

論文要旨等報告書

氏	早野 暁
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 4 3 5 6 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	象牙質形成におけるヘパラン硫酸の硫酸基修飾について
論文審査委員	教授 長塚 仁 教授 山本 敏男 教授 山城 隆

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯の発生は、他の様々な器官と同様に上皮間葉相互作用によって制御される。上皮間葉相互作用とは、基底膜を介した上皮間葉間のシグナル伝達であり、これらのシグナル分子の挙動を制御するものの一つとして、ヘパラン硫酸 (HS) が知られている。HS は基底膜や細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) のコアタンパクに共有結合するポリサッカライドであり、硫酸基転位酵素によって選択的に硫酸化される。HS が硫酸化されるパターンによって、細胞増殖因子を始めとした様々な分子が結合あるいは拡散する事により、シグナル分子の挙動が制御される。

糖鎖の硫酸基付着を修飾する酵素はいくつか存在し、その一つとしてヘパラン硫酸 6-O エンドスルファターゼ (Sulf) が知られている。Sulf は HS のグルコサミン側の 6 位の酸素基に結合する硫酸基を特異的に加水分解する酵素であり、哺乳類では Sulfatase 1 (*Sulf1*)、および、Sulfatase 2 (*Sulf2*) が遺伝子ファミリーとして同定されている。*Sulf1* は Wnt シグナルを修飾し、細胞の分化や増殖を制御する硫酸基加水分解酵素として働くことが解明されている。本研究では、この HS の硫酸基修飾が、象牙質形成にどのような影響を及ぼしているかを検討する事を目的とした。

【方法および結果】

HS の硫酸基を特異的に認識する 10E4 抗体を用いて、野生型マウスの下顎臼歯象牙芽細胞層における HS の硫酸化パターンの経時的変化の観察を行った。その結果、象牙芽細胞の分化・増殖が進むにつれて、象牙芽細胞層特異的に HS の硫酸基が加水分解される事が分かった。この硫酸基の加水分解と *Sulf* の関係を調べるため、発生中の歯胚における *Sulf1*, *Sulf2* mRNA 発現の解析を行った。その結果、硫酸基が加水分解された部位と *Sulf1*, *Sulf2* mRNA の発現部位はヘルトヴィッヒ上皮鞘や象牙芽細胞層の一部で一致していた。また、*Sulf1*, *Sulf2* ダブルノックアウト (*Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-}型) マウスの臼歯歯胚では、硫酸基の加水分解が著しく低下していた。これらの結果から、歯の発生における HS の硫酸基の加水分解に *Sulf* 遺伝子群が関与する可能性が強く示唆された。

歯の発生における *Sulf* 遺伝子の機能を解析するために、ノックアウトマウスの歯における表現形の解析を行った。その結果、*Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-}型マウスにおいて歯根の短小化、および象牙質の菲薄化が見られた。これらの結果から、*Sulf* 遺伝子群が象牙質の形成に関与する可能性が強く示唆された。

次に、*Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-}型マウスにおいて歯根の短小化、および象牙質の菲薄化が見られた原因を調べるため、*Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-}型マウスにおける細胞増殖、および、象牙芽細

胞分化マーカーである *Dspp* mRNA の発現を観察した。その結果、抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学染色では、*Sulf1*(-/-); *Sulf2*(-/-)型マウスおよび野生型マウスの下顎臼歯における BrdU 陽性細胞の分布に有意な差は見られなかった。しかし、*In situ hybridization* 法による *Dspp* mRNA の発現観察の結果、野生型マウスの象牙芽細胞層では *Dspp* mRNA の発現が認められたのに対して、*Sulf1*(-/-); *Sulf2*(-/-)型マウスでは *Dspp* mRNA の発現が著しく減少していることが分かった。

Sulf1(-/-); *Sulf2*(-/-)型マウスの象牙芽細胞層における *Dspp* mRNA の発現の低下と HS の硫酸化パターンとの関係について調べるため、*Sulf1*(-/-); *Sulf2*(-/-)型マウスおよび野生型マウスの下顎臼歯における HS の硫酸基付着を、10E4 抗体を利用した免疫蛍光染色法を用いて観察した。その結果、野生型マウスでは内エナメル上皮、象牙芽細胞層の一部を含む間葉組織において 10E4 陽性領域が減少していたが、*Sulf1*(-/-); *Sulf2*(-/-)型マウスではこれらの減少が認められなかった。この結果から、*Sulf1*, *Sulf2* の機能を欠損した結果、硫酸基の加水分解が起こらず、象牙芽細胞の分化が促進しないことが示唆された。

In vivo におけるこれらの結果を *in vitro* において検討するため、歯原性間葉細胞株であるマウス歯乳頭細胞(mDP 細胞)の硫酸基を塩素酸ナトリウム(Chlorate)を用いて人工的に加水分解し、*Dspp* mRNA の発現量を非作用群と比較した。Chlorate とは HS の代謝阻害剤であり、HS の硫酸基を加水分解する作用を持つことが知られている。その結果、Chlorate 添加群における、*Dspp* mRNA の発現が上昇する事が分かった。さらに、Wnt/ β -catenin 経路の下流で発現する *Axin2* mRNA の発現量も上昇していた。この結果から、Chlorate により mDP 細胞表面のヘパラン硫酸鎖の硫酸基が加水分解された結果、Wnt シグナル分子が遊離し Wnt/ β -catenin 経路の活性化と共に *Dspp* mRNA の発現が促進された可能性が示唆された。また、我々は過去に Wnt10a が *Dspp* mRNA の発現に関与する事を発見しており、本実験においても、*Dspp* mRNA の発現に Wnt10a が関与するのかを検討するため、mDP 細胞に Wnt10a を強制発現させ、象牙質形成への影響を検討した。その結果、Wnt10a を強制発現させた mDP 細胞では対照群と比較して *Dspp* mRNA の発現が上昇した。さらに、Chlorate 添加培養液で培養した mDP 細胞に対して Wnt10a を強制発現させた場合、*Dspp* mRNA の発現はさらに上昇した。

これらの結果から、象牙質の形成過程において *Dspp* mRNA の発現を制御する因子が Wnt10a であり、硫酸基加水分解酵素により HS の硫酸基が加水分解された状態では Wnt10a の *Dspp* mRNA 発現に対する作用が増強される事が示唆された。また、*Axin2* mRNA 発現も Wnt10a の強制発現により上昇していた事から、Wnt10a による Wnt/ β -catenin 経路の亢進が象牙芽細胞への分化を促進する可能性が示唆された。

【まとめ】

象牙質の形成において、HS の硫酸基を介したシグナルの制御が象牙芽細胞の分化過程に重要である可能性が示唆された。また、その硫酸化パターンの変化に *Sulf* 関与する可能性が示唆された。さらに、*Sulf* のノックアウトマウスでは象牙質の形成が低下しており、象牙芽細胞層における *Dspp* mRNA の発現が低下していた。これらの結果から、*Sulf* が *Dspp* mRNA の発現に関与する可能性が示唆された。

この結果を *in vitro* において確認するために、mDP 細胞の HS の硫酸基の加水分解を行った。その結果、*Dspp* mRNA の発現の上昇が認められた。さらに、*Axin2* mRNA の発現の上昇が認められたことから、*Sulf* は Wnt/ β -catenin 経路を介して *Dspp* mRNA の発現に関与する可能性が示唆された。

これらの結果から、歯原性間葉細胞から象牙芽細胞への分化の過程において、HS の硫酸基が加水分解され、Wnt リガンドが HS 鎖から遊離した結果、Frizzled 等の受容体を介し、Wnt/ β -catenin 経路が活性化され、細胞分化が促される可能性が強く示唆された。

さらに、*Sulf* が HS に結合する硫酸基を加水分解することにより歯原性間葉細胞から象牙芽細胞への分化が促進されるという可能性が示唆された。