

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593033

研究課題名(和文) 歯原性間葉細胞の分化制御機構についての研究

研究課題名(英文) Study for regulating mechanism of mesenchymal cells differentiation

研究代表者

釜崎 陽子 (Kamasaki, Yoko)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30253678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯原性間葉細胞における糖脂質と神経栄養因子NT-4の相互作用について研究を行った。GM3やLacCer等の糖脂質は、細胞増殖を抑制すること、その増殖能はNT-4をGM3との共存下で抑制されることを示した。また、NT-4は、DSPPの発現を増強させること、この発現レベルはGM3またはLacCerとの共存下により増強されることを示した。このことは、NT-4の、細胞膜上のGM3やLacCerなどの糖脂質との相互作用による細胞分化への関与を示唆していた。また、NT-4の受容体TrkBの発現を免疫組織学的に検索したところ、短縮型ではなく全長型のTrkBがメインに発現していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the interactions of glycosphingolipids (GSLs) and neurotrophin 4 (NT-4) in the mouse mesenchymal cells.

We showed that exogenously added GM3 (monosialoganglioside) and LacCer (lactosylceramide) suppressed the proliferation of mouse mesenchymal cells by BrdU incorporation assay, and that dental mesenchymal cell proliferation activities were significantly disturbed when NT-4 was added to the culture medium with GM3. We revealed that NT-4 increased expression of DSPP in the mouse mesenchymal cells by RT-PCR and those expression levels were enhanced when NT-4 was added to the culture medium with GM3 or LacCer. These results suggested that NT-4 might cooperate with GSLs on cell surface and regulate the differentiation. We examined the expression patterns of TrkB (TrkB can exist as alternatively truncated TrkB splice variants) on mouse mesenchymal cells by immunohistochemistry, and revealed that full-length TrkB were expressed, while truncated TrkB were absent.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正小児歯科学

キーワード：糖脂質 GM3 LacCer 神経栄養因子NT-4 歯原性間葉細胞 DSPP

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、歯の発生分化における糖鎖の関与について機能解析を行う中で、糖脂質合成酵素遺伝子の一つであるGD3合成酵素遺伝子がエナメル芽細胞の分化過程における初期の上皮部分に特異的に発現し、分化したエナメル芽細胞ではその発現が消失することを確認した (Arch Oral Biol.50:393-399.2005.)。また、GD3合成酵素遺伝子発現の消失の結果、分化したエナメル芽細胞 (invitroでは、Bell stageから分化期歯胚) にはGM3(GD3の前駆糖脂質) が主に発現し、この糖脂質GM3それ自身は、歯原性上皮細胞の増殖を抑制し、アメロラスチン、エナメルリン、DSPPなど歯の発生に特異的な遺伝子の発現を誘導する作用すなわち分化誘導能をもつこと、さらに神経成長因子ファミリーの一つであるNT-4のシグナル伝達を増強することによって、アメロラスチン発現をより強く誘導することを示し、誌上発表した (J DENT RES 2012 91: 78-83)。

歯の形態発生には、上皮-間葉組織境 (後のエナメル象牙境) という歯に特異的なパターン形成が見られるが、我々は、糖脂質 GM3のエナメル芽細胞と接した機能象牙芽細胞における発現を確認していることから、GM3は、上皮間葉相互作用において何らかの役割を果たしていると推測している。また、発生初期の上皮部分に特異的に発現している神経栄養因子NT-4についても、その受容体TrkBが歯原性間葉細胞での発現していることを確認している。そのため、象牙芽細胞に分化する歯原性間葉細胞 (マウス由来) を用いてGM3およびNT-4の機能解析を行なうことによって、歯の発生分化のメカニズムについての新たな情報が得られると考えている。

## 2. 研究の目的

マウス由来歯原性間葉細胞を用いて糖脂質GM3および神経栄養因子NT-4の機能を解析することを目的とする。

NT-4は、歯胚の上皮部分での強い発現が知られているが、p3マウス歯胚では上皮部分で強く、間葉部分では弱い発現がみられ、cell lineにおいては、上皮細胞でも間葉細胞でも強い発現を示している。一方でレセプターも細胞内チロシンキナーゼドメインを有する全長型のTrkB-FLの発現を認めており、NT-4-TrkB-MAPKを介したシグナル伝達経路がアメロラスチンの発現およびエナメル芽細胞の分化誘導に非常に重要であることが報告されている

(吉崎、福本他 J Biol Chem.283:3385-3391.2008.)。しかしながら、歯原性間葉細胞におけるNT-4の機能解析は行なわれておらず、現時点でNT-4は、上皮細胞においてオートクライン様式で作用していることが示唆されている。本研究では、NT-4が、発生中の歯胚形成初期において、上皮と間葉系細胞との間でパラクライン様式で作用しているのではないかと、この仮説のもとに、NT-4の歯原性間葉細胞における機能解析を行なうこととする。

## 3. 研究の方法

NT-4ノックアウトマウスの歯の硬組織観察  
連携研究者福本教授よりNT-4ノックアウトマウスの顎骨の提供を受け、NT-4 KOマウス、wild typeマウスそれぞれの顎骨より切歯および臼歯を抜歯し、実態顕微鏡で全体の大きさ、色調などの観察を行った後、エポキシ包埋し、断面を露出させ、37%リン酸で表層を一層エッチングした後、通法に従い、金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察を行った。

歯原性間葉細胞における糖脂質GM3およびNT-4レセプターTrkB-FL、TrkB-T1の免疫染色による局在観察。  
細胞は、4%PFA中で20分、0.5%triton含有4%PFA中で5分固定後、洗浄およびブロッキングを行った。一次抗体としてそれぞれC15/sc-139(rabbit, Santa Cruz), C13/sc-119,( rabbit, Santa Cruz), M2590 (mouse 日本バイオテスト研究所)、二次抗体としてそれぞれ、Alexa546-labelled-goat anti-rabbit IgG(invitrogen) and Alexa488-labelled goat anti-mouseIgG抗体(invitrogen)を用い、Axiovert 200 (Carl Zeiss) にて観察した。

GM3およびNT-4の細胞増殖に及ぼす影響-BrdU取り込み試験

5-bromo-2'-deoxyuridine labeling and detection kit (Roche)を用いて BrdU 取り込み試験を行なった。核の染色には DAPI を用い、蛍光顕微鏡 Axiovert 200 (Carl Zeiss) にて観察を行なった。核染色により総細胞数とし、総細胞数における増殖期細胞 (BrdU を取り込み FITC 標識される) の割合をもって増殖率とした。

GM3 および NT-4 の細胞分化に及ぼす影響—RT-PCR

実験処理を施した歯原性間葉細胞から RNA を TRIzol 法にて抽出し、スーパースク립ト II を用いて cDNA を作製した。象牙質特異的な象牙質シアロリントタンパク (DSPP) および NT-4 レセプター TrkB-FL, TrkB-T1 の遺伝子発現の解析を行った。

#### 4. 研究成果

NT-4 ノックアウトマウスの歯の硬組織観察

Fig.1: 実態顕微鏡観察結果

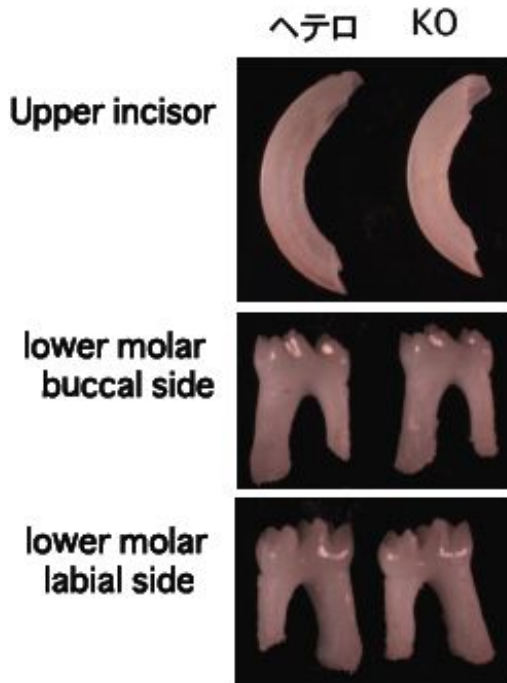
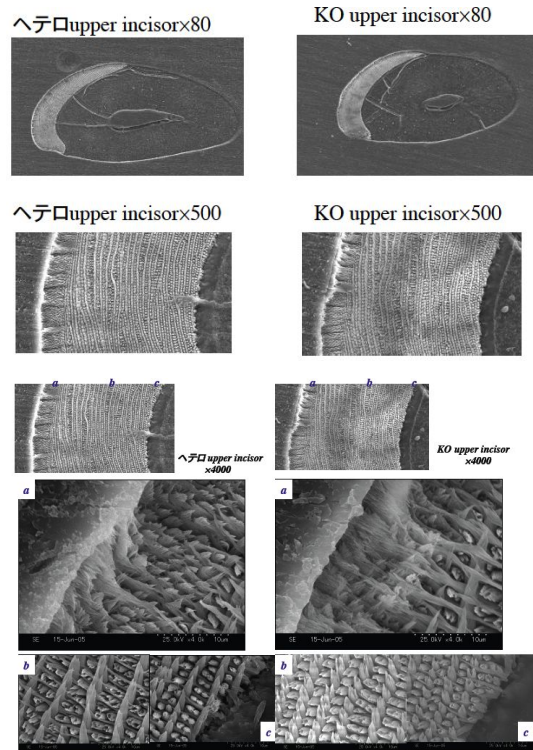
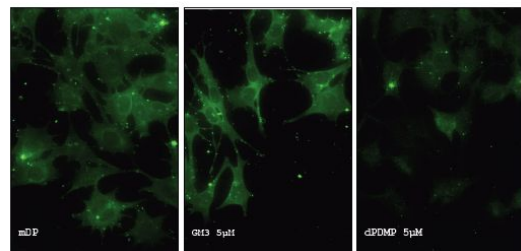


Fig.2: 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察結果



実態顕微鏡による NT-4 KO マウス, wild type マウスの切歯および臼歯の観察では, NT-4 KO マウスの切歯及び臼歯でやや小さい傾向を認めたが, 質, 色調等に有意な差を認めなかった. また SRM 観察によっても NT-4 KO マウスの切歯及び臼歯でやや小さい傾向を認めたが, エナメル質, エナメル象牙境, 象牙質のいずれにも有意な差を認めなかった.

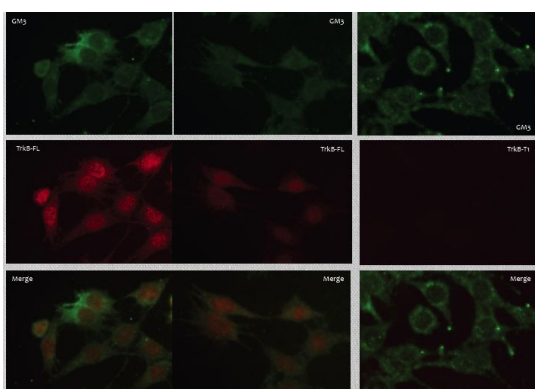
歯原性間葉細胞における糖脂質 GM3 および NT-4 レセプター TrkB-FL, TrkB-T1 の免疫染色による局在観察。 Fig.1



歯原性間葉細胞には, GM3 の発現が強く認められた。一部でリピッドラフトと呼ばれる糖脂質とコレステロールやスフィンゴミエリンに非常に富んだドメイン構造をとって存在している様子が観察される。リピッドラフトの形成は, 細胞の機能を変化させることが知ら

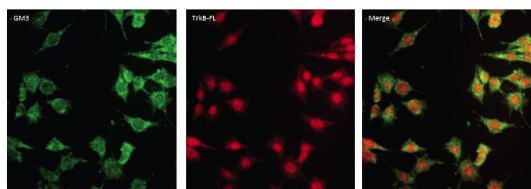
れる。これに対し、GM3 を培地中に加えることで、ラフトと思われる GM3 が濃く発現しているエリアが増えていることが観察された。D-PDMP(グルコシルセラミド合成阻害材)は、細胞の糖脂質合成を阻害することにより、細胞が本来発現している糖脂質が枯渇することが知られていたため、培地中にこれを添加し、細胞表面上の GM3 の発現がどのように変化するのか免疫染色にて検索した。結果として、完全に GM3 の発現が無くなってしまいうわけではないが、大幅な発現減少が観察された。

Fig.2



歯原性間葉細胞における NT-4 レセプター TrkB-FL, TrkB-T1 の発現を Fig.2 に示す。TrkB-FL の発現は認められるものの TrkB-T1 については免疫染色のレベルでは発現を確認できなかった。

Fig.3

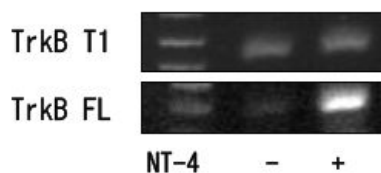


糖脂質 GM3 (緑) が細胞膜全体に分布していること、TrkB-FL (赤) は、細胞膜だけでなく、むしろ核内で強く発現しているように観察された。核内が強く赤く観察された結果が、膜貫通型レセプターとして考えられている TrkB-FL の核膜上での発現を示すものであるのか、染色ステップの手技的な誤りによるもの

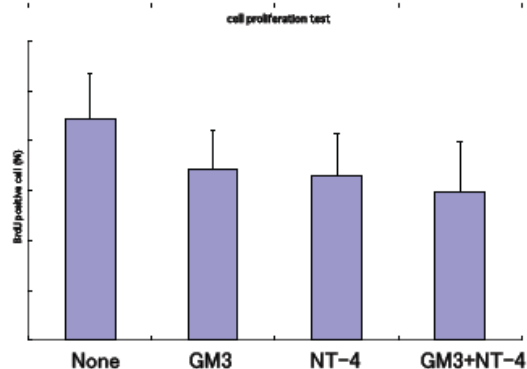
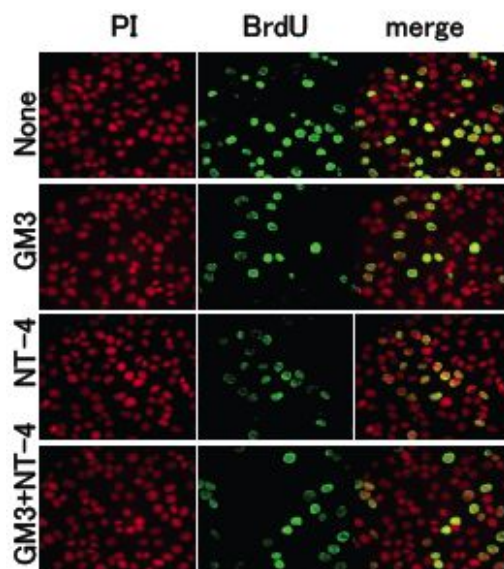
なのか未だ判断しかねている。細胞膜上の GM3 と TrkB-FL の発現部位は一致しており、重ねあわせると黄緑色を呈している。

短縮型 TrkB に関しては、本実験中には発現を観察することができなかった。これまでの報告では、p3 マウス歯胚でも cell line においても上皮及び間葉の両方で強い発現がみられていることから、発現なしと断定できず、抗体を変えて検索中である。

RT-PCR 法では、TrkB-FL, TrkB-T1 の両方について遺伝子発現を確認できている。NT-4 に反応して発現が増強したのは TrkB-FL の方であった。

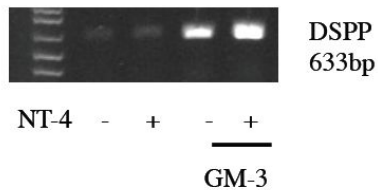


BrdU 取り込み試験



歯原性間葉細胞に 100ng/ml NT-4 または 5 $\mu$ M GM3 を添加することにより，増殖能を抑制することが BrdU 取り込み試験により明らかであった。細胞増殖抑制の効果は，両者が培地中に共存することで，増強された。

#### RT-PCR



歯原性間葉細胞の培地に 100ng/ml NT-4 または 2.5 $\mu$ M GM3 を加えた場合，*DSPP* 遺伝子の発現が強く認められた。また，両者が培地中に共存することで，さらにその効果が増強された。

Sample number	1	2	3	4	5	6
NT-4	-	+	-	+	-	+
			2.5MGM3		2.5M LacCer	



2.5 $\mu$ M LacCer についても GM3 と同様の傾向が認められた。このことにより，糖脂質 GM3，LacCer は歯原性間葉細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する作用があることが示唆された。また糖脂質 GM3，LacCer と神経栄養因子 NT-4 は相互に作用し象牙芽細胞への分化誘導作用を強めることが示唆された。

これまでの研究および以上の結果により歯原性間葉細胞上で糖脂質 GM3，LacCer および神経栄養因子 NT-4 は，細胞分化への関与が疑われ，NT-4 は，上皮間葉相互作用の機能を果たす一因子であることが考えられた。糖脂質は，NT-4 レセプター TrkB に作用し，NT-4 の作用を調整していることが考えられた。しかしながら，NT-4 は，歯の硬組織形成過程に

おいて何らかの作用を示すものの必須ではなく，代替機構が存在していることが考えられた。

#### 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 5 件)

1. Pannexin 3 inhibits proliferation of osteoprogenitor cells by regulating Wnt and p21 signaling.

Ishikawa M, Iwamoto T, Fukumoto S, Yamada Y.

J Biol Chem. 2014 Jan 31;289(5):2839-51. (査読あり)

2. Cell dynamics in cervical loop epithelium during transition from crown to root: implications for Hertwig's epithelial root sheath formation.

Sakano M, Otsu K, Fujiwara N, Fukumoto S, Yamada A,

Harada H. J Periodontal Res. 2013 Apr;48(2):262-7.

(査読あり)

3. Glycosphingolipids regulate ameloblastin expression in dental epithelial cells.

Kamasaki Y, Nakamura T, Yoshizaki K, Iwamoto T,

Yamada A, Fukumoto E, Maruya Y, Iwabuchi K, Furukawa

K, Fujiwara T, Fukumoto S.

J Dent Res. 2012 Jan;91(1):78-83. (査読あり)

4. Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells.

Otsu K, Kishigami R, Oikawa-Sasaki A, Fukumoto S,

Yamada A, Fujiwara N, Ishizeki K, Harada H.

Stem Cells Dev. 2012 May 1;21(7):1156-64. (査読あり)

(査読あり)

5. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation.

Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada

A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y,

Fukumoto S.

J Biol Chem. 2012 Mar 23;287(13):10590-601. (査読あり)

(査読あり)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

釜崎 陽子 ( KAMASAKI YOKO )  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科  
・助教  
研究者番号：30253678

### (2) 研究分担者

西口美由季 ( NISHIGUCHI MIYUKI )  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科  
・助教  
研究者番号：10253676

山田亜矢 ( YAMADA AYA )  
東北大学・歯学研究科・准教授  
研究者番号：40295085

藤原 卓 ( FUJIWARA TAKU )  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科  
・教授  
研究者番号：00228975

### (3) 連携研究者

福本 敏 ( FUKUMOTO SATOSHI )  
東北大学・歯学研究科・教授  
研究者番号：30264253