

## 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 6 月 15 日現在

機関番号：32710  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010 年度 ～ 2011 年度  
 課題番号：22791986  
 研究課題名（和文） 歯の発生過程におけるマスピンの役割に関する分子細胞生物学的研究  
 研究課題名（英文） Possible involvement of maspin in tooth development  
 研究代表者  
 徳山 麗子（Reiko Tokuyama）  
 鶴見大学・歯学部・助教  
 研究者番号：20380090

## 研究成果の概要（和文）：

セリンプロテアーゼインヒビターであるマスピンが歯の発生過程において、鐘状期以降のエナメル芽細胞や象牙芽細胞に発現していることが確認された。また、器官培養および細胞培養を用いた実験結果から、細胞外基質の成熟を介して歯の成熟に重要な役割を担っていることが確認された。

## 研究成果の概要（英文）：

Maspin, serine protease inhibitor, expressed in ameloblasts and odontoblasts at early bell stage plays an important physiological role in tooth development through the regulation of matrix formation in dental tissues.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般、マスピン、セリンプロテアーゼインヒビター、歯の再生

## 1. 研究開始当初の背景

現在日本は高齢社会を迎え、再生医療は最も注目される研究分野であり、その中でも歯の再生医療は強く望まれる分野の一つである。再生医療の実現に向けて、細胞源として ES 細胞、iPS 細胞、骨髄間質由来多能性幹細胞などが注目され、実用化に向けて着々と研究は進んでいる。歯の再生医療においても進歩はみられるものの未だ完全な歯の再生はなされていない。歯の再生医療実現のためには、その発生過程における分子機構を解明することが必要不可欠と考えられるが、未だ未解明である。

歯の発生過程においては、複雑かつ特殊な細胞外基質の産生・分泌とその石灰化が必須である。歯胚の形成・成熟においては多くの遺伝子発現とそれに伴う蛋白質および蛋白質分解酵素の相互作用が必須であり、これらが歯の形態形成を完全なものとする。特に鐘状期にはエナメル芽細胞、象牙芽細胞への最終的な分化が起こる。すなわち、内エナメル上皮細胞の成熟が進むと、TGF-beta(transforming growth factor-beta)、BMP-2(bone morphogenic protein-2)、IGF(insulin-like growth factor)などの蛋白質による分化誘導を介して歯乳頭でも象牙芽細胞の分化が進む。象牙

芽細胞が分化すると、I型コラーゲンやDSPP(dentin sialophosphoprotein)、DMP-1(dentin matrix protein-1)などの象牙質の有機性基質が産生され、内エナメル上皮細胞からはエナメル芽細胞が最終分化し、アメロジェニン、アメロプラスチン、エナメルリンなどのエナメル蛋白を分泌する。先に述べた増殖因子などと共に、象牙質を形成する基質蛋白、エナメル質を形成する基質蛋白が、相互に上皮-間葉間のシグナル伝達を果たし歯胚の成熟が進行する。このように分化しつつある象牙芽細胞は分化しつつあるエナメル芽細胞から、また逆も同様に、相互に分化を誘導し合うのである。この際、多くの蛋白及びその分解酵素が正常な相互分化誘導に必須であると考えられる。これらの蛋白の産生・分泌・蓄積は歯の発生・成熟過程において厳密に制御され、これらが正常に起こるためにはそれぞれの遺伝子の発現とそれに伴う蛋白及びその分解酵素の複雑かつ正常な発現が必須となる。しかしこれらシグナル分子制御機構については未だ不明な点が多く、今後歯の再生医療を目指す上で詳細な解明が待たれるところである。

このように歯の発生過程においては、複雑な細胞外基質の産生・分泌・蓄積のため、蛋白と共に蛋白分解酵素、さらにそのインヒビターが重要な役割を果たしていると考えられる。現在までにKLK4(kallikrein-related peptidase 4)、EMSP-1(enamel matrix serine protease-1)、uPA(urokinase-type plasminogen activator)などのセリンプロテアーゼが見出され、歯原性細胞の細胞外基質の制御に必須であると報告されている。これらセリンプロテアーゼを制御すべきセリンプロテアーゼインヒビターもまた必要であると考えられるがその報告はほとんどなされていない。一方、われわれはこれまでに、42kDaのセリンプロテアーゼインヒビターであるマスピンが、潜在型 TGF- $\beta$  の細胞外基質への蓄積を介して骨形成過程において重要な役割を果たしている可能性を報告してきた (J Bone Miner Res: 22: 1581-91, 2007)。マスピンは多くの正常組織に発現が確認されており、腫瘍抑制作用と血管新生抑制作用を持ち、これは PA の制御を介して発現していると考えられている。これら TGF- $\beta$  や PA、さらに KLK4、EMSP-1 はエナメル質、象牙質、セメント質、骨などに発現し、歯の発生過程に関与していると報告されている。そこで、これらを制御する可能性がある分子としてセリンプロテアーゼインヒビター、特にマスピンに着目し、歯の発生過程における歯原性細胞の細胞外基質の蓄積及び分解を制御している可能性について検討したところ、予備的実験結果

ながら、歯原性細胞がマスピンを発現していること、また、歯胚の器官培養において、マスピン蛋白を機能抑制すると歯胚の成熟が正常に行われず、歯原性細胞の細胞外基質の形成が阻害されることをこれまで確認している。このことから、マスピン蛋白が歯の発生・成熟過程に深く関与している可能性が高く、本研究を遂行することでマスピン蛋白の歯の発生における生理的役割が解明されれば、今後歯の再生医療に向けた基礎的データの蓄積につながり、高齢社会を迎えますます需要が高まるであろう歯の再生医療に大きく貢献しうると考え、研究を進めた。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、歯の発生に関与していると報告されているセリンプロテアーゼを制御する可能性がある分子として、セリンプロテアーゼインヒビターであるマスピンに着目し、歯の発生過程における歯原性細胞の細胞外基質の蓄積および分解を制御している可能性について検討することを目的とした。歯におけるマスピンの発現、特に歯原性細胞におけるマスピンの発現パターンを免疫組織学的にさらに詳細に検討するとともに、分子生物学的手法を用いてその生理的意義を明らかにすることを試みた。歯の発生過程において形成された歯原性細胞の細胞外基質はそれぞれが相互に影響し合い、産生・分泌・蓄積され、石灰化される。これらの過程は厳密に制御され、それぞれの相互誘導により成立している。この過程で、過剰なタンパク質の合成や分解は、相互のシグナル分子機構に齟齬を来すことからプロテアーゼに対するインヒビターによるマトリックスの分解制御が必須であると考えられる。本研究では、歯の発生・成熟過程における健全性維持機構に関して、セリンプロテアーゼインヒビター、とくにマスピンの役割に着目した全く新しい研究と考えられ、マスピンが歯の発生・成熟過程重要な役割を担っていることが確認されれば、歯の発生過程における分子間相互作用の新たな解明につながるばかりでなく、まさに需要の高まる歯の再生医療の実現するための一助となり得る成果を出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、歯の発生・成熟過程におけるマスピンの役割を明らかにすること目的に、歯の発生過程におけるマスピンの発現、特に歯原性細胞におけるマスピンの発現パター

ンを免疫組織化学的に詳細に検討するとともに、分子生物学的手法を用いてその生理的意義を明らかにすることを試みた。そのために、①ラット鐘状期歯胚を対象として、器官培養を行い、マスピンタンパク質を中和抗体により機能阻害することで、歯胚の成熟に対する影響を検討し、②このとき歯原性細胞の細胞外基質の産生・分泌・蓄積・分解がどのように影響されているのか、免疫組織学的に検討した。さらにこれを *in vitro* でも詳細に検討するために③歯原性細胞を用いてマスピンタンパク質の阻害が細胞外基質の産生・分泌・蓄積に与える影響を検討した。さらにその増殖や細胞形態についても観察し、マスピンタンパク質の歯の発生過程における生理的意義を明らかに使用とした。具体的には、まず、歯におけるマスピンの発現の検討するために、ラット3日齢下顎骨を用いて歯、とくに歯原性細胞におけるマスピンの発現につき、免疫組織化学的手法により解析した。また、ラット胎生20日齢の歯胚についても同様に解析を行った。さらに、歯原性上皮細胞株を用いてRT-PCR法によりマスピン遺伝子を、免疫細胞化学的手法およびウエスタンブロット法によりマスピン蛋白質の発現を検討した。次に、マスピン蛋白質の機能阻害が歯胚の器官培養に及ぼす影響につき検討した。胎生20日齢ラットの下顎骨を摘出し、そこから第一及び第二大臼歯を摘出し、器官培養 (*organ culture*) を行い、その際マスピンに特異的な中和抗体を培養液に加えることでマスピン蛋白質の機能を阻害した。この歯胚の経時的変化を組織学的に観察することで、マスピンの機能阻害が歯胚の成熟過程に及ぼす影響について検討し明らかにした。さらに、器官培養歯胚における細胞外基質の状態を検討するため、器官培養を行ったサンプルを用いて、組織学的変化の現れる時期の実際の歯胚の細胞外基質の状態について免疫組織学的に検討した。具体的には象牙芽細胞が分泌し蓄積されるべきI型コラーゲン、DSPP、DMP-1など、また、エナメル芽細胞が分泌し蓄積されるべきアメロジェニン、アメロブラスチン、エナメルリンなどの蛋白質の歯原性細胞周囲への蓄積の有無、破壊・吸収の有無などを特異的抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。また、マスピン蛋白質の機能阻害が歯原性細胞株の増殖・分化に及ぼす影響についても検討を行った。*in vitro* におけるマスピンの影響を検討するため、歯原性細胞株を用いて培養を行う際に、マスピンに特異的な中和抗体を培養液に加えることでマスピン蛋白質の機能を阻害し、培養したときDSPP、DMP-1、アメロジェニン、アメロブラスチン、エナメルリンなどの歯原性細胞関連蛋白質の発現について検討した。

#### 4. 研究成果

まず、免疫組織学的検討により、ラット歯胚の雷状期、帽状期、鐘状期前期、後期、歯冠形成期、歯根形成期のそれぞれにおけるマスピンの発現について検討したところ、雷状期、帽状期においてはマスピンの発現は確認されなかったが、歯原性細胞が分化し細胞外基質分泌が活発となる鐘状期前期から、エナメル芽細胞、象牙芽細胞を含む各種歯原性細胞にマスピンの発現が認められるようになった。さらに、21日齢のラット鐘状期歯胚を用いて器官培養を行い、このときマスピン中和抗体を添加しマスピンタンパク質の機能を阻害したところ、コントロールに比較して、経時的に歯原性細胞における細胞外基質の蓄積が阻害され、正常な象牙質、エナメル質の形成が遅延または阻害された。さらに *in vitro* において、歯乳頭由来細胞を用いて、その培養過程において、マスピンの中和抗体を添加し、マスピンタンパク質の機能を阻害したところ、細胞の増殖期においてはマスピン中和抗体の濃度依存的に細胞増殖は阻害された。さらに分化期においてもマスピン中和抗体添加群ではコントロール群に比較して歯原性細胞の分化マーカーであるDSPPおよびDMP1の発現が遅延する傾向が認められた。これらのことから、マスピンは歯の成熟過程において必須であり、その細胞外基質の成熟に重要な役割を果たしていることが確認できた。

#### 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 1 件)

Purevsuren Davaadorj, Reiko Tokuyama, et al.: Possible involvement of maspin in tooth development. *Histochemistry and Cell Biology* 134:603-614, 2010.

[学会発表] (計 2 件)

①徳山麗子、他：骨の成熟過程および関節軟骨恒常性維持に関与しているマスピンは歯の発生過程にも関与している。第55回日本口腔外科学会総会・学術大会。2010年10月17日。幕張、千葉。

②Reiko Tokuyama, et al.: Maspin, a serine protease inhibitor, is involved tooth development. 88<sup>th</sup> General session & Exhibition of the IADR. 2010年7月17日。Barcelona, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳山 麗子 ( Reiko Tokuyama )

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20380090

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし