

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870277

研究課題名(和文)細胞アンテナを介した歯牙再生への新しいアプローチ

研究課題名(英文)Development of a new regenerative treatment for teeth through cellular antennas

研究代表者

河田 かずみ (KAWATA, Kazumi)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：10457228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、全身の健康維持に繋がると言われている歯牙保存を目指し、本研究を進めてきた。歯牙保存のためには、齲蝕に罹患した歯牙組織の再生が望まれる。現在、齲蝕への再生治療法はないが、本研究では、細胞アンテナである一次繊毛による象牙芽細胞分化機構を明らかにした。また、ステロイドの一つであるdexamethasoneは歯髄細胞を象牙芽細胞へ分化させることが知られているが、この効果が一次繊毛を介する知見をも得た。今後、我々の得た知識を基盤として齲蝕でダメージを受けた歯牙組織の新たな再生治療方法を開拓することが出来ると考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is tooth preservation that leads to health maintenance of a whole body. For the tooth preservation, teeth with dental caries need to be revived. However, there are no regenerative treatments to decayed teeth at present. On the other hand, a primary cilium function as a cellular antenna on most cells in a body. Moreover, primary cilia are known to exist in odontoblasts as well. However, functions of primary cilia in odontoblasts are still unknown. In this study, the mechanism of odontoblastic differentiation through primary cilia was elucidated. Furthermore, steroid dexamethasone is known to differentiate dental pulp cells to odontoblasts. We revealed that the effect depends on primary cilia. From now on, we intend to develop new regenerative treatment methods for teeth which received damage by dental caries based on these observations.

研究分野：細胞生物学

キーワード：象牙芽細胞分化 デキサメタゾン

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の齲蝕治療は、齲蝕罹患部歯質の再生は望めないため、人工物置換術に頼っている。しかし、一度行った修復治療は、修復物の老朽化や、歯質と修復物の間に存在するマイクロギャップからの齲蝕の再発などにより再治療が必要となることが避けられない。修復部分は再治療の度に拡大するため、再治療を繰り返すことにより、最終的には歯牙の欠損という悪循環をたどることが多い。残存歯数が 20 本を下回ると、咀嚼の不自由さを感じる者が増える。それにより軟食傾向が起こるため、生活習慣病やその要因とも言われるメタボリックシンドローム、また、栄養の偏りや食欲低下による低栄養を招く。その他にも、咀嚼機能は認知症だけでなく、学習記憶能力などの脳機能にも影響を与える。このように咀嚼機能を維持すること、すなわち歯牙喪失の防止が全身状態を良好に保つことにつながる。

(2) 細胞アンテナとして機能する一次繊毛は体を構成する殆どの細胞に存在する。現在までに、この一次繊毛が歯牙組織の構成成分である象牙質を形成する象牙芽細胞にも存在することが報告されている。その象牙芽細胞上の一次繊毛は象牙質側から歯髓側へ向かって存在すると報告されているが、象牙芽細胞上の一次繊毛の機能に関しては殆ど研究が進んでいない。

2. 研究の目的

生活習慣病、認知症患者は近年、増加している。これらの疾患は患者の生活の質に大きな影響を及ぼすが、一度発病すると根治困難である。このため、普段から予防に取り組む必要がある。上述したように、これらの疾患原因の一つには、残存歯数の減少によってもたらされる軟食傾向がある。歯牙喪失原因の一つは齲蝕であるため、全身の健康を維持するには、歯牙喪失の防止を目指し、齲蝕に罹患した歯牙組織の再生が望まれる。しかしながら、現在、齲蝕への再生治療法はない。本研究では、一次繊毛による象牙芽細胞分化機構を明らかにすることにより、得られた知識を基盤として齲蝕でダメージを受けた歯牙組織の新たな再生治療方法を開拓することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 象牙芽細胞の増殖における一次繊毛の役割の解析

レトロウイルスを用いたショートヘアピン RNA (shRNA) の安定発現により stable な一次繊毛形成遺伝子 *Intraflagellar transport (Ift) 88* ノックダウン象牙芽細胞様細胞株 KN-3 細胞

およびコントロール shRNA 発現 KN-3 細胞を樹立し、細胞接着、lamellipodia の形成や細胞増殖に対する影響を細胞生物学的的方法により評価した。

細胞接着、lamellipodia の形成や細胞増殖を制御する機構もしくはシグナルの検討を行った。細胞播種後 1 日目の *Ift-88* ノックダウン KN-3 細胞における細胞周期、hedgehog (Hh) シグナル経路、古典的 WNT シグナル経路、非古典的 WNT シグナル経路の活性を検討した。具体的には、細胞周期に関しては、細胞分裂の分子マーカーである cyclin B1 の発現量を western blotting を行うことにより検討を試みた。また、Hh シグナル経路活性化により増加する転写因子の *Gli* の発現変動を逆転写リアルタイム PCR 法により、古典的 WNT シグナル経路の活性化により増加する転写因子の β -catenin と非古典的 WNT シグナル経路の活性化により増加する活性型 Rac1 は western blotting により評価を試みた。

細胞播種後 1 日の KN-3 細胞で、細胞分裂を抑制するために 5-fluorouracil (FU) を添加した。また、非古典的 WNT シグナルを抑制するためには、Rac1 の上流シグナル分子の PI3K 阻害剤の LY294002 を添加した。それぞれの際の細胞接着、lamellipodia の形成や細胞増殖への影響を検討した。

(2) 象牙芽細胞分化における一次繊毛の役割の検証

一次繊毛欠損 KN-3 細胞において、象牙芽細胞マーカー遺伝子である *Dentin sialophosphoprotein (Dspp)* の発現変動を指標として逆転写リアルタイム PCR 法で検討した。また、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を確認した。

細胞播種後 4 日目の一次繊毛欠損 KN-3 細胞を用いて一次繊毛特異的なシグナル経路である Hh シグナル経路、古典的 WNT シグナル経路や非古典的 WNT シグナルがどの様に変化するかをコントロール KN-3 細胞と比較、検討した。

細胞播種後 4 日目の KN-3 細胞で古典的 WNT シグナルを活性化するために、WNT3A リコンビナントタンパク質や GSK3 β 阻害剤の SB216763 をそれぞれ添加した。また、非古典的 WNT シグナルを抑制するためには、LY294002 を添加した。その際、それぞれの有線毛率を計測した。更に、*DSPP* の発現、ALP 活性についても確認を行った。

(3) 歯髓細胞から象牙芽細胞への分化における一次繊毛の役割の検証

4 日齢のラットの上顎臼歯より単離した歯髓細胞を象牙芽細胞分化培地で培養し、象牙芽細胞への分化を図った。その条件下で、経時的に一次繊毛を有する細胞数を計測

した。

- (4) ステロイド系抗炎症薬による象牙芽細胞増殖における一次繊毛の役割の解析
ステロイド系抗炎症薬である Dexamethasone (DEX) を添加した一次繊毛欠損 KN-3 細胞において、細胞接着、lamellipodia の形成や細胞増殖に対する影響を細胞生物学的方法により評価した。

- (5) ステロイド系抗炎症薬による象牙芽細胞分化における一次繊毛の役割の検証
DEX は、歯髄細胞を象牙芽細胞へ分化させることが知られている。DEX を添加した一次繊毛欠損 KN-3 細胞において、*Dspp* の発現変動を指標として逆転写リアルタイム PCR 法で検討した。また、ALP 活性、石灰化を確認した。
細胞播種後 4 日目の一次繊毛欠損 KN-3 細胞に DEX を添加し、Hh シグナル経路がどのように変化するかをコントロール KN-3 細胞と比較、検討した。

4. 研究成果

(1)

細胞播種後 1 日目の *Ift88* ノックダウン KN-3 細胞では、細胞接着、lamellipodia の形成、および細胞増殖は抑制された。

さらに、*Ift88* のノックダウンは cyclin B1 の発現を減少させた。また、Hh シグナル経路や古典的 WNT シグナル経路には変化は認められなかったが、非古典的 WNT シグナル経路は抑制されていることも明らかとなった。

KN-3 細胞で、細胞分裂や非古典的 WNT シグナルをそれぞれ抑制したところ、細胞接着、lamellipodia の形成、および細胞増殖は、どちらも *Ift88* ノックダウン時と同様の変動を示した。

(2)

細胞播種後 4 日目の *Ift88* ノックダウン KN-3 細胞において、*Dspp* の発現量の増加、ALP 活性の抑制が確認された。Hh シグナル経路は変化が認められなかったが、古典的 WNT シグナル経路は活性化され、非古典的 WNT シグナル経路は抑制されていることも明らかとなった。KN-3 細胞において、古典的 WNT シグナル経路を活性化したところ、コントロール細胞で認められた図 1 のような一次繊毛の保有率が減少することが明らかとなった。

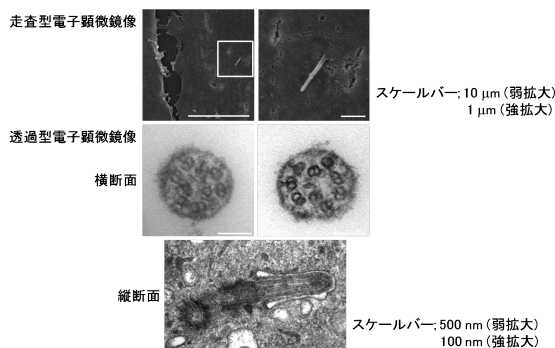


図1. KN-3細胞における一次繊毛

その際の、*Dspp* の発現、ALP 活性は *Ift88* ノックダウン時と同様の変動を示した。また、非古典的 WNT シグナル経路を抑制したところ、有線毛率には変化は認められず、*Dspp* の発現、ALP 活性は *Ift88* ノックダウン時とは逆の変動を示した。

- (3) 初代象牙芽細胞の分化の進行と共に一次繊毛を有する細胞数は上昇することが明らかとなった。

- (4) 細胞播種後 1 日目の KN-3 細胞に DEX を添加したところ、lamellipodia の形成には変化が認められなかったが、細胞接着や細胞増殖速度は促進された。細胞接着や細胞増殖の調節に IFT88 が関与している可能性を考え、*Ift88* ノックダウン KN-3 細胞に DEX を添加したところ、細胞接着は、コントロール KN-3 細胞と同様に促進されたが、細胞増殖速度の促進は認められなくなった。

(5)

細胞播種後 4 日目の KN-3 細胞に DEX を添加したところ、石灰化の程度には変化が認められなかったが、*Dspp* の発現量や ALP 活性は増加した。*Dspp* の発現量や ALP 活性の調節に IFT88 が関与している可能性を考え、*Ift88* ノックダウン KN-3 細胞に DEX を添加したところ、*Dspp* の発現量、ALP 活性細胞増殖速度ともに増加が抑制された。

Hh シグナル経路が抑制されていることも明らかとなった。

以上の結果から、分裂期の細胞において、IFT88 は、細胞分裂を直接的に調節するだけでなく、非古典的 WNT シグナルをも調節することで、細胞接着、lamellipodia の形成、および細胞増殖に影響を及ぼす可能性が考えられる。また、象牙芽細胞の分化制御に関しては、一次繊毛を介した古典的 WNT シグナルの受容を介する可能性が強く示唆された。更には、この経路の活性化が一次繊毛の形成、それ自体にも関与する可能性も示唆された。

一方、分裂期の細胞への DEX の添加は、IFT88 が関与する何らかのメカニズムで細胞増殖を促進する可能性が強く示唆された。更には、象牙芽細胞への DEX の添加は、一次繊毛を介する何

らかのメカニズムで Hh シグナル活性を抑制し、象牙芽細胞の分化を促進する可能性が強く示唆された。

<引用文献>

Higashi K, Matsuki S, Soeda M, Takagi T, Sasa S, Osada T, Fine structures of primary cilia in the odontoblasts of the lower molar teeth of rats, *Kanagawa Shigaku*, 1987, 21(4):611-22

Magloire H, Couble ML, Romeas A, Bleicher F, Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses, *Cell Biol Int*, 2004, 28(2):93-9.

Thivichon-Prince B1, Couble ML, Giamarchi A, Delmas P, Franco B, Romio L, Struys T, Lambrichts I, Ressenkoff D, Magloire H, Bleicher F.

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)

[学会発表](計14件)

河田かずみ, 成田啓之, 竹田扇: Intraflagellar transport protein 88 (IFT88) は細胞分裂期においても繊毛形成に働く. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会, 新神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015.3.21-23

Kawata K, Narita K, Takeda S: Canonical Wnt signaling pathway regulates not only the odontoblast differentiation through primary cilia but also formation of primary cilia. 2014 ascb/ifcb meeting. Philadelphia, America, 2014.12.6-10

河田かずみ, 竹田扇: 細胞分裂期の象牙芽細胞における IFT88 の役割. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2014.9.25-27

河田かずみ, 成田啓之, 竹田扇: 古典的 WNT シグナル下流遺伝子 Ccn6/Wisp3 による一次繊毛形成調節機構の可能性. 第6回日本 CCN ファミリー研究会, 岡山大学(岡山県岡山市), 2014.8.30

河田かずみ, 成田啓之, 竹田扇: 象牙芽細胞分化制御における一次繊毛と古典的 WNT シグナルの相互作用. 第32回日本骨代謝学会学術集会, 大阪国際会議場(大阪府大阪市), 2014.7.24-26

河田かずみ, 成田啓之, 竹田扇: 象牙芽細胞分化における一次繊毛の機能. 第5回繊毛研究会, 浜松市研修交流センター(静岡県浜松市), 2014.5.24-25

河田かずみ, 成田啓之, 竹田扇: 象牙芽細胞における古典的 WNT シグナルの生理機能の解析. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 自治医科大学(栃木県

下野市), 2014.3.27-29

Takeda S, Kawata K, Narita K: Primary cilia regulate the differentiation of odontoblasts. 2013 ascb annual meeting. New Orleans, America, 2013.12.14-18

河田かずみ, 成田啓之, 竹田扇: 象牙芽細胞における一次繊毛を介した WNT シグナルの生理機能の解析. 第73回日本解剖学会中部支部学術集会, 山梨大学(山梨県甲府市), 2013.10.5-6

河田かずみ, 竹田扇: 象牙芽細胞における一次繊毛形成遺伝子 IFT88 の生理機能の解析. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市), 2013.9.20-22

Kawata K, Narita K, Takeda S: A novel pathway of hedgehog signaling modification by primary cilia in odontoblasts. ANZBMS 23rd Annual Scientific meeting. Melbourne, Australia, 2013.9.8-11

河田かずみ, 成田啓之, 鷲尾絢子, 北村知昭, 西原達次, 竹田扇: 象牙芽細胞の Ift88 はアクチンダイナミクスを介して細胞運動を制御する. 第4回繊毛研究会, 東京大学(東京都文京区), 2013.9.6-7

河田かずみ, 成田啓之, 竹田扇: 象牙芽細胞の一次繊毛を介した hedgehog シグナルの新規修飾機能. 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会 第2回合同国際会議, 神戸国際会議場・ポートピアホテル(兵庫県神戸市), 2013.5.28-6.1

河田かずみ, 竹田扇: 象牙芽細胞における一次繊毛の生理機能の解析. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市), 2013.3.28-30

[その他]

ホームページ等

「DEX や -GP による象牙芽細胞の増殖・分化は一次繊毛が制御」*medical tribune* 2013/7/18 vol.46, no.29 p.17 に取り上げられる。

平成25年度日本骨代謝学会優秀演題賞を受賞

ANZBMS 2013 Travel Award を受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河田 かずみ (KAWATA, Kazumi)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 10457228