授与番号　　甲第 353 号

論文内容の要旨

LPA$_6$-RhoA singal regulates junctional complex for establishment of polarity and morphology of Maturation stage ameloblasts

－LPA$_6$-RhoA シグナルは、成熟期エナメル芽細胞の極性および細胞形態を確立するための細胞接着複合体を制御する－

（稲葉陽、原田英光、池崎晶二郎、熊上深香、荒井春野、東根まりい、大島勇人、森川和政、可野邦行、青木敦賢、大津圭史）

（Journal of Oral Biosciences　令和４年掲載予定）

稲葉（いなば）　陽（あきら）

Ⅰ．研究目的

エナメル質は生体で最も高度な石灰化組織であり、この石灰化は成熟期エナメル芽細胞による基質の分解吸収とミネラル輸送によって行われている。成熟期エナメル芽細胞の分化や機能は、時空間的に厳密に制御されている一方、その破綻は低石灰化型エナメル質形成不全を引き起こし、知覚過敏、審美障害などにより患者の QOL を低下させる。従って、成熟期エナメル芽細胞制御メカニズムの解明は、低石灰化型エナメル質形成不全の病因・病態の理解や予防・診断・治療法の開発のために極めて重要である。近年、生理活性脂質メディエイターのひとつであるリゾホスファチジン酸(Lysophosphatidic acid：LPA)とその受容体 LPA$_6$ が RhoA シグナルを介して毛包の発生を制御すること、LPA$_6$ 遺伝子異常がヒト先天性乏毛症を引き起こすことが明らかとなったが、同じ外胚葉付属器である歯の発生における LPA シグナルの役割はほとんどわかっていない。一方、我々はこれまでに、RhoA シグナルが細胞形態・極性を介してエナメル芽細胞を制御することを明らかにしてきた。このような背景から本研究では LPA$_6$-RhoA シグナルが成熟期エナメル芽細胞制御に関わるのではないかと考え、検証を行った。

Ⅱ．研究方法

１．エナメル芽細胞における LPA$_6$ および LPA 合成酵素の発現パターンを明らかにするため、マウス上顎切歯のパラフィン切片を作製し、LPA$_6$ と LPA 合成酵(PA-PLA1a、autotaxin)の免疫染色を行った。

２．歯の発生における LPA$_6$ の役割を明らかにするため、LPA$_6$ ノックアウト(KO)マウスの組織解析を行った。上顎切歯のパラフィン切片を作成し、HE 染色および細胞接着タ

ンパク E-cadherin(E-cad)、Zonula Occluden-1(ZO-1)の免疫染色法を行った。

3．LPA-LPA_6 シグナルの細胞間接着・細胞骨格に対する影響を明らかにするため、培養エナメル芽細胞株 HAT7 および mHAT9d に対して、LPA 添加、および LPA_6-siRNA を導入したのち、E-cad、ZO-1 および細胞骨格因子 F-actin の発現を解析した。

4．LPA-LPA_6 と RhoA シグナルの関係を明らかにするため、エナメル芽細胞株に対して LPA、Rho シグナル阻害剤 Y27632、アクチン重合阻害剤 Latrunculins A(LAT-A)を添加して、RhoA の活性化について検討した。同時に E-cad、ZO-1、F-actin の免染染色を行った。

Ⅲ．研究成績

1．マウス上顎切歯の LPA_6 の免疫染色において、内エナメル上皮では LPA_6 の発現はほぼ認められなかった。基質形成期エナメル芽細胞では LPA_6 は細胞質全体に弱く発現する一方、成熟期エナメル芽細胞では、細胞の近遠心端に強い発現を認めた。また、LPA 合成酵素の PA-PLA1a とオートタキシン(ATX)も LPA_6 同様、成熟期エナメル芽細胞で強い発現がみられた。

2．LPA6 KO マウス切歯において、内エナメル上皮、基質形成期エナメル芽細胞では細胞に変化が見られない一方、成熟期エナメル芽細胞では細胞形態の異常、細胞極性の喪失が見られ、上皮層の一部に嚢胞様構造が認められた。野生型(WT)マウスでは、E-cad は成熟期エナメル芽細胞と乳頭層の細胞膜に強く発現し、ZO-1 は成熟期エナメル芽細胞の遠心端と近心端に限局していた。一方、LPA_6 KO マウスの成熟期エナメル芽細胞では、E-cad と ZO-1 の発現が顕著に減少した。

3．HAT7 と mHAT9d に LPA を添加すると、細胞膜における E-cad、ZO-1、および F-actin タンパクの発現が増加した。さらに、LPA_6 特異的 siRNA を HAT7 に導入すると、細胞膜での E-cad、ZO-1、F-actin タンパクの発現が著しく減少した。また、この LPA_6 ノックダウン細胞では、LPA を投与しても E-cad、ZO-1、F-actin の発現は回復しなかった。さらに、LPA_6 ノックダウン細胞では、E-cad mRNA の発現は減少するが、ZO-1 mRNA の発現は減少しなかった。

4．LPA_6 KO マウスでは WT と比較して、成熟期エナメル芽細胞近心端における活性型 RhoA（GTP 結合型）の発現が顕著に減少した。逆に、mHAT9d への LPA 投与は、培養液に面した側での活性型 RhoA の発現を増加させた。また、LAT-A および Y27632 は、HAT7 細胞膜における E-cad、ZO-1、F-actin タンパクの発現を減少させた。一方、E-cad mRNA は Y27632 によって有意に減少したが、LAT-A では影響を受けなかった。また ZO-1 mRNA は、Y27632 と LAT-A によってわずかに増加した。

Ⅳ．考察及び結論

１．成熟期エナメル芽細胞では、LPA_6 と LPA 合成酵素が強く発現していた。このことから、LPA-LPA_6 シグナルはオートクライン/パラクライン様式で成熟期エナメル芽細胞を制御していることが示唆された。また、LPA6 KO マウスでは、活性型 RhoA の発現が成熟期エナメル芽細胞近心端で顕著に減少することから、LPA-LPA_6 シグナルは成熟期エナメル芽細胞の近心端側の極性制御に寄与していると考えられた。

２．LPA-LPA_6-RhoA シグナルは、E-cad の転写を制御することで、Adherence junction(AJ)の形成に関与する可能性が考えられた。また、本シグナルは ZO-1 の発現量には関与していなかったが、細胞膜での局在維持に関与することで Tight junction(TJ)の安定化に寄与すると考えられた。

本研究により、LPA-LPA_6-RhoA シグナルが、成熟期エナメル芽細胞における細胞接着タンパク発現および細胞骨格の安定化を行い、細胞形態・極性の確立に寄与することを明らかにした。これらの結果は、正常なエナメル質形成における生理活性脂質の新たな役割を提示するだけでなく、このシグナルの破綻がエナメル質形成異常の原因となる可能性を示唆している。これまで、LPA_6 や LPA 合成酵素遺伝子に異常を持つ先天性乏毛症患者については症例数の少なさから、遺伝性エナメル質形成不全症との関連性については明らかになっていない。しかし、本研究の結果は、LPA-LPA_6 シグナルの異常とエナメル質形成不全との関連を強く示唆するものであり、将来的にはゲノム情報を含めた大型コフォート調査によって、これらの関連性が明らかになる可能性がある。さらに外胚葉異形成症や molar incisor hypomineralisation(MIH)など、エナメル質形成異常を示す疾患が環境と遺伝性の複合的な要因によるとも考えられており、LPA-LPA_6-RhoA シグナルの異常がエナメル質形成不全のリスク要因になるかを今後の研究において明らかにしたいと考えている。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査　入江　太朗　教授　（病理学講座病態解析学分野）
副査　森川　和政　教授　（口腔保健育成学講座小児歯科学・障害者歯科学分野）
副査　原田　英光　教授　（解剖学講座発生生物・再生医学分野）

論文審査の結果の要旨

エナメル質の石灰化は、成熟期エナメル芽細胞による基質の分解吸収とミネラル輸送によって行われており、その破綻は低石灰化型エナメル質形成不全を引き起こして患者の QOL を低下させる。従って、成熟期エナメル芽細胞制御メカニズムの解明は、低石灰化型エナメル質形成不全の病因・病態の理解や予防・診断・治療法の開発のために極めて重要である。我々はこれまでに、RhoA シグナルが細胞形態・極性を介して基質形成期エナメル芽細胞を制御することを明らかにしてきたが、成熟期エナメル芽細胞と RhoA シグナルの関係は不明であった。そんな中近年、先天性乏毛症患者において、生理活性脂質のひとつであるリゾホスファチジン酸(Lysophosphatidic acid：LPA)の合成酵素や LPA 受容体 LPA_6 に遺伝子異常が見られること、またマウスにおいて LPA-LPA_6 シグナルが RhoA シグナルを介して毛包の発生を制御していることが報告された。毛は歯と同じ外胚葉性付属器であり、制御シグナルに共通のものも多い。このような背景から、LPA-LPA_6-RhoA シグナルが成熟期エナメル芽細胞を介してエナメル質石灰化を制御しているのではないかと考え、この仮説を検証することを本研究の目的とした。

歯の発生における LPA を介したシグナルを、モデルマウスおよび培養エナメル芽細胞を用いて解析した結果、次のような結果が得られた。

①LPA_6 と LPA 合成酵素 PA-PLA1α、Autotaxin(ATX)が、成熟期エナメル芽細胞近遠心端に
　強く発現した。

②LPA_6 KO マウスでは、成熟期エナメル芽細胞に形態の異常、および極性の喪失を認めた。

③LPA-LPA_6 シグナルが、成熟期エナメル芽細胞の RhoA 活性化を誘導した。

④LPA-LPA_6-RhoA シグナルが、細胞接着・細胞骨格を安定化させた。

以上のことから、LPA-LPA_6-RhoA シグナルが、成熟期エナメル芽細胞において細胞形態・細胞極性を制御することが明らかになった。本結果から、LPA-LPA_6-RhoA

シグナルが正常なエナメル質形成に重要な役割を担うことが示唆された一方、このシグナルの破綻が低石灰化型エナメル質形成不全症の要因となりうると考えられた。

本研究は、歯の発生における生理活性脂質メディエイターの新たな役割を提示したものである。その成果は、将来的に LPA-LPA_6-RhoA シグナル関連分子をターゲットとする診断法・予防法・治療薬の開発に貢献できると考えられる。したがって、本論文は基礎的・臨床的意義の大きいものであり、学位論文に値すると評価した。

試験・試問の結果の要旨

最初に本論文の目的、概要について説明がなされた。次いで研究方法、結果ならびにその考察と臨床的意義、今後の研究展開について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、今後の研究に対しても意欲的であり、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。

主査・副査から多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

問：成熟期エナメル芽細胞において、RA と SA をどのように判別するのか？

答：成熟期エナメル芽細胞は、Ruffle ended ameloblast (RA)と Smooth ended ameloblast (SA)が繰り返し配列されている。RA は、細胞遠心端に細胞質突起からなるフリル状の境界を形成し、この突起の間に、H^+や Ca^{2+}の放出、Na^+吸収を行うためのチャネルが液胞状に認められる。一方、SA 遠心端は、平滑かわずかに起伏を認める。また、RA 遠心端はタイトジャンクション(TJ)により細胞間結合しているのに対して、SA 遠心端では細胞接着の喪失あるいは漏出が認められる。これらのチャネルや細胞接着のマーカータンパクについて免疫蛍光染色を行うことで、より詳細に RA と SA を判別できると考える。

問：WT と LPA_6 KO マウス切歯の HE 染色像で、エナメル芽細胞の各分化ステージの範囲に差が認められるように見える理由は？

答：本研究で使用したマウス上顎切歯矢状断の薄切切片は、その作成過程において、サンプルのパラフィン包埋や切り出し時の角度調節などバイアスを生む様々な要因がある。本研究で用いた切片も例外ではなく、現在もより良い切片作成法を模索中である。

問：in vitro 実験における E-cad、ZO-1、F-actin の発現について、「発現の増加・減少」→「局在の増加・減少」とするべきではないか？

答： in vitro 実験において、これらの因子の発現は、免疫蛍光染色の差から増加・減少と表現した。しかし、実際のタンパク発現量は解析しておらず、分子の集積度の違いを反映しているだけの可能性が考えられるため、改めたい。

問：LPA6 KO マウス成熟期エナメル芽細胞の遠位端における RhoA 活性化の制御機序は、何が考えられるか

答：成熟期エナメル芽細胞の遠心端側の基底膜は、エナメル質とヘミデスモゾーム結合しており、細胞接着分子である Integrin が重要な働きを担う。また、Integrin β6 KO マウスにおいて、基底膜に存在する ODAM の発現と RhoA 活性化が低下するということがこれまで明らかになっている。これらのことから、Integrin-ODAM-ARHGEF5 シグナルが成熟期エナメル芽細胞遠心端の RhoA 活性化に寄与していると考える。

問：小児歯科学分野において、歯牙形成や上皮組織に異常がみられる疾患はありますか？また、その要因は何ですか？

答：①外胚葉異形成症が該当する。疎な頭髪や多数歯先天欠損が特徴で、残存する歯には矮小歯・円錐歯などが認められる。主に、細胞膜に存在する膜貫通タンパクである Ectodysplasin A 遺伝子(EDA)の突然変異により生じるとされ、中でも EAD-A1 異常が、毛包・汗腺・歯牙の発生に最も影響を及ぼすとされている。(Kurban et, al. Dermatology 2010;221:243–247) ②先天性色素失調症もこれに該当する。本疾患は、X 染色体上にある IKBKG 遺伝子の突然変異により引き起こされるため、女性に多く発症し、男性は致死的であるとされている。主な口腔内症状は、乳歯および永久歯の多数歯欠損や残存歯の形成不全であり、皮膚紅斑や表皮剥離なども認められる。 (Marques et, al. Ana Bras Dermatol. 2014;89(3):486-9.)

問：Molar Incisor Hypomineralization (MIH)の病因となりうる遺伝要因・環境要因は、どのようなものが挙げられるか？

答：現在の小児歯科学分野においてMIHの原因は不明となっているが、疾患に関連が深いとされる遺伝要因・環境要因がいくつか報告されている。例えば、エナメルタンパクを分解する役割を持つENAMやMMP20の遺伝子異常が、MIHと関連の強い遺伝要因であると示唆されている。 (Hočevar, et al. Archives of Oral Biology 118 (2020) 104848) 一方、周産期要因である低酸素症や帝王切開、未熟児の機能不全などにより生じる低酸素状態が、環境要因として関連性が強いとされている。 (Garot et, al. European Archives of Paediatric Dentistry) また、血中ビタミンD濃度低下がMIHの環境要因であるという報告もある。 (Kuhnisch et, al. Journal of Dental Research

2015, Vol. 94(2) 381–387）これらのように近年、エナメル質形成異常を示す疾患が、複数の遺伝要因や環境要因の組み合わせにより一定の閾値を超えた場合発症する「多因子疾患」であることが示唆されている。

本研究で用いた LPA_6 KO マウス切歯には、エナメル質形成不全のフェノタイプが認められなかった。このことから、LPA-LPA6-RhoA シグナルの異常だけでなく、他の遺伝要因や環境要因が加わることで形成不全が引き起こされると考えている。