

Identification of GPI-anchored protein LYPD1 as an essential factor for odontoblast differentiation in tooth development

傅, 堯

<https://hdl.handle.net/2324/7157312>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (歯学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives International

氏 名 : 傅 堯

論 文 名 : Identification of GPI-anchored protein LYPD1 as an essential factor for odontoblast differentiation in tooth development
(前象牙芽細胞に特異的に発現する GPI アンカー型タンパク質 *Lypd1* の同定および分化制御機構の解明)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

細胞膜は脂質二重層を形成し、所々に不均質な細胞膜分子の集合体が認められる。脂質ラフトは、コレステロール、スフィンゴ脂質、GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) および受容体に富む膜マイクロドメインである。脂質ラフトが活性化されると、凝集して大きなプラットフォームを形成し、膜輸送、シグナル伝達、細胞接着などの細胞機能を担う。これまで、脂質ラフトはシグナル伝達や器官形成に不可欠であることが報告されていたが、歯の発生に及ぼす影響についての報告は少ない。そこで、歯の発生期に特異的に発現する GPI-AP の同定とその機能解明を目的として研究を行った。

胎生 14 日齢 (E14) マウス臼歯歯胚を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、歯乳頭に特異的に発現する GPI-AP である Ly6 lymphocyte antigen-6 (Ly6)/Plaur domain-containing 1 (*Lypd1*) を同定した。次に、E16 マウス臼歯歯胚を用いて scRNA-seq 解析により単一細胞遺伝子発現解析を行ったところ、*Lypd1* が前象牙芽細胞クラスターに特異的に発現することが判明した。さらに、Monocle 3 を用いて軌跡解析を行った。Trajectory 解析により、歯原性間葉幹細胞の集団である DMSC は、preodontoblast もしくは dental follicle に分岐しながら分化することが判明した。さらに、DMSC クラスターを起点として pseudotime 解析を行ったところ、DMSC マーカーである *Dlk1* が初期にピークを示したのに対し、*Lypd1* は、preodontoblast マーカーとして知られる *Fgf3* と同様に、後期にピークを示した。以上の結果より、*Lypd1* が前象牙芽細胞の新規マーカーとして有用である可能性が示唆された。

次に、qRT-PCR 法および ISH 法にて *Lypd1* の発現パターンを確認したところ、*Lypd1* は歯および脳で発現が高く、前象牙芽細胞の分化過程において発現が上昇し、前象牙芽細胞に局在することがわかった。LYPD1 は GPI-AP に属することから、LYPD1 が脂質ラフトに局在しているかどうかを調べるために、密度勾配超遠心法を用いて検討を行った。歯原性間葉細胞株 mDP 細胞を用いて界面活性剤不溶性画分を分離したところ、脂質ラフトに存在することで知られる Caveolin-1 と同様の不溶性画分に LYPD1 を認め、脂質ラフト阻害剤である MBCD 処理により、他の画分に移動した。

次に、ex vivo 器官培養法を用いて LYPD1 の歯の発生与える影響について検討した。*Lypd1* siRNA を遺伝子導入し、*Lypd1* の発現を抑制すると象牙芽細胞分化マーカーである *Panx3*、*Alpl* および *Dspp* の発現が抑制された。また、免疫組織染色法を用いて組織学的に検討したところ、対照群の象牙芽細胞は、一層に配列された柱状の形態を示したが、*Lypd1* siRNA

導入群では、核の極性が失われ多層化した象牙芽細胞を認めた。さらに、脂質ラフトの歯胚発生に与える影響を確認するため、脂質ラフトの抑制剤である M β CD、Simvastatin および Fumonisin B1 を用いて検討したところ、*Lypd1* および象牙芽細胞分化マーカー遺伝子の発現の減少を認めた。

脂質ラフトは細胞膜分子の凝集を引き起こし、細胞膜受容体からのシグナル伝達経路を調節していることが知られている。LYPD1 がどのシグナル伝達経路に関与しているかを調べるために、様々なシグナルカスケード分子のリン酸化を Western blot 法を用いて解析したところ、*Lypd1* を抑制すると Smad1/5/8 のリン酸化が抑制されることを確認した。Smad1/5/8 は BMP シグナル伝達経路の下流因子として知られている。そこで、mDP 細胞に BMP2 を添加すると、Smad1/5/8 のリン酸化を介して象牙芽細胞の分化が促進されたが、*Lypd1* を抑制すると Smad1/5/8 のリン酸化および細胞分化が抑制された。一方、M β CD 添加による脂質ラフト阻害は Smad1/5/8 だけでなく、Akt および β -catenin のリン酸化を抑制した。以上の結果から、脂質ラフトはシグナル伝達経路のプラットフォームとして機能し、LYPD1 は BMP/Smad シグナル伝達経路に影響を与えている可能性が示唆された。

GPI-AP は、GPI アンカーによって細胞膜に固定されている一群の膜タンパク質である。GPI-AP の細胞膜および脂質ラフトへの局在は、その C 末端側に存在する omega 領域が必要とされる。そこで、LYPD1 の全長発現ベクター (LYPD1-FL) および omega 領域を欠失させた発現ベクター (LYPD1- Δ GPI) を作製し、GFP による可視化を行った。次に、mDP 細胞に作成した発現ベクターを遺伝子導入したところ、コントロールである mock-GFP を導入した細胞と比べて、LYPD1-FL-GFP 陽性細胞は、その形態を紡錘状に変化させた。一方で、LYPD1- Δ GPI-GFP 陽性細胞では、コントロール細胞と同様な形態を示した。さらに、LYPD1-FL および LYPD1- Δ GPI の発現ベクターを mDP 細胞に遺伝子導入したところ、LYPD1-FL 群は、LYPD1- Δ GPI 群に比べ、歯の分化マーカーである *Panx3* および *Dspp* の発現が有意に上昇することが確認された。この結果から、LYPD1 の omega 領域は mDP 細胞の形態変化および象牙芽細胞の分化に重要であることが判明した。

以上の結果より、*Lypd1* は前象牙芽細胞に特異的に発現し、新規前象牙芽細胞マーカーとして有用である可能性を示した。また、LYPD1 および脂質ラフトは、歯の発生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、LYPD1 の GPI 構造ドメインは、象牙芽細胞の分化に関与することがわかった。本研究により、LYPD1 は BMP/Smad シグナル伝達経路に GPI-AP として関与することで、象牙芽細胞の分化を制御していることが示された (右図)。本研究成果は、脂質ラフトによるシグナル伝達経路の調節を介した細胞分化制御機構の解明に役立つものであり、今後の歯の発生メカニズムの解明や歯の再生医療技術の開発につながることを期待される。



