

〔学位論文〕

歯胚の発育過程におけるエピジェネティクス関連酵素HDACsと糖代謝関連因子の関与

佐々木 由希子

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系 小児歯科学分野

Regulation of Histone deacetylases and glucose transporters in mouse tooth development

Yukiko SASAKI

Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : 歯胚発生, エピジェネティクス, FOXO, GLUTs

緒 言

エピジェネティクスは塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現を制御する現象の総称であり、発生・分化の制御に関わる重要なメカニズムで、DNAメチル化やヒストン修飾がその代表である。ヒストン修飾では、アセチル化・メチル化・リン酸化などが知られ、なかでもヒストンのアセチル化・メチル化はエピジェネティクス制御の中心的な役割を果たすとされているが、その他にも脱アセチル化や脱メチル化など、多くの修飾が報告されている。

ヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylases : HDACs) はヒトで18種類同定され、4クラスに分類されている。中でも、クラスIとIIは活性中心に亜鉛をもち、水分子を活性化してアミド結合を切断する加水分解酵素である。クラスIにはHDAC1/2/3/8が属し、ユビキタスに発現分布し組織特異性に劣る。クラスIIaに属するHDAC4/5/7/9は脳、心臓、骨格筋という高い糖代謝を示す臓器に発現する。これらクラスIIaのHDAC4/5/7によるグルコース代謝の調節が知られており、グルカゴンの作用により脱リン酸化して核内に移行し、クラスIのHDAC3およびForkhead box type O (FOXO) 転写因子の脱アセチル化を介して糖新生に関連する遺伝子の転写を誘導する。インスリン作用時には、リン酸化HDAC4/5/7

は核内への移行ができず、アセチル化FOXOはプロモーターへの結合親和性を減じて、糖新生関連遺伝子を転写することができなくなる。このように、HDACsを介してエピジェネティクスは糖代謝に関連する。しかしながら、歯胚の発育過程におけるエピジェネティクス関連因子の報告はない。

そこで本研究では、マウスの帽状期から歯根形成期までの歯胚発育過程6段階において、HDACsとそれに関連する転写因子であるFOXO、そして糖の細胞内への取り込みに関わるglucose transporters (GLUTs) の局在について免疫組織化学的に検証し、併せてグリコーゲンの蓄積をPeriodic acid-Schiff (PAS) 反応で検出した。

対象および方法

対象には、Jcl : ICRマウスを用いた。自家交配を行いプラグチェックし、胎生14日 (帽状期)、胎生17日 (鐘状期初期)、生後1日 (鐘状期中期)、生後5日 (鐘状期後期)、生後10日 (歯冠形成期)、生後17日 (歯根形成期) の胎仔マウスを摘出しパラホルムアルデヒドにて固定を行った。固定終了後、4%エチレンジアミン四酢酸にて30日間脱灰を行った。通法に従いパラフィン切片を作製し、抗HDAC3抗体、抗HDAC5抗体、抗HDAC7抗体、抗FOXO1, 3, 4抗体、抗GLUT1抗体および抗GLUT3抗体による免疫組織染色およびPAS染色を行っ

た。

結果および考察

マウス胎生14日の下顎第一臼歯帽状期歯胚では、歯堤においてHDAC5, HDAC7, GLUT3およびFOXOの発現とPAS陽性反応が一致して認められ、歯胚周囲間葉組織ではHDAC3, GLUT3, FOXOの発現とPAS陽性反応が一致して認められた。HDACsとグリコーゲンの局在が一致することが示され、歯堤と歯胚周囲間葉組織においてグルコース代謝とHDACsとの関与が推測される。

胎生17日の鐘状期初期歯胚では歯堤において、HDAC3, HDAC5, HDAC7, GLUT1, GLUT3およびFOXOの発現を認め、PAS反応も陽性であった。これらのことから、歯堤分化の時期にグルコース代謝やグリコーゲンの蓄積が確認でき、HDACsが同時期に働いていることが示唆された。星状網においても、HDAC3, HDAC5, GLUT1およびFOXOの発現が認められPAS反応も陽性であったことから、星状網でもグルコース代謝、グリコーゲンの蓄積にHDACsが何らかの働きをしていることが考えられた。歯堤と星状網においてGLUT1と同部位に局在を認めたHDACsとFOXOも歯胚の形態形成に関与が示唆された。また、歯乳頭におけるHDACsとFOXOの発現および歯乳頭の赤血球におけるGLUT1の発現から、エナメル器への栄養供給のためのグルコース代謝にもHDACsが働いていることが示唆された。

内エナメル上皮がエナメル芽細胞と中間層細胞に分化し、咬頭形成が始まる生後1日の鐘状期中期歯胚では、HDAC3やFOXOの反応は星状網歯堤側に限局的であり、これらの発現がみられなかった星状網歯乳頭側の中間層にGLUT1とGLUT3の発現およびPAS陽性反応を認め、グルコースやグリコーゲンの存在を示す部位とHDACsは共局在を示さなかった。このことから、生後1日の星状網歯乳頭側におけるグルコース代謝には既にHDACsは関与していないと考えられた。Pelletierらの報告(2012)によると、グリコーゲンの合成は低酸素状態で誘導されるが、GLUT1の発現により赤血球が豊富にあることが確認できた星状網歯堤側では血管から酸素や栄養が供給されるため、グリコーゲンの蓄積がみられなかったものと推測される。

生後5日では、生後1日までに比較してすべての発現および反応が弱く、生後1日で特徴的であった中間層の発現も減弱を認めた。生後10日と15日では、歯髄にHDAC3, FOXO, GLUT3の発現およびPAS陽性反応を認めた。歯髄に神経線維がみられるようになるのが生後10日であるとのChiego Jrらの報告(1995)や、歯髄にグ

リコーゲン含有細胞が出現する時期と神経が歯髄内に侵入する時期が一致するとのOhshimaらの報告(1999)と今回の結果が合致するものであった。またFOXOがグルコース代謝に関与するというKodamaらの報告(2004)もあることから、歯髄の成熟にFOXOも関与していることが示唆された。FOXOはエナメル質の成熟に必須であるとの報告もあり、生後10日のエナメル芽細胞においてFOXOとHDAC3も発現が認められ、エナメル芽細胞の成熟にHDAC3も何らかの役割を担っていることが推測される。

以上のように、エピジェネティクス関連酵素HDACsが歯胚発育初期の形態形成に、発育後期の歯髄の成熟において、時期・組織特異的な遺伝子発現の調整に何らかの関与があることが示唆された。

結 論

本研究より、マウス歯胚において帽状期に歯堤と歯胚周囲間葉組織にHDACsとグルコース代謝関連因子の局在が一致して認められ、鐘状期初期になると星状網と歯乳頭でもHDACsとグルコース代謝関連因子の局在が一致していることが確認された。生後の歯冠形成期および歯根形成期には、歯髄組織とエナメル芽細胞においてHDAC3とグルコース代謝関連因子の局在の一致が認められた。また、細胞分化に必要とされるグルコース代謝にHDACsが関与していることが示唆されたが、時期によってその部位も異なることが明らかとなった。また、歯胚発生過程においてGLUT1の反応を示す赤血球が星状網歯乳頭側に認められず、GLUT3およびPAS陽性反応が星状網中間層細胞にみられることから、血管の侵入が乏しい星状網歯乳頭側では、酸素の乏しい環境であり、低単糖環境下でグルコースを選択的に細胞内に輸送するGLUT3が強発現し、グリコーゲンの蓄積を認めた星状網中間層細胞はHDACsに依存しないエネルギー代謝で生存していることが示唆された。

以上のように、エピジェネティクス関連酵素HDACsが歯胚発育初期の形態形成に、発育後期の歯髄の成熟において、時期・組織特異的な遺伝子発現の調整に関与していることが示唆された。



佐々木 由希子

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野

平成18年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成25年3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了