

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21021

研究課題名（和文）エネルギー代謝シフトによる成熟期エナメル芽細胞RA-SAサイクル制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of the RA-SA cycle in maturation stage ameloblasts by energy metabolic shift

研究代表者

稲葉 陽（INABA, Akira）

岩手医科大学・歯学部・常任研究員

研究者番号：00963365

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：成熟期エナメル芽細胞は、波上縁構造をもつ細胞集団(RA)と持たない集団(SA)が周期的に出現し(RA-SA サイクル)エナメル質の石灰化を行う。本研究ではRA-SAサイクルとエネルギー代謝の関係を解明するとともに、この破綻によるエナメル質石灰化への影響を明らかにした。マウス切歯の解析からRAは酸化的リン酸化優位でありSAでは解糖系優位にシフトすることがわかった。成熟期エナメル芽細胞を解糖系優位のエネルギー代謝状態にシフトさせるとエナメル質石灰化能が低下することから、エネルギー代謝状態のシフトがRAとSAのフェノタイプを変化させることでエナメル質石灰化の調節に関与し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

本研究の成果は、成熟期エナメル芽細胞の「RA-SAサイクル制御機構」というこれまで全く手付かずであった難問に対し、解決の手がかりを与えると同時に、「エネルギー代謝によるエナメル質石灰化制御」という新たな研究領域を確立・進展し、今後のエナメル質研究の新機軸になると期待できる。エナメル質は再生しない組織であるため、その異常を未然に防ぐことは重要である。本研究の成果を基盤としてエナメル質形成不全の病因解明、新たな診断・予防・治療法のための分子ターゲットが示され、早期発症リスク予測が行えるようになれば、早期介入、オーダーメイド医療の実現が可能となり、社会に対して大きな波及効果を及ぼすと期待できる。

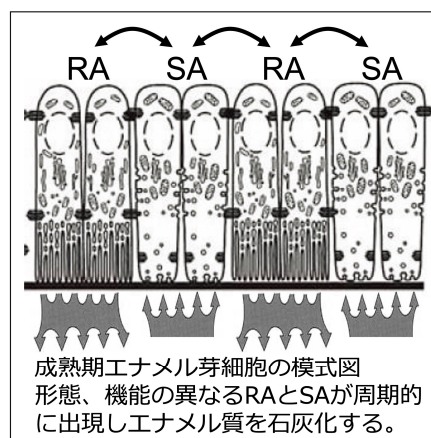
研究成果の概要（英文）：Maturation stage ameloblasts (MAs) are divided into two groups: ruffle-ended ameloblasts (RA) and smooth-ended ameloblasts (SA). These groups appear alternately in cycles (RA-SA cycle) and perform the calcification of enamel. This study elucidates the relationship between the RA-SA cycle and energy metabolism, as well as the effects of the disruption of this cycle on enamel calcification. Analysis of mouse incisors showed that RA is dominated by oxidative phosphorylation, while SA shifts towards a glycolytic dominance. Shifting MAs into a glycolysis-dominant energy metabolism state reduces their enamel calcification capability, indicating that the shift in energy metabolism state alters the phenotype of RA and SA, thereby playing a role in regulating enamel calcification.

研究分野：小児歯科学

キーワード：エナメル質 石灰化 エネルギー代謝 成熟期エナメル芽細胞 エナメル芽細胞 低酸素 酸化的リン酸化 解糖系

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、RA と SA が周期的に交互に出現して、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石灰化を担う一方、その破綻は低石灰化型エナメル質形成不全を引き起こす(右図)。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、低石灰化型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。



成熟期エナメル芽細胞の模式図
形態、機能の異なるRAとSAが周期的に出現しエナメル質を石灰化する。

RA と SA ではカルシウム輸送に関わるイオンチャンネル/トランスポーターやタイトジャンクションなどが異なった局在を示し、RA がエナメル質への積極的なカルシウムの輸送を促すのに対し、SA はタンパクの断片や水分を受動的に通過させる役割を担う。しかし、この成熟期エナメル芽細胞 RA と SA の周期的な出現を制御するメカニズムはほとんどわかっていない。

これまで申請者は、1) 生理活性リン脂質 リゾフォスファチジン酸 (LPA) シグナルが、成熟期エナメル芽細胞の細胞形態や極性を制御していること、2) RA と SA では、LPA 合成酵素タンパクの産生量が異なることを明らかにした (J.Oral Biosci. 2021)。さらにその後の研究から、3) RA と SA ではエネルギー代謝状態が異な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、「成熟期エナメル芽細胞における RA-SA の周期的な出現は、エネルギー代謝シフトによって制御されているのでは？」そして、「そのエネルギー代謝シフトは周囲の酸素環境の影響を受けるのではないか？」と問いを立てた。

2. 研究の目的

エナメル質形成不全の病因解明に向け、成熟期エナメル芽細胞 RA と SA の周期的出現とエネルギー代謝の関係を解明するとともに、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。

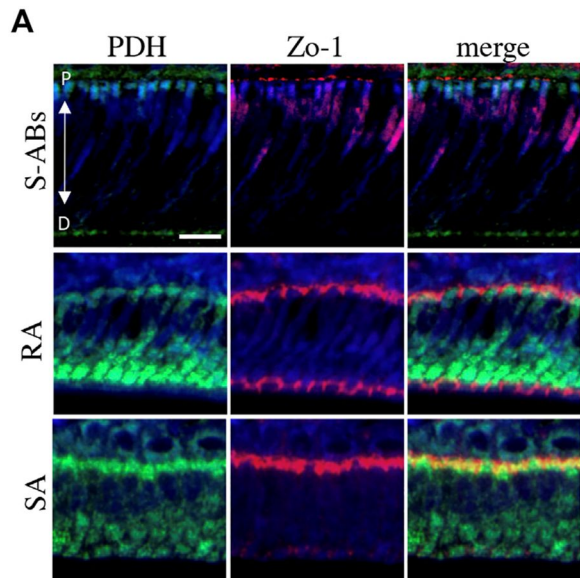
3. 研究の方法

- (1) マウス切歯パラフィン切片を作成し、RA, SA における、石灰化マーカー(ALP), 解糖系、酸化的リン酸化マーカーの発現を免疫染色にて解析し、RA と SA のエネルギー代謝特性を明らかにする。
- (2) ラット切歯の電子顕微鏡観察にて RA と SA における cytochrome oxidase(CO)陽性ミトコンドリア(酸化的リン酸化の活性が強いミトコンドリア)の局在の違いを明らかにする。
- (3) 培養成熟期エナメル芽細胞において解糖系、酸化的リン酸化マーカーの発現と石灰化マーカーの発現を解析し、局在の特性を明らかにする。
- (4) 培養成熟期エナメル芽細胞を低酸素(5%)で24h培養し、解糖系、酸化的リン酸化マーカーの発現を免疫組織、qPCRで解析、酸素濃度がエネルギー代謝状態をどう変化させるかを明らかにする。
- (5) 培養成熟期エナメル芽細胞を低酸素で培養してミトコンドリアの形態、膜電位の変化を調べ、酸素濃度とミトコンドリア機能との関係を明らかにする。
- (6) 培養成熟期エナメル芽細胞カルシウム輸送アッセイを低酸素環境下で行い、成熟期エナメル芽細胞のカルシウム輸送能に対する低酸素の影響を解析する。

- (7) 培養成熟期エナメル芽細胞を低酸素で培養し、カルシウム輸送にかかわるイオンチャンネル、トランスポーター、細胞バリア関連遺伝子の発現変化を明らかにする。
- (8) 培養成熟期エナメル芽細胞を低酸素で培養して石灰化マーカー（ALP，アリザリンレッド）の染色を行い、エナメル質石灰化への影響を明らかにする。
- (9) 酸化リン酸の阻害薬(UK5099)を培養成熟期エナメル芽細胞に作用させることで解糖系優位のエネルギー代謝状態に誘導し、エナメル質石灰化への影響を明らかにする。

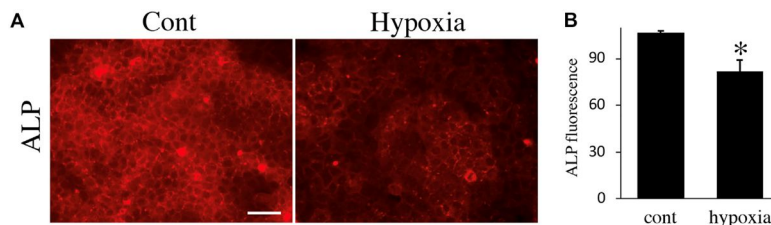
4. 研究成果

- (1) マウス切歯成熟期エナメル芽細胞では、RAにおいて酸化リン酸マーカー(PDH、右図)や石灰化マーカー(ALP)が強く発現する一方、SAでは解糖系マーカー(p-PDH, LDH)などが強く発現しALPの発現は低かった、このことから、RAは酸化リン酸優位のエネルギー代謝状態で、エナメル質石灰化に積極的に寄与している一方で、SAは解糖系優位のエネルギー代謝状態で、石灰化への関与は低いことがわかった。

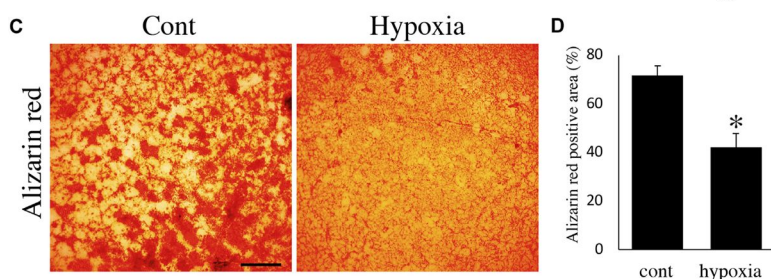


- (2) ラット切歯の顕微鏡観察(TEM)から、酸化リン酸の活性が強いCO陽性のミトコンドリアはSAにくらべRAで多く見られることからRAはより酸化リン酸優位のエネルギー代謝状態であることがわかった。
- (3) 培養成熟期エナメル芽細胞では酸化リン酸マーカーPDHと石灰化マーカーALPの発現が共局在することから、培養細胞でも酸化リン酸優位の細胞が強い石灰化能を発揮することがわかった。
- (4) 培養成熟期エナメル芽細胞を低酸素(5%)で24h培養すると解糖系マーカーの発現上昇がmRNA、タンパクレベル双方で見られる一方、酸化リン酸マーカーの発現、ATP産生が減少した。このことから低酸素は成熟期エナメル芽細胞をSA(解糖系優位のエネルギー代謝状態)に誘導することがわかった。
- (5) 培養成熟期エナメル芽細胞を低酸素で培養すると、ミトコンドリアの膜電位が減少するとともに、球形であった形態がチューブ状に変化した。このことは低酸素によってミトコンドリアの機能(酸化リン酸)が低下することを示していた。
- (6) 培養成熟期エナメル芽細胞カルシウム輸送アッセイを行ったところ、低酸素(SAに誘導)は成熟期エナメル芽細胞のカルシウム輸送能を低下させた。このことはSAがエナメル質の石灰化への寄与が低いことと矛盾のない結果であった。
- (7) また、培養成熟期エナメル芽細胞を低酸素培養すると、カルシウム輸送にかかわるイオンチャンネル、トランスポーター、細胞バリア関連遺伝子の発現が低下した。これらのことはSAがエナメル質の石灰化への寄与が低いことを指示する結果であった。

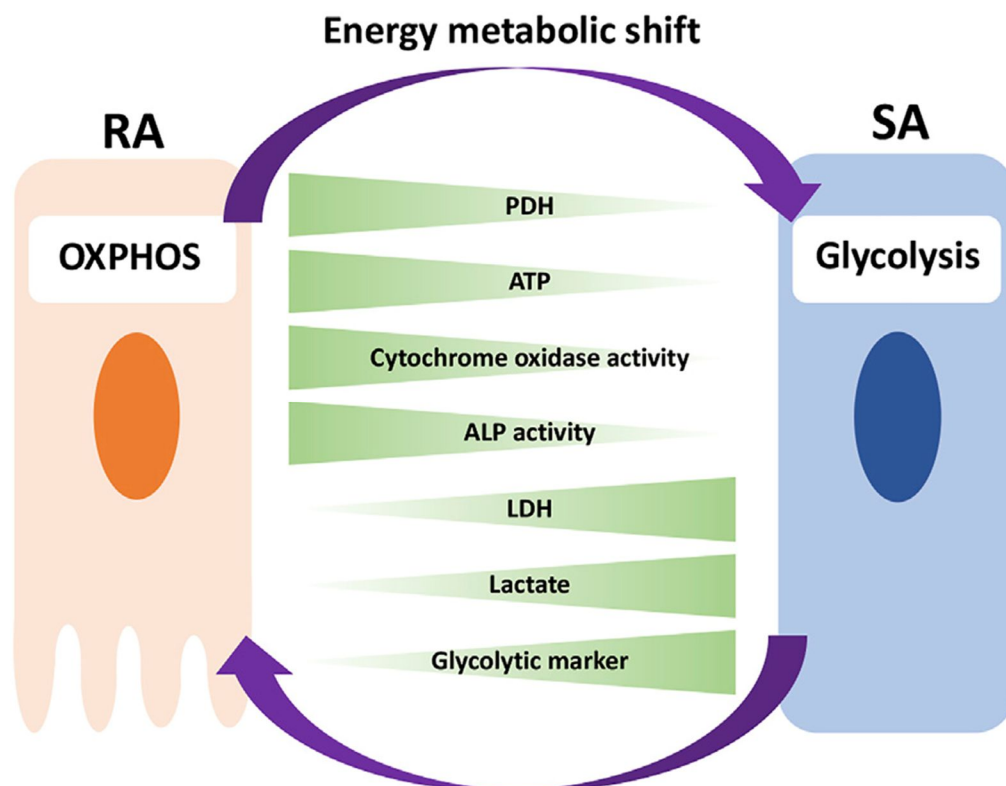
(8) 低酸素による SA への誘導は石灰化マーカー (ALP, アリザリンレッド) の発現を低下させた(右図)。



(9) 酸化リン酸化の阻害薬 (UK5099) は解糖系マーカーの発現を上昇させ、石灰化マーカーの発現を減少させた。



以上の結果から、エネルギー代謝状態が成熟期エナメル芽細胞の RA/SA フェノタイプを決定する重要な要因であることが示された(下図)。本研究は、エネルギー代謝が成熟期エナメル芽細胞を制御する生物学的重要性を明らかにし、エナメル質の石灰化を理解するための新たな分子基盤を提供してエナメル質低石灰化の病態の解明に寄与すると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0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 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 Keishi Otsu, Shojiro Ikezaki, Hidenitsu 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

1. 発表者名 Keishi Otsu, Shojiro Ikezaki, Hidenitsu 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

〔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

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