

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11359

研究課題名(和文)13番染色体異常による硬組織への影響

研究課題名(英文)Influence of chromosome 13 abnormality on hard tissue

研究代表者

齋藤 幹 (SAITO, KAN)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：40380852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Sox21KOとWTマウスから骨芽細胞を回収し、骨代謝マーカーの発現を調べた。その結果、Sox21KOマウスでは発現量減少が観察されなかった。次に破骨細胞への影響を疑い、脾臓からマクロファージを回収し、破骨細胞分化能をTRAP染色にて比較したところ、こちらも差は認められなかった。この結果から、他細胞を介した間接的影響を疑った。Sox21が血液でも発現するため血液検査を行ったが、大きな変化は見られなかった。次に、Sox21が骨髄でも発現していたため、マウスの大腿骨から骨髄細胞を回収し、破骨細胞誘導を行った。その結果、野生型と比べて、Sox21欠損マウスの骨髄では破骨細胞数の増加が見られた。

研究成果の概要(英文)：The osteoblasts were collected from Sox21KO and WT mouse, and the expression of the bone metabolism marker was investigated by RT-PCR. The decrease of expression level was not observed in the Sox21KO mouse. Next, the effect on osteoclasts was examined. The osteoclasts differentiation potency was compared by TRAP staining from the macrophage of spleen origin, and the difference was not found in this either. It was considered indirect effect through the other cells from these results. A blood was tested since Sox21 is expressed in the blood. No changes major in the item about the bone metabolism were identified. The osteoclast differentiation was induced from the bone marrow cell collected from the mouse femur because Sox21 was expressed in the bone marrow too. The number of osteoclasts in the Sox21KO Mouse increased compared with WT mouse.

研究分野：発生

キーワード：歯 発生

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

小児歯科医師にとって触れる機会の多い疾患として、エナメル質形成不全がある。エナメル質形成不全の原因には遺伝的なものや後天的なものがある。近年、欧州では臼歯 - 切歯石灰化不全 (Molar-Incisor - Hypomineralisation; MIH) が問題となっているが明確な原因は明確となっていない。発生率は 2.8-25%の間であり、特徴として正常歯に比べ 4 倍程度齲蝕感受性が高い。そのため、小児歯科医師にとって正しい対応を行うためにも、そのメカニズムの解析が重要な責務となる。

そこで、我々は以前にエナメル質形成に関与する分子を検討することにした。マウス前歯は人間の歯と異なり、唇側にはエナメル質が存在するが、舌側ではエナメル質を持たない。そのため、マウス切歯の唇側は人間の歯冠様形態であるのに対して舌側は歯根様形態と言われている。また、マウス前歯は常に成長しており、切端部では成熟した細胞がほとんどである反面、根尖部の Cervical loop では未分化な細胞が多く、幹細胞が存在する。このことから、マウス前歯は歯冠や歯根の分化過程を見るのに非常に適している。そこで、マウス切歯の唇側部の歯原性上皮で特異的に発現している分子を特定するためにマイクロアレイ法を用いてスクリーニングしたところ、Sox21 がその候補分子として挙がった。Sox (sex determining region Y-box) は、様々な細胞分化に不可欠な転写制御因子であり A から G までのグループに分類され、Sox21 は Sox2 と同じグループ B に属する。Sox2 は iPS 細胞作製の一因子であり、幹細胞維持に重要な遺伝子である。その反対に、Sox21 は Sox2 を阻害し、分化誘導を引き起こす事が知られており、脳や神経系で発現している。しかし、歯や骨に関する報告はまだない。そこで、Sox21 の発現について免疫染色および in situ にて調べたところ、Sox21 は胎生 15 日目以降の切歯唇側面のエナメル芽細胞や、出生後の臼歯エナメル芽細胞で発現していることから、Sox21 が新規エナメル芽細胞マーカーである事が判明した。

そのため、Sox21 の機能を明らかとするために、Sox21 欠損 (Sox21KO) マウスにおける歯の異常を検討した。走査型電子顕微鏡像 (SEM) では切歯、臼歯とも、表面は多数の孔が見られ、断面ではエナメル小柱構造が失われていた。更にマイクロ CT の結果でも象牙質の石灰化や歯根に異常が見られなかったのに対し、エナメル質の石灰化が切歯、臼歯共に 90%程度抑制されていた。そこで、Sox21 欠損マウスのエナメル芽細胞で発現している分子を調べた結果、終末エナメル芽細胞マーカーであるアメロチンや K1k4 の発現が

減少していた。以上の事から、Sox21 が終末エナメル芽細胞マーカーに作用して、石灰化や結晶構造を調節している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

13 染色体トリソミーは症状として小頭症、眼疾患、口唇口蓋裂などの他に、歯の異常が見られる事が多い。また、短命なため、口腔内管理は小児歯科医師が受け持つ事になる。しかしその詳細は不明な点が多いのが現状である。また、13q-症候群は 13 番染色体の長腕が部分的に欠損する疾患で、欠損部位によりその症状は多様であるが、小頭症や歯の異常が見られる事が多い。

我々は以前の研究で、13 番染色体上に位置する Sox21 がアメロチンや K1k4 の発現を抑制し、エナメル芽細胞の石灰化を抑制することによって、エナメル質形成不全を引き起こす事を突き止めた。これは Sox21 が 13q-症候群でエナメル質形成不全になる初の原因遺伝子である事を示した。更に Sox21 欠損による影響が石灰化不全のため、歯だけではなく、小顎症など骨の石灰化不全も推測された。

更に、このエナメル質形成における Sox21 の影響を検討する研究過程において、Sox21 欠損マウスの体格が小さい事に気がついた。そこで、体重を計測した結果、出生体重では差が認められなかったが、成長するにつれ差が大きくなり、12 週齢では WT と比べて約 80%程度のサイズとなった。更に生後直後のマウス透明骨格標本では、頭蓋や中顔面の石灰化遅延が見られた。また、頭蓋骨と大腿骨のマイクロ CT 検査では、Sox21 欠損マウスの骨密度は 70%減少しており、骨粗鬆症様症状を呈していた。これらの事から、Sox21 が骨形成不全を引き起こす可能性が示唆された。そこで、本研究では Sox21 による骨代謝への影響を検討する事により、13 番染色体異常における硬組織形成への影響を検討する事を目的とする。

3. 研究の方法

まず、本題である 13 番染色体異常における硬組織形成への影響を検討するために、ヒト 13 染色体上に位置する Sox21 の遺伝子欠損マウスにおける、骨形成不全の表現系について精査することにした。

生後 1 日目の Sox21 遺伝子欠損ホモマウスおよび野生型の頭蓋冠から骨芽細胞を分離し、骨代謝マーカーである、オステオカルシン、オステオポンチン、アルカリフォスファターゼの発現量を RT-PCR 法にて確認を行うことにした。この結果から Sox21 が骨芽細胞を介して骨形成に直接影響を与えているか

どうかを検討し、骨粗鬆症の原因が低回転型かどうかを調べる。

次に破骨細胞分化に対する Sox21 の直接的影響を検討する。まず、Sox21 遺伝子欠損ホモマウスおよび野生型の脾臓よりマクロファージ細胞を分離し、RANKL, M-CSF の存在下にて培養することにより破骨細胞へ分化を誘導し、TRAP 染色にて破骨細胞分化能を調査する。この実験により、Sox21 が破骨細胞を介して骨吸収に直接影響を与えているかどうかを検討し、骨粗鬆症の原因が高回転型かどうかを調べる。

次に、破骨細胞や骨芽細胞直接ではなく、間接的に Sox21 が骨代謝へ影響を与えることによって骨形成不全を引き起こしている可能性がある。そこで、まずは Sox21 が発現している部位を突き止める。野生型マウスから各臓器を採取し、Sox21 の発現を RT-PCR 法によって発現部位を明らかにする。

更に、Sox21 欠損マウスは、生後 0 日目では野生型と比べて体重変化が見られないが、成長するに伴い体重差が広がり、成体では雌雄差は無く、30%ほど体重が軽量であることから、成長不良による骨形成不全の可能性が示唆された。そこで、Sox21 欠損マウスの血液検査を行い、その結果から、全身に対する間接的影響を検討する。

骨代謝に関与する細胞の内、Sox21 を発現する組織が特定できれば、Sox21 遺伝子欠損ホモマウスから採取した細胞と破骨細胞または骨芽細胞との共培養系に添加する事により、骨代謝への影響を検討し、Sox21 が間接的に骨代謝へ影響を与えているかを確認する。

4 . 研究成果

骨芽細胞における骨代謝マーカー発現を検討した結果、Sox21 遺伝子欠損ホモマウスでは、野生型と比べて骨量が減少しているにもかかわらず、オステオカルシン、オステオポンチン、アルカリフォスファターゼの mRNA の発現量の低下は認められなかった。このことから、Sox21 は骨芽細胞を介して骨形成を抑制している可能性は低いと考えられた。

そこで、骨芽細胞ではなく、破骨細胞への直接的影響を考えた。Sox21 遺伝子欠損ホモマウスと野生型マウスの脾臓からマクロファージを回収し、破骨細胞分化能を比較したところ、野生型と遺伝子欠損マウスとの間に顕著な差は認められなかった。この結果より、Sox21 は破骨細胞分化に直接的に影響を与えていない可能性が示唆された。

以上の結果から、Sox21 が骨芽細胞および破骨細胞分化に直接影響を与えていない可能性が得られたため、他細胞を介した間接的影響を検討することにした。予備実験の時点で、Sox21 は骨芽細胞で発現していることを確認していた。しかし、骨芽細胞の Sox21 を欠損しても骨代謝マーカーに大きな変化が見られなかったため、他の組織を検討する事

にした。その結果、骨髄細胞でも発現が見られ、更に血液からも強く発現していた。

そこで、遺伝子欠損ホモマウスおよび野生型マウスから血液を採取し、血液検査を行った。一般生化学分析では、TP(総タンパク)、Ca、IP(無機リン)、ALP(アルカリフォスファターゼ)等の骨代謝に関する項目に大きな変化は見られなかった。しかし、Sox21 欠損マウスでは LDL コレステロールが高値となっていた。LDL コレステロールは成長ホルモン、性ホルモン等により抑制されるため、LDL コレステロール高値はこれらホルモンの分泌不足が考えられた。しかし、スクリーニングの結果、成長ホルモンや性ホルモンなどのホルモン分泌に大きな異常は見られなかった。

そこで、血液ではなく骨髄細胞に注目し、骨髄細胞に含まれる白血球やリンパ球、単球などが間接的に破骨細胞分化に影響を与えている可能性が示唆された。

そこで、5 週齢の Sox21 遺伝子欠損ホモマウスの大腿骨から骨髄細胞を回収し、破骨細胞誘導を行った。その結果、野生型と比べて、Sox21 欠損マウスの骨髄では破骨細胞数の増加が見られた。このことから、Sox21 欠損による骨粗鬆症様の骨代謝不全は、骨髄細胞が間接的に破骨細胞分化を抑制している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Saito K, Yamada A, Xue H, Funada K, Fukumoto E, Haruyama N, Iwamoto T, Takahashi I, Fukumoto S. Nephronectin plays critical roles in Sox2 expression and proliferation in dental epithelial stem cells via EGF-like repeat domains. *Scientific reports*, 7, Article number: 45181. 2017 (査読有り)

Iwamoto T, Nakamura T, Ishikawa M, Yoshizaki K, Sugimoto A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Saito M, Yamada Y, Fukumoto S. Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities. *Plos One*. 11; 12(5): e0177557. 2017 (査読有り)

Nakamura T, Jimenez-Rojo L, Koyama E, Pacifici M, de Vega S, Iwamoto M, Fukumoto S, Unda F, Yamada Y. Epiprofin Regulates Enamel Formation and Tooth Morphogenesis by Controlling Epithelial-Mesenchymal Interactions During Tooth Development. *Journal of Bone and Mineral Research*. 32(3):601-610. 2017 (査読有り)

Oyamada Y, Ikeuchi T, Arakaki M, Hino R,

Ono M, Kobayashi M, Yamaguchi S, Saito K, Yamada A, Fukumoto S. Finger sucking callus as useful indicator for malocclusion in young children. *Pediatric Dental Journal*, 26(3):103-108, 2016 (査読有り)

Nakamura T, Chiba Y, Naruse M, Saito K, Harada H, Fukumoto S. Globoside accelerates the differentiation of dental epithelial cells into ameloblasts. *International Journal of Oral Science*, ijos.2016.35. 2016 (査読有り)

Liu J[†], Saito K^{†*}, Maruya Y, Nakamura T, Yamada A, Fukumoto E, Ishikawa M, Iwamoto T, Miyazaki K, Yoshizaki K, Ge L, Fukumoto S. Mutant GDF5 enhances ameloblast differentiation via accelerated BMP2-induced Smad1/5/8 phosphorylation. *Scientific reports*, 6, Article number: 23670. 2016 († Contributed equally to this work, * Corresponding Author) (査読有り)

Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Yamada A, Saito K, Ishikawa M, Xue H, Funada K, Haruyama N, Yamada Y, Fukumoto S, Takahashi I. Plakophilin-1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development and ameloblast differentiation. *Plos One*, 11(3):e0152206. 2016 (査読有り)

Yamada A, Futagi M, Fukumoto E, Saito K, Yoshizaki K, Ishikawa M, Arakaki M, Hino R, Sugawara Y, Ishikawa M, Naruse M, Miyazaki K, Nakamura T, Fukumoto S. Connexin 43 is necessary for salivary gland branching morphogenesis and FGF10-induced ERK1/2 phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(1): 904-912. 2016 (査読有り)

Suzuki M, Yamada A, Saito K, Hino R, Sugawara Y, Ono M, Naruse M, Arakaki M, Fukumoto S. Application of a tooth-surface coating material containing pre-reacted glass-ionomer fillers for caries prevention. *Pediatric Dental Journal*, 25(3):72-78, 2015 (査読有り)

Nakatomi C, Nakatomi M, Saito K, Harada H and Ohshima H. The enamel knot-like structure is eternally maintained in the apical bud of postnatal mouse incisors. *Archives of Oral Biology*, 60(8): 1122-1130. 2015 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3件)

齋藤 幹 『Sox21 induces ameloblast differentiation and plays an important

role for suppression of keratinization, epithelization』第59回歯科基礎医学会学術大会 シンポジウム(松本市;松本歯科大学)2017年9月16-18日

齋藤 幹, 福本 敏 『The analyses of the ameloblast differentiation mechanism by Sox21』第57回歯科基礎医学会学術大会,(新潟; 朱鷺メッセ), 2015年9月11-13日

齋藤 幹, 山田 亜矢, 新垣真紀子, 二木正晴, 中村卓史, 福本敏 『歯の萌出時期と嚢胞形成に関わるインテグリン beta1 の分子機構について』第53回日本小児歯科学会(広島市; 広島国際会議場)2015年5月21-22日

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 幹 (SAITO, Kan)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号: 40380852

(2)研究分担者

中村 卓史 (NAKAMURA, Takashi)
東北大学・歯学研究科・准教授
研究者番号: 90585324