

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659810

研究課題名(和文)グリコーゲンの新たな機能の解明—歯胚・骨形成促進剤としての臨床応用に向けて—

研究課題名(英文)Elucidation of new function of glycogen - The possibility as accelerating agent for odontogenesis and osteogenesis

研究代表者

依田 浩子 (IDA, Hiroko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：60293213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯胚発育過程におけるグリコーゲン代謝調節機構およびその役割を解明し、さらに酵素合成グリコーゲン(ESG)が歯胚形成に及ぼす影響とその作用メカニズムを明らかにし、ESGを歯胚・歯槽骨形成促進剤として臨床応用することを目指した。マウス歯胚発育過程において、グリコーゲン代謝関連分子が時期特異的に厳密に発現調節されており、グリコーゲン代謝が歯胚細胞の増殖および分化を制御していることが示された。さらに、細胞外から投与した酵素合成グリコーゲン(ESG)が歯胚細胞のグリコーゲン代謝を促進することにより、歯胚再生を促進することが明らかとなり、ESGの歯科再生医療への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glycogen is a storage form of glucose within mammalian cells and plays a major role in energy metabolism. Temporary glycogen storage has been observed in the cell differentiation stage during organ development, and understanding the glycogen metabolism that underlies various cell dynamics is essential for developing strategies for organ regeneration. Here, we investigated glycogen metabolism in murine tooth development. We demonstrated that glycogen metabolism is an essential pathway for dental cell differentiation. Next, we evaluated the effect of enzymatically synthesized glycogen (ESG) on osteogenesis as well as odontogenesis using in vitro and in vivo experimental model of mice. As results, ESG stimulated the cell growth and differentiation of dental cells and accelerated the growth of tooth explants in vitro. In conclusion, ESG could be a useful stimulant for osteogenesis and odontogenesis.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：グリコーゲン 酵素合成 歯胚 骨形成促進剤

## 1. 研究開始当初の背景

グルコースは生体の主要なエネルギー源であり、動物細胞はグルコースを細胞内へ取り込み、グリコーゲンとして細胞質内に蓄える。エネルギーが必要な際には、細胞内のグリコーゲンを分解して消費することから、グリコーゲンは細胞質内に存在するエネルギー貯蔵物質という認識が一般的であり、国内外でグリコーゲンの機能に着目した研究はほとんどみられない。近年、申請者らは歯胚発生におけるグリコーゲンの局在(歯胚エナメル器、歯小囊)と硬組織形成細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALPase)活性の分布が一致することを明らかにし、細胞内におけるグリコーゲンの蓄積が歯胚形成や骨形成に重要な役割を担っている事が推測された。一方、研究協力者の江崎グリコ(株)高田洋樹博士は、構造安定性の高い酵素合成グリコーゲン(ESG)の製造に成功しており(Carbohydr Res 344: 654-659, 2009)、ESGが細胞外からシグナル伝達物質として働き、細胞内への情報伝達が起こる可能性を示している。既に申請者らは、細胞外からのグリコーゲン刺激が細胞内のグリコーゲン代謝を亢進し、細胞分化を誘導する可能性を明らかにしており、骨形成促進作用に関しては、2011年にPTC出願を行っている。

## 2. 研究の目的

本研究では歯胚組織における細胞内グリコーゲンの蓄積意義を解明するとともに、細胞内グリコーゲン量の調節による細胞増殖・分化への影響、ならびに細胞内グリコーゲンの蓄積促進作用をもつ酵素合成グリコーゲンが歯胚・歯槽骨形成に及ぼす影響とその作用メカニズムを明らかにし、ESGを歯胚・歯槽骨形成促進剤として臨床応用することを目指して、*in vitro*による作用メカニズムの解明から*in vivo*での有効性の検

証までを行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 胎生期から生後のマウス臼歯歯胚において、グリコーゲンおよび各種グリコーゲン代謝関連分子の局在について免疫組織化学的に検索し、時期・部位特異的な歯胚発育過程でのグリコーゲン代謝様式を検索した。
- (2) 細胞内グリコーゲンの蓄積と細胞増殖、細胞分化との関連性について、*in vivo*での組織学的検索と、*in vitro*での歯胚細胞培養および歯胚器官培養による検索を行った。
- (3) 細胞内グリコーゲン代謝の促進効果のあるESGの歯科臨床応用を念頭におき、まず、*in vitro*にて歯胚上皮・間葉細胞への作用機序・効果と歯胚形成への影響を検証し、次いでマウス再植モデルを用いて、局所投与による歯髄再生を含めた治癒効果を検討した。

以上の*in vivo*および*in vitro*でのESGを用いた実験結果に基づき、ESGを応用したグリコーゲン代謝調節による歯胚・骨形成誘導が臨床応用可能かどうか判定した。

## 4. 研究成果

- (1) マウス歯胚組織におけるグリコーゲン、グリコーゲン代謝関連因子の免疫組織化学的局在

胎生11日齢から生後4週齢ICRマウスのパラフィン切片および凍結切片を作製し、グリコーゲン、グルコース輸送体(GLUT1, GLUT2)、グリコーゲン合成酵素(グリコーゲンシンターゼ)、グリコーゲン分解酵素(グリコーゲンホスホリラーゼ)の各種抗体を用いた免疫組織化学を行い、時期・部位特異的な歯胚発育過程でのグリコーゲン代謝を検討した。その結果、グリコーゲンは胎生期歯胚の歯胚上皮、エナメル器および歯小囊に時期

特異的に強陽性を示し、とくにエナメル芽細胞の分化過程において、形成期エナメル芽細胞への分化直前にグリコーゲン合成酵素が不活性型から活性型に変換され、グリコーゲンの一過性の細胞内蓄積が生じ、その後、エナメル基質形成が開始されるとともにグリコーゲン分解酵素が作用し、細胞分化のタイミングでグリコーゲン代謝が時期特異的に厳密に調節されていることが明らかとなった。

## (2) 細胞内グリコーゲンの蓄積と細胞増殖、細胞分化との関連性の解明

マウス歯胚組織におけるグリコーゲン蓄積細胞と細胞増殖、細胞分化マーカーについての免疫組織化学的解析ならびに遺伝子発現検索

*in vivo*でのグリコーゲン蓄積細胞と細胞増殖・分化との関連性を明らかにするために、グリコーゲンと細胞増殖マーカー (Ki67, BrdU)、エナメル芽細胞分化マーカー (enamelin, amelogenin) および象牙芽細胞分化マーカー (DSP)、骨芽細胞分化マーカー (ALP, osteocalcin) について、免疫組織化学的に検索した。その結果、マウス歯胚組織において、グリコーゲン陽性細胞は、Ki67陽性は示さず、細胞増殖部位とは一致しないことが明らかとなった。また、生後歯胚におけるエナメル芽細胞および象牙芽細胞分化との関係については、前エナメル芽細胞はグリコーゲンを蓄積していたが、形成期エナメル芽細胞への分化に伴い細胞内グリコーゲン顆粒は消失していた。一方、歯髄組織では歯髄中央部にはグリコーゲン陽性細胞が認められるものの、分化した象牙芽細胞にはグリコーゲンの蓄積は確認されなかった。以上より、歯胚細胞では、最終分化の直前にグリコーゲンが一過性に蓄えられ、細胞分化に必要なエネルギーを貯蔵している可能性が明らかとなった。

細胞内グリコーゲン蓄積の有無が歯胚形

成へ及ぼす影響: 歯胚の *in vitro* 器官培養実験

グリコーゲンシンターゼ siRNA およびグリコーゲン分解酵素阻害剤 (BAY) 添加によるグリコーゲン合成・分解の阻害実験を行い、培養歯胚の形態変化を観察した。グリコーゲン蓄積の増減については、PAS 染色ならびにグリコーゲン抗体を用いた免疫染色にて確認した。その結果、グリコーゲン合成の抑制および分解抑制の両群ともに、エナメル芽細胞の分化が抑制され、エナメル基質形成が障害された。従って、グリコーゲンの合成、蓄積ならびに分解の一連の過程が形成期エナメル芽細胞の分化に必須であることが示された。

前項までの実験結果より、マウス歯胚発育過程における歯胚細胞の一過性のグリコーゲン蓄積と分解によるエネルギー産生は、細胞分化に重要な役割を果たしており、グルコースの取り込み、グリコーゲン合成、蓄積および分解のタイミングは、歯胚発育分化において時期特異的に厳密に制御されていることが明らかとなった。

## (3) 酵素合成グリコーゲンによる *in vitro* 系での細胞内グリコーゲン代謝への影響

酵素合成グリコーゲン (ESG) 添加による歯髄細胞の細胞増殖、分化誘導実験

マウス歯髄細胞をESG添加、非添加培地にて培養し、ESGの細胞内取り込みの有無、細胞内グリコーゲン合成量の変化、細胞分化マーカーの発現変化をRT-PCR法、蛍光抗体法にて検索した。その際、ESGの歯髄細胞への作用機序も合わせて検索した。歯髄細胞は生後マウス臼歯の歯髄初代培養細胞を樹立して、実験に使用した。その結果、ESG添加により象牙芽細胞分化マーカーであるDSPPとALP、細胞増殖マーカーのサイクリンD1、ならびにグリコ

ーゲン代謝関連分子 (glycogen synthase, glycogen phosphorylase) の遺伝子発現の上昇が確認された。

(4) 酵素合成グリコーゲン添加による歯胚器官培養実験

胎生13日齢のICRマウス下顎臼歯歯胚を摘出し、ESG添加の有無による歯胚発育への影響を検討した。その結果、ESG添加により歯胚発育が促進され、エナメル芽細胞分化も促進されることが明らかとなった。

(5) 酵素合成グリコーゲンのマウスモデルを用いた *in vivo* 系への応用

酵素合成グリコーゲン全身投与による歯の再植実験

ESG を飲水にて全身投与した状態でマウス上顎臼歯の再植実験を行い、ESG 飲水群および非飲水群で治癒過程を比較した。その結果、ESG 飲水群では神経組織の再生を伴った歯髄治癒が有意に促進された。

酵素合成グリコーゲン局所投与による歯髄再生過程の検索

生後3週齢マウス臼歯の再植実験において、歯を抜去した後に ESG 溶液に浸漬後、歯を再植した。その結果、コントロール群と比較して、ESG 群では有意に歯髄治癒が促進された。さらに、歯髄内の骨様硬組織の形成も認められた。

以上の結果より、マウス歯胚発育過程において、エナメル芽細胞ならびに象牙芽細胞分化に際し、グリコーゲン代謝関連分子が時期特異的に厳密に発現調節されており、グリコーゲン代謝が歯胚発育に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、細胞

外から投与したESGが歯髄細胞のグリコーゲン代謝を促進することにより、歯髄組織の再生を活性化することが明らかとなり、ESGの歯科再生医療への応用の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5件)

1. Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: The effects of enzymatically synthesized glycogen on the pulpal healing process of teeth with intentionally delayed replantation in mice. J Oral Biosci 57(2): 124-130, 2015. (査読有) [http://www.journaloforalbiosciences.org/article/S1349-0079\(15\)00026-2/abstract](http://www.journaloforalbiosciences.org/article/S1349-0079(15)00026-2/abstract)
2. Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Ohshima H: Establishment of in vitro culture system for evaluating dentin-pulp complex regeneration with special reference to the differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells. Histochem Cell Biol 142(3): 23-33, 2014. (査読有) DOI: 10.1007/s00418-014-1200-7.
3. Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Effects of a triple antibiotic solution on pulpal dynamics after intentionally delayed tooth replantation in mice. J Endod 40(10): 1566-72, 2014. (査読有) DOI: 10.1016/j.joen.2014.05.005.
4. Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Lymphoid Enhancer-binding Factor 1 Expression Precedes Dentin Sialophosphoprotein Expression during Rat Odontoblast Differentiation and Regeneration. J Endod 39(5): 621-618,

2013. (査読有) DOI:

10.1016/j.joen.2012.12.016.

5. Ida-Yonemochi H, Harada H, Ohshima H, Saku T: Reciprocal expressions between  $\alpha$ -dystroglycan and integrin  $\beta$ 1, perlecan receptors, in the murine enamel organ development. *Gene Expr Patterns* 13(8): 293-302, 2013. (査読有) DOI: 10.1016/j.gep.2013.05.004.

[学会発表](計 14 件)

1. 依田浩子: エナメル質形成を制御する糖代謝の新規メカニズム. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015 年 3 月 21-23 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).
2. 依田浩子: 歯の形態形成を制御する糖代謝機構. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).
3. Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Harada H: Glycogen-shunt plays an important role in the relationship between cell differentiation and energy metabolism in organogenesis. *EMBL Symposia*, 2014. 8. 27-30, EMBL Advanced Training Centre (Heidelberg, Germany).
4. 依田浩子: 歯の形態形成を制御する糖代謝機構. 第 38 回峠の会(形態学セミナー), 2014 年 8 月 1 日, ホテルニューあけぼの(新潟県・新潟市).
5. 大島勇人, Angela Quispe-Salcedo, 高田洋樹, 依田浩子: 酵素合成グリコーゲンによる歯の再植後の歯髄治癒促進効果について. 第 13 回日本再生医療学会総会, 2014 年 3 月 4-6 日, 国立京都国際会館(京都府・京都市).
6. Ida-Yonemochi H: Akt signaling regulates glycogen storage to promote cell differentiation during amelogenesis. 2013 年度フロンティアミーティング in 新潟(新潟大学・日本歯科大学共同主催), 2014 年 2 月 21-22 日, 新潟大学歯学部講堂(新潟県・新潟市).
7. 依田浩子: 歯科における再生医療研究の現状と展望. 第 78 回日本泌尿器科学会東部総会, 2013 年 10 月 17-19 日, 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市).
8. 依田浩子, 大島勇人, 原田英光: AKT シグナルがグリコーゲン代謝を促進しエナメル芽細胞分化を誘導する. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013 年 9 月 20-22 日, 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市).
9. Ida-Yonemochi H, Takata H, Ohshima H: Biological effects of enzymatically synthesized glycogen on osteogenesis and Odontogenesis. 2013 Tripartite Conference on Tooth and Bone, 2013, 8. 7-11. Seoul, Korea.
10. 依田浩子: 酵素合成グリコーゲンの歯科再生医療への応用-新たな骨・歯胚形成促進剤の開発を目指して-. 平成 25 年度第 1 回新潟大学東京事務所 Evening Seminar & Communication Salon, 2013 年 7 月 19 日, キャンパス・イノベーションセンター東京(東京都・港区).
11. Hiroko Ida-Yonemochi: The role of glycogen metabolism during murine salivary gland development. *International Symposium Frontier Meeting, Seoul/Jeonju 2013 Development, Evolution, Taxonomy, and Genetics of Tooth Structure "Tooth Voyage, Up To Date"* 2013年02月12-15日, Chonbuk National University (Jeonju, Korea).
12. Angela Quispe-Salcedo, Hiroko Ida-Yonemochi, Hayato Ohshima: The application of antimicrobials or glycogen accelerates the pulpal regeneration of replanted molars in mice. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013年3月28-30日, かがわ国際会議場(香川県・高松市).
13. 依田浩子, 中川英蔵, 高田洋樹, 監物新一, 大島勇人: 酵素合成グリコーゲンによる骨形成促進作用メカニズムの解明. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 28-30 日, かがわ国際会議場(香川県・高松市).
14. 依田浩子, 中川英蔵, 大島勇人: マウス唾液腺分化過程におけるグリコーゲン代謝の役割. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2012 年 9 月 14-16 日, 奥羽大学(福島県・郡山市).

〔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：  
出願年月日：  
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

依田 浩子 (IDA HIROKO)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：60293213

### (2)研究分担者

田中 みか子 (TANAKA MIKAKO)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号：20361909

中富 満城 (NAKATOMI MITSUSHIRO)  
九州歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：10571771

### (3)連携研究者

大島 勇人 (OHSHIMA HAYATO)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：70251824