

論 文 題 目

ラット歯原性上皮細胞株の

機能調節とカルシウム応答

平成 27 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

村田 佳織

【緒言】

歯胚は上皮細胞と、間葉系細胞の集団から形成されており、上皮間葉相互作用を通して、規則正しい細胞の配列や細胞遊走、一定の細胞増殖と細胞分化、さらに細胞死の調節が行われ、歯の形態形成が進行する。このような組織発生では、細胞集団の協調した遺伝子発現と細胞遊走による形態形成が重要である。

細胞内のCa²⁺はセカンドメッセンジャーとして様々な細胞機能の調整に関与している。特に、ストア作動性カルシウム流入 (SOCE) の関連分子であるStim1, Orai1の遺伝子異常による、骨形成やエナメル質形成不全が報告されている (Feske et al., 2005) ことから、細胞内Ca²⁺濃度の変化 (Ca²⁺応答) がエナメル質形成における遺伝子発現や細胞遊走の調節を制御している可能性が考えられる。

本研究ではラット歯原性上皮細胞株であるSF2細胞を使って、活性型ビタミンD3 (VD3) の添加による分化誘導を実験モデルとし、Ca²⁺動態の変化とSOCEとの関係を解析した。また、細胞遊走に伴うCa²⁺動態とSOCEの関係を明らかにした。

【材料および方法】

ラット歯原性上皮細胞株 (SF2細胞) は東北大学福本教授より供与された。

(1) 増殖能測定 : VD3添加による細胞増殖能の変化を確認するために、経時的变化とVD3濃度による変化を観察した。経時的变化の解析ではSF2細胞を1x10⁵ cells/mlで播種し、細胞定着後 (24時間後)、VD3を100 nM添加し、1, 3, 5, 7および10日間培養後の細胞数を血球計算板を用いて測定した。濃度による変化の解析では、VD3を3, 10, 30および 100 nM添加して3日間培養後の細胞数を測定した。

(2) 免疫蛍光組織化学染色 : SF2細胞を1x10⁵ cells/mlで播種し、VD3を100 nM添加し、24時間および72時間培養後に固定および染色を行い、コネクシン43 (CX43), アメロブラスチン (AMBN) の発現を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) 石灰化能の解析 : SF2細胞をアスコルビン酸, β-glycerophosphate添加石灰化誘導培地でVD3添加, 非添加で, CaCl₂を0 mM, 1 mMまたは2 mM添加し, 10日間培養後, アリザリンレッドS染色およびALP assayを行った。ALP活性に対する阻害剤の影響の解析では、細胞定着後に培養液にCa²⁺応答の阻害剤を加えて、3, 5, 7および10日間培養

を行ったのち、アリザリンレッドS染色およびALP assayを行った。

(4) ライブセルイメージング観察：SF2細胞にCa²⁺センサーであるG-GECOを遺伝子導入し、培養条件下（37°C，5% CO₂）でのCa²⁺応答を共焦点レーザー顕微鏡にてライブセルイメージング観察した。また、SF2細胞に高感度Ca²⁺センサーであるYC-nano50を遺伝子導入し、落射蛍光および全反射照明（TIRF）を使った蛍光顕微鏡システム（AQUACOSMOS）を用いて培養条件下（37°C，5% CO₂）でのCa²⁺応答と細胞遊走をライブセルイメージング観察した。

(5) 遊走能測定：96 well plateを使ったOris™ Cell Migration Assayを用いて遊走能の定量解析を行った。

【結果】

SF2細胞をVD3の存在下で培養すると、添加3日後から細胞増殖活性が有意に減少した。また免疫蛍光組織化学染色ではVD3存在下でCX43, AMBNの発現増加が認められた。さらに石灰化培地で培養を行うとVD3存在下では石灰化物の沈着およびALP活性の上昇が認められた。

培養中のSF2細胞のライブセルイメージング観察において、間欠的に細胞内Ca²⁺濃度が上昇するCa²⁺応答が観察され、VD3刺激によってその頻度が有意に増加した。このCa²⁺応答は、SOCE阻害薬であるLaCl₃では抑制されなかった。非選択的Ca²⁺流入阻害薬であるCdCl₂ではCa²⁺応答の抑制効果がみられたが完全には阻害されなかった。一方、小胞体Ca²⁺-ATPase阻害薬のタプシガルギン（ThG）とLaCl₃の併用によってCa²⁺応答が抑制された。このCa²⁺応答の増加と、分化誘導の関連を調べるためにALP assayにて評価を行ったが、代謝型グルタミン酸受容体阻害薬（LY341495）、プリン受容体阻害薬（PPADS）、ホスホリパーゼC阻害薬（U73122）、イノシトール三リン酸受容体およびCa²⁺流入阻害薬（2-APB）は、VD3によるALP活性の上昇に対する阻害作用を示さなかった。

高感度Ca²⁺センサーであるYC-nano50を使った解析では、血清の存在下で間欠的で小さなCa²⁺応答が高頻度で観察され、細胞の辺縁部で細胞突起の活発な運動と細胞の移動が観察された。LaCl₃によるSOCEの阻害によって、Ca²⁺濃度と遊走性の低下が認められた。TIRFによる観察では、細胞底面全体でCa²⁺濃度が低下し、細胞突起の退縮や

運動性の低下が起こることが明らかになった。定量的遊走能測定ではメEDIUM単独と比較して、血清による細胞遊走能の増加が認められ、これはLaCl₃の添加によって抑制された。上皮成長因子（EGF）とケモカイン（CXCL12）の共添加でも遊走性の亢進が認められたが、これはLaCl₃によって抑制されなかった。

【考察】

本研究ではSF2細胞をVD3存在下で培養すると、細胞増殖能の低下、石灰化の亢進、そしてエナメルマトリックスタンパク（AMBN）の発現上昇をおこしたことから、VD3によってSF2細胞の分化が誘導されたことが示唆された（Kawano et al., 2002, Fukumoto et al., 2004）。また、VD3の添加によりSF2細胞の間欠的Ca²⁺応答の頻度が増加した。この反応は細胞外からのCa²⁺流入を阻害しても完全には抑制されなかったことから、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）を介した小胞体からのCa²⁺放出の関与が示唆される。さらに、ThGとLaCl₃を併用によって、小胞体からのCa²⁺放出とSOCEを阻害するとVD3によるCa²⁺応答の増加がほぼ完全に抑制された。この結果から、VD3はストアからのCa²⁺放出を増加させることによってCa²⁺応答の頻度を増加させることが確認された。VD3がエナメル芽細胞の分化を誘導することが示唆されたため、VD3によるSF2細胞の分化誘導への影響をCa²⁺応答の阻害薬を用いてALP assayで評価したが、これらの阻害剤はVD3によるALP活性の増加に対する抑制作用を示さなかった。これらの結果から、VD3によっておこるCa²⁺応答はVD3による石灰化の亢進に直接的には関連しないと考えられる。

YC-Nano50を使った解析によって、VD3刺激がなくても小さな間欠的Ca²⁺応答が高頻度で起こることが明らかになった。血清存在下では細胞の遊走性の亢進が認められ、LaCl₃の添加により、Ca²⁺濃度の低下と共に、細胞遊走能が著しく低下した。このことからG-GECOでは検出できない小さな局所的Ca²⁺応答が細胞遊走に関与することが示唆された。定量的遊走能の解析では血清の他に、EGFとCXCL12の共添加でも遊走性の亢進が認められた。EGFとCXCL12の共添加による遊走性の亢進に対して、LaCl₃の添加は抑制効果を示さなかった。これらのことから、細胞遊走にはCa²⁺依存性の経路と、非依存性の経路が存在することが考えられる（Yokohama-Tamaki et al., 2015,

Kurosaki et al., 2000).

【結論】

活性型ビタミンD3はラット歯原性上皮細胞を分化させ、Ca²⁺応答の頻度を増加させた。SOCEを介するCa²⁺応答は、ラット歯原性上皮細胞の細胞遊走に關与する可能性が示唆された。

【文献】

Feske S, Prakriya M, Rao A & Lewis R S. A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med* 202: R651-R662,2005.

Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach P H, Nanci A, Kulkarni A B & Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* 167: R973-R983,2004.

Kawano S, Morotomi T, Toyono T, Nakamura N, Uchida T, Ohishi M, Toyoshima K & Harada H. Establishment of dental epithelial cell line (HAT-7) and the cell differentiation dependent on Notch signaling pathway. *Connect Tissue Res* 43: R409-R412,2002.

Kurosaki T, Maeda A, Ishiai M, Hashimoto A, Inabe K & Takata M. Regulation of the phospholipase C-gamma2 pathway in B cells. *Immunol Rev* 176: R19-R29,2000.

Yokohama-Tamaki T, Otsu K, Harada H, Shibata S, Obara N, Irie K, Taniguchi A, Nagasawa T, Aoki K, Calvari S R, Weisgerber D W & Harley B A. CXCR4/CXCL12 signaling impacts enamel progenitor cell proliferation and motility in the dental stem cell niche. *Cell Tissue Res* 362: R633-R642,2015.