

平成30年6月13日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07065

研究課題名(和文)エナメル芽細胞分化制御に関わる新しいWntシグナル経路の展開

研究課題名(英文)A novel Wnt signaling pathway in ameloblast differentiation during tooth development

研究代表者

宮崎 佳奈子(Miyazaki, Kanako)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30778840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナル経路は歯の形態形成期に重要な役割を果たしている。これまでの研究で、歯の発生初期に特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析し、Plakophilin 1 (PKP1)を同定した。PKP1はdesmosome結合の構成因子として細胞間接着に関与するとともに、Wntシグナル伝達因子beta-cateninと相同性をもつarmadillo repeat domainを有する。本研究では歯の発生時期のPKP1の細胞内局在の変化を解析し、PKP1が歯の発生初期ではWntシグナル調節因子として歯の形態形成に関与し、エナメル芽細胞分化期になると細胞膜でエナメル芽細胞分化を制御している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling pathway plays important roles for tooth development, especially during the tooth morphogenesis. By using comprehensive analysis, we focused on Plakophilin 1 (PKP1) which is highly expressed in tooth. PKP1 is known as an adhesion-related molecule of desmosome and a member of the armadillo repeat domain, which is related to Wnt signaling pathway. In this study, we analyzed the intracellular localization of PKP1 during tooth development and suggested that PKP1 is involved in early tooth morphogenesis as an Wnt signal regulator, and regulates differentiation of ameloblast via the cell adhesion molecules.

研究分野：歯学

キーワード：歯学 細胞・組織 発生・分化 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

歯の発生は上皮-間葉相互作用による歯胚外形の決定と、その後の分化過程による硬組織の形成の2つに分けて考えることができる。我々はこれまでの研究で、マイクロアレイ法を用いた網羅的解析を行い、歯の発生初期に強く発現する Plakophilin 1(PKP1)を同定した。PKP1 は外胚葉異形成/皮膚脆弱症候群に関与し、細胞間接着に関与していることが知られている。申請者のこれまでの研究で、PKP1 は Wnt 刺激によって核内に移行し、転写調節因子として働く可能性を示してきた。しかしながら、PKP1 の形態形成に与える詳細な機能は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

PKP1 は plakophilin ファミリーに属し、細胞接着における desmosome 結合の構成分子として知られており、細胞膜に局在しながら上皮細胞の細胞接着を制御している。一方で、PKP1 は Wnt シグナル伝達因子である  $\beta$ -catenin と相同性を持つ、armadillo repeat domain (arm domain)を有する。これまで PKP1 の arm domain は DNA との結合が示唆されてきたが、具体的にどのような経路で細胞膜から核内に運ばれ、DNA と結合するのかが不明であった。そこで本研究では、歯の発生における PKP1 の機能解析を通して、Wnt シグナル制御下における PKP1 の分子メカニズムの解明を主な目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

(1) 胎生11日齢(E11)-生後7日齢(P7)マウス歯胚を実体顕微鏡下にて摘出し、total RNA を抽出、qRT-PCR 法にて発現パターンを解析した。また E13, E14, E16 および P1 マウス歯胚を用いて、免疫染色法にて PKP1 および ZO-1 の局在を確認した。

(2) 歯原性上皮細胞株 CLDE 細胞を用いて PKP1 の局在変化の解析を行った。また、PKP1 siRNA 遺伝子導入を行い、PKP1 の機能解析を行った。

(3) PKP1 の細胞内局在をリアルタイムに検出するため、PKP1-GFP 融合発現ベクターを作製した。同発現ベクターを CLDE 細胞に遺伝子導入し、 $Ca^{2+}$ および Wnt 刺激を行い、GFP

の局在変化を観察した。

## 4. 研究成果

(1) 歯の発生における PKP1 の発現パターン解析

歯の発生時期における PKP1 の発現パターンを解明するため、qRT-PCR 法および免疫染色法にて解析を行った。mRNA レベルでは歯の発生初期である E11 より発現を開始し、歯の発生ステージが進むにつれて発現量が増加した。免疫染色法にて局在を確認したところ、形態形成期である歯の発生初期においては歯原性上皮細胞の細胞質に局在していたが、エナメル芽細胞分化期になると細胞膜に点状に局在するようになった。このとき、tight junction 構成因子である ZO-1 と同様の局在パターンを示した。

(2) 歯原性上皮細胞における PKP1 の細胞内局在の解析

細胞内局在を詳細に解析するため、歯原性上皮細胞株である CLDE 細胞を用いて研究を行った。一般的に細胞接着はカルシウムイオン依存的であることが知られており、CLDE 細胞は丸みを帯びた形態を呈しているが、 $Ca^{2+}$ 刺激下で細胞形態を敷石上に変化させる。この形態変化は細胞接着がより強固になっていることを示している。そこで、このときの PKP1 の局在を確認するため、免疫染色法を行ったところ、 $Ca^{2+}$ 刺激によって細胞形態の変化とともに、PKP1 が細胞質から細胞膜へと局在を変化させていることがわかった。そこで、細胞膜における PKP1 の機能を確認するため、PKP1 siRNA を用いて解析を行った。PKP1 siRNA 遺伝子導入により PKP1 の発現を抑制すると、細胞形態が丸みを帯び、細胞間接着が脆弱になった。そのときの細胞接着因子の局在を確認すると、ZO-1 の細胞膜局在が阻害されていた。

(3) Wnt 刺激による PKP1 の局在変化

PKP1 の Wnt シグナル制御下での細胞内での局在の変化を、リアルタイムに検出するために、PKP1-GFP 融合発現ベクターを作製した。CLDE 細胞に PKP1-GFP を遺伝子導入し、 $Ca^{2+}$ にて刺激すると、PKP1 は細胞膜に局在した。Wnt 刺激後、タイムラプス蛍光顕微鏡で PKP1 の局在変化を観察したところ、細胞膜

に局在した PKP1 が核内に集積する様子が観察できた。以上の結果から、PKP1 は Wnt 刺激により細胞膜から核内へと移行し、刺激を伝える可能性が示唆された。さらに、レポーターアッセイにより、PKP1 は TCF/LEF プロモータ活性を持つことを発見した。これらの結果から、Wnt シグナル伝達因子である beta-catenin と同様に、PKP1 が Wnt シグナル伝達因子として働いている可能性が示された。以上の結果から TCF/LEF 転写因子は転写調節因子である beta-catenin に結合するか PKP1 に結合するかでその標的因子を変化させている可能性が示された。

#### 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 1 件)

1. Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Saito K, Yamada A, Han X, 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  
Sci Rep. 2017; 7:45181. doi: 10.1038/srep45181

[学会発表] (計 14 件)

1. Funada K, Yosizaki K, Han X, Miyazaki K, Arai C, Yuta T, Takahashi I  
The roles of miR875-5p as a specific marker during early tooth development  
Kyudai Oral Bioscience 2018 (KOB2018) 口演 福岡 February 11th (Sun) - 12th (Mon) 2018

2. 宮崎 佳奈子, 春山 直人、野口 健志、野村 俊介、吉崎 恵悟、高橋 一郎。  
アレンドロネートの周期的静脈投与を受けている成長期骨形成不全症患者 3 症例の顎顔面形態の特徴  
第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 ポスター発表 札幌 2017 年 10 月 18-20 日

3. Han X, Yoshizaki K, Arai C, Miyazaki K,

Funada K, Yuta T, Takahashi I

The role of Nkx2-3 homeobox transcription factor in tooth development

第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 ポスター発表 札幌 2017 年 10 月 18-20 日

4. 吉崎 恵悟, 鮎田 啓太, 宮崎 佳奈子, 新井 智映子, 韓 雪, 湯田 智美, 高橋 一郎。

歯に特異的に発現する miR875-5p の同定と発現パターン解析

第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 ポスター発表 札幌 2017 年 10 月 18-20 日

5. 鮎田 啓太, 吉崎 恵悟, 宮崎 佳奈子, 韓 雪, 新井 智映子, 湯田 智美, 高橋 一郎。

密着接合因子 ZO-1 による歯原性上皮細胞の増殖および分化に与える影響

第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 ポスター発表 札幌 2017 年 10 月 18-20 日

6. 湯田 智美, 吉崎 恵悟, 新井 智映子, 宮崎 佳奈子, 韓 雪, 鮎田 啓太, 野口 健志, 高橋 一郎

基底膜分子 Nephronectin は RGD 領域を介してエナメル芽細胞の分化制御に関与する

第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 ポスター発表 札幌 2017 年 10 月 18-20 日

7. Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Han X, Funada K, Haruyama N, Fukumoto S, Takahashi I  
PKP1 regulates ameloblast differentiation via the cell adhesion.

The IADR/AADR/CADR 95th General Session and Exhibition, San Francisco, CA, USA, March 22-25, 2017

8. 新井 智映子, 吉崎 恵悟, 宮崎 佳奈子, 韓 雪, 鮎田 啓太, 福本 敏, 高橋 一郎  
基底膜分子 Nephronectin は EGF like repeat domain を介して歯原性上皮幹細胞の細胞増殖を制御する

A basement membrane protein Nephronectin regulates the proliferation of dental epithelial stem cell through its EGF like repeat domain

第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2016 年 8 月 24-26 日 北海道札幌市 札幌コンベン

ションセンター

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 佳奈子 (MIYAZAKI Kanako)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：30778840

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

吉崎 恵悟 (YOSHIZAKI Keigo)  
九州大学・歯学研究科（研究院）・助教  
研究者番号：10507982

新井 智映子 (ARAI Chieko)  
九州大学・大学病院・研究員  
研究者番号：60802288