromodulin の発現は、過剰な Pi が細胞内へ流入し、ERK1/2-Egr1 経路を活性化することにより抑制されると考えられた。また、Fibromodulin は骨ミネラル代謝異常を伴うエナメル質形成不全に関与する可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Minamizaki T, Yoshiko Y, Yoshioka H, Kozai K, Aubin JE, Maeda N. The EP4-ERK-dependent pathway stimulates osteo-adipogenic progenitor proliferation resulting in increased adipogenesis in fetal rat calvaria cell cultures. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 97: 97-102, 2012 査読有り
2. Yoshioka H, Yoshiko Y, Minamizaki T, Suzuki S, Koma Y, Nobukiyo A, Sotomaru Y, Suzuki A, Itoh M and Maeda N. Incisor enamel formation is impaired in transgenic rats overexpressing the type III NaPi transporter Slc20a1. Calcified Tissue International, 89: 192-202, 2011 査読有り
3. Yamamoto R, Minamizaki T, Yoshiko Y, Yoshioka H, Tanne S, Aubin JE, Maeda N. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}$ acts predominantly on mature osteoblastic cells under conditions of high extracellular phosphate to increase FGF23 production in vitro. Journal of Endocrinology, 206: 279-286, 2010 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

1. Yoshioka H, Yoshiko Y, Irie Y, Minamizaki T, Kato Y, Sugiyama T, Maeda N. Phosphate Regulates

Fibromodulin Expression Through the ERK Pathway in Ameloblasts. The 41st Annual Meeting of the American Association for Dental Research, Mar. 2012, Tampa, FL, USA

2. 入江泰正, 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子, 加藤幸夫, 前田憲彦. 細胞外リン酸は ERK1/2 シグナルを介してエナメル芽細胞における Fibromodulin 遺伝子の発現を抑制する. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 10 月, 岐阜
3. Konishi Y, Yoshiko Y, Minamizaki T, Yoshioka H, Maeda M, Shimizu A, Aubin J, Maeda N. MEPE-Derived Phosphorylated ASARM Is Involved in FGF23/soluble Klotho-Dependent Hypomineralization. The 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Sep. 2011, San Diego, CA, USA
4. 南崎朋子, 吉子裕二, 小西有希子, 吉岡広陽, 香西克之, 前田憲彦. FGF シグナルによる石灰化調節: FGF23-Phex 経路を中心として. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月, 大阪
5. 小西有希子, 吉子裕二, 南崎朋子, 吉岡広陽, 香西克之, 前田憲彦. MEPE 由来リン酸化 ASARM と Phex は FGF23/可溶性 Klotho による石灰化の負の調節系と関連する. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月, 大阪
6. Yoshioka H, Yoshiko Y, Minamizaki T, Suzuki A, Itoh M, Maeda N. Overexpression of the type III sodium-dependent phosphate transporter Pit1 markedly perturbs enamel formation during tooth development. The 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Oct. 2010, Toronto, Canada
7. Minamizaki T, Yoshiko Y, Konishi Y, Yoshioka H, Kozai K, Aubin JE, Maeda N. Soluble Klotho Acts as a Coactivator of FGF23 in Bone but not in Kidney to Regulate Mineralization. The 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Oct. 2010, Toronto, Canada
8. 錦織亜矢, 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋

子, 前田憲彦. III 型ナトリウム依存性リン酸トランスポーターPit1 の過剰発現は歯のエナメル質形成に影響し, 骨・ミネラル代謝異常の発症とともに増悪する. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月, 東京

9. 南崎朋子, 吉子裕二, 吉岡広陽, 前田憲彦. 可溶性 Klotho は骨における FGF23 の作用発現にリクルートされる. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, 2010 年 7 月, 東京
10. 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子, 鈴木敦詞, 伊藤光泰, 前田憲彦. III 型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター Pit1 の過剰発現は骨・ミネラル代謝に先行して歯のエナメル質形成に障害をきたす. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, 2010 年 7 月, 東京
11. 小西有希子, 吉子裕二, 南崎朋子, 北畠聖子, 吉岡広陽, 香西克之, 前田憲彦. 老化関連タンパク Klotho による骨の石灰化調節機構. 第 43 回広島大学歯学会総会, 2010 年 6 月, 広島

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/anatol/welcome.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 広陽 (YOSHIOKA HIROTAKA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50523411

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：