

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20569

研究課題名(和文) 転写因子複合体による新たな歯原性上皮幹細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of regulation of dental epithelial stem cell differentiation by transcription factor complexes

研究代表者

酒井 陽 (SAKAI, KIYOSHI)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80772425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの体には不完全ながら修復・再生能力が備わっている。皮膚損傷や骨折などでは、自らの治癒能力を駆使して組織修復を行う。しかしながら失った組織や臓器が修復・再生されることはほとんどない。歯科領域では、ヒトの歯のエナメル質は修復・再生不可能な組織である。我々はエナメル芽細胞分化に必須の因子である、転写因子Epiprofin(Epfn)と複合体を作るT-Box1 (Tbx1)を同定した。Epfn-Tbx1複合体は歯原性上皮細胞分化の過程でエナメル芽細胞分化に関与し、歯の上皮細胞の運命決定に関わっている可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の発生において特異的に発現する転写因子を組み合わせて歯原性上皮細胞の分化制御を行うことも独創的な点であると考えられる。Epfn-Tbx1が複合体を作り、転写制御を行うことで、個々の因子がターゲットとしていた遺伝子以外の標的因子が見つかる可能性を秘めており、非常にユニークであると考えられる。我々の研究からエナメル芽細胞の新たな分化誘導法が判明し、この知見を利用してエナメルマトリックスの発現の制御、さらには歯の再生で一番困難であると考えられているエナメル質再生のための基礎データとなると考えられる。さらには将来の歯の再生技術への応用が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The human body is equipped with the ability to repair and regenerate, albeit imperfectly. In the case of skin injuries and fractures, we use our healing abilities to repair tissues. However, lost tissues and organs are rarely repaired or regenerated. In the dental field, the enamel of human teeth is a tissue that cannot be repaired or regenerated. We identified T-Box1 (Tbx1), which complexes with the transcription factor Epiprofin (Epfn), an essential factor for ameloblast differentiation; the Epfn-Tbx1 complex is involved in ameloblast differentiation during dental epithelial cell differentiation and may be involved in determining the fate of tooth epithelial cells.

研究分野：外科系歯学

キーワード：幹細胞 転写因子 組織発生 組織再生 細胞運命決定 歯の再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの体には不完全ながら修復・再生能力が備わっている。皮膚損傷や骨折などでは、自らの治癒能力を駆使して組織修復を行う。しかしながら失った組織や臓器が修復・再生されることはほとんどない。歯科領域では、ヒトの歯のエナメル質は修復・再生不可能な組織である。我々はエナメル芽細胞分化に必須の因子である、転写因子 Epiprofin(Epfn)と複合体を作る T-Box1 (Tbx1)を同定した。Epfn-Tbx1複合体は歯原性上皮細胞分化の過程でエナメル芽細胞分化に関与し、歯の上皮細胞の運命決定に関わっている可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) Tbx1の歯原性上皮幹細胞分化に与える影響の解明、(2) Epfn-Tbx1複合体が細胞運命決定に与える影響の解明、(3) Epfn-Tbx1複合体を用いた歯原性上皮細胞に代わる cell sourceの探索を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯の発生におけるEpfnおよびTbx1の発現パターンの解析

歯の発生初期におけるTbx1およびEpfnの発現パターンを免疫染色法により解析する。さらに、研究協力者であるNIH/NIDCRの山田吉彦博士の研究室で作成したEpfn遺伝子欠損マウスおよびTbx1遺伝子欠損マウスにおけるTbx1、Epfnの発現パターンを解析することで、お互いの遺伝子がどのように誘導されているか検討した。

#### (2) Tbx1、EpfnおよびTbx1-Epfn過剰発現細胞株の作製および機能解析

我々はすでに全長Tbx1およびEpfnのクローニングに成功しており、発現ベクターを作製している。そこで、Tbx1、Epfn過剰発現細胞株およびTbx1-Epfn共発現細胞株を作製し、その機能解析をした。具体的には我々が以前作製した歯原性上皮幹細胞株であるCLDE細胞に遺伝子導入し、エナメル芽細胞への分化能の検討、細胞増殖能の検討をした。その際、ameloblastin、amelogeninおよびenamelinなどエナメル芽細胞分化マーカーを用いて評価をした。

#### (3) Epfn-Tbx1複合体のプロモーター結合配列の同定

EpfnがTbx1の発現をどのように制御しているかを調べ、EpfnがTbx1遺伝子のプロモーター領域に結合しているかどうかをChIPアッセイで評価をした。

#### (4) Epfn-Tbx1複合体による細胞周期調節の検討

CLDE細胞にTbx1、Epfn、またはTbx1とEpfnの両方を過剰発現することで、細胞増殖、細胞周期に与える影響を増殖アッセイ、qPCR、Western Blotにて解析した。

#### (5) Epfn-Tbx1複合体による細胞運命決定機構の検討

成体マウス口腔上皮細胞の初代細胞などを用いて、細胞運命決定スイッチングが起こるか確認する。様々な細胞にEpfn、Tbx1それぞれを単体で、もしくはEpfn-Tbx1を共過剰発現させ、エナメル芽細胞分化マーカーを用いて評価をした。

### 4. 研究成果

#### (1) 歯の発生におけるEpfnおよびTbx1の発現パターンの解析

WT-P1マウスincisor、E14.5マウスmolar、Tbx1 cK0マウスincisorにて免疫組織学的染色法を用いてEpfm、Tbx1、Sox2の発現パターンを解析した。その結果、Epfmは細胞増殖期に発現が開始して細胞分化期、タンパク分泌期まで継続的に発現していた。Tbx1は幹細胞期に発現が開始し細胞増殖期まで継続して発現していた。Sox2に関しては幹細胞期のみが発現していた。これらの結果からTbx1、Sox2は幹細胞期に共発現し、Tbx1、Epfmは細胞増殖期に共発現していることが示された。さらにTbx1 cK0マウスにおいてSox2の発現が減弱しincisorのcervical loopの大きさが減少していることが明らかとなった。

#### (2) Tbx1、EpfmおよびTbx1-Epfm過剰発現細胞株の作製および機能解析

EpfmとTbx1の両方が幹細胞からameloblastへの分化に影響を与えているかどうかを確認することを試みた。CLDE細胞にTbx1、Epfm、またはTbx1とEpfmの両方を過剰発現することで、ameloblast分化マーカーであるameloblastin、amelogeninおよびenamelinの発現量をqPCRで解析した。Epfmをトランスフェクトした細胞ではすべてのameloblast分化マーカーの発現レベルが高かった。さらにTbx1とEpfmをトランスフェクトした細胞ではameloblast分化マーカーの発現レベルがさらに高かった。このことから、Tbx1とEpfmは細胞の分化運命決定制御していることが示唆された。

#### (3) Epfm-Tbx1複合体のプロモーター結合配列の同定

マウスP1切歯において、Tbx1がEpfmの発現を制御していること、およびその共発現パターンから相互作用している可能性があることを確認した。Tbx1遺伝子配列中のATG前にRegion1とRegion2が、ATG後にRegion3が存在することを確認した。Region2の配列はEpfmとの結合を示し、ChIPアッセイでFLAGタグにより確認された。Region2 p32レベリングDNAを用いてゲルシフトアッセイを行い、Tbx1のRegion2 DNA配列にEpfmが結合していることを確認した。その結果、EpfmはTbx1のプロモーターDNA配列領域に結合していることが確認された。

#### (4) Epfm-Tbx1複合体による細胞周期調節の検討

EpfmとTbx1の両方が細胞周期調節に影響を与えているかどうかを確認することを試みた。増殖アッセイではTbx1とEpfmをトランスフェクトした細胞で増殖が減少した。qPCRではTbx1とEpfmをトランスフェクトした細胞でp21の発現レベルが高かった。タンパクレベルでも同様の結果が得られた。このことからTbx1とEpfmは細胞周期調節に重要な役割を果たすことが示唆された。

これらの研究結果からエナメル芽細胞の新たな分化誘導法を導くことができた。転写因子Epiprofin(Epfm)と複合体を作る T-Box1 (Tbx1)の幹細胞維持、分化に関わるメカニズムが解明された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe J. Sakai K. Urata Y. Toyama N. Nakamichi E. Hibi H.	4. 巻 99
2. 論文標題 Extracellular Vesicles of Stem Cells to Prevent BRONJ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 552-560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034520906793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 He B., Chiba Y., Li H., de Vega S., Tanaka K., Yoshizaki K., Ishijima M., Yuasa K., Ishikawa M., Rhodes C., Sakai K., Zhang P., Fukumoto S., Zhou X., Yamada Y.	4. 巻 98
2. 論文標題 Identification of the Novel Tooth-Specific Transcription Factor AmeloD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 234 ~ 241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034518808254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuruta Takeshi, Sakai Kiyoshi, Watanabe Junna, Katagiri Wataru, Hibi Hideharu	4. 巻 13
2. 論文標題 Dental pulp-derived stem cell conditioned medium to regenerate peripheral nerves in a novel animal model of dysphagia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0208938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0208938	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshizaki Keigo, Hu Lizhi, Nguyen Thai, Sakai Kiyoshi, Ishikawa Masaki, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi, DenBesten Pamela K., Bikle Daniel D., Oda Yuko, Yamada Yoshihiko	4. 巻 292
2. 論文標題 Mediator 1 contributes to enamel mineralization as a coactivator for Notch1 signaling and stimulates transcription of the alkaline phosphatase gene	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13531 ~ 13540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.M117.780866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishikawa Masaki, Williams Geneva L., Ikeuchi Tomoko, Sakai Kiyoshi, Fukumoto Satoshi, Yamada Yoshihiko	4. 巻 129
2. 論文標題 Pannexin 3 and connexin 43 modulate skeletal development through their distinct functions and expression patterns	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1018 ~ 1030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.176883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yoshiro Koma, Kiyoshi Sakai, Dong Jiao, Junna Watanabe, Hideharu Hibi
2. 発表標題 Effects of hDPSCs-derived Exosomes in Novel Salivary Gland Disease Model
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤尾正人, 佐世暁, 荻須宏太, 土屋周平, 酒井陽, 日比英晴
2. 発表標題 Le Fort I型骨切り術の固定法と術後の骨片変位量の検討
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 陽, 山本朗仁, 日比英晴
2. 発表標題 転写因子Epf <sub>n</sub> -Tbx1複合体を用いた歯原性上皮幹細胞分化制御の解明
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田原春早織, 坂口晃平, 藤尾正人, 酒井陽, 西川雅也, 山本憲幸, 日比英晴, 佐藤(朴)會士
2. 発表標題 デクスメドミジンを使用した智歯抜歯術中の低酸素血症の予防: 無作為比較対象研究
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山裕, 山本憲幸, 山口聡, 坂倉寛紀, 西川雅也, 酒井陽, 日比英晴
2. 発表標題 下顎広範囲に進展した紡錘細胞癌の1例
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井陽
2. 発表標題 歯髄幹細胞の脊髄損傷における多面的治療効果
3. 学会等名 第22回日本顎顔面インプラント学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤尾正人, 佐世暁, 荻須宏太, 土屋周平, 酒井陽, 日比英晴
2. 発表標題 Le Fort I型骨切り術の固定法と術後安定性の検討
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊純奈, 酒井陽, 岡部一登, 梶村有紀子, 坂口晃平, 鶴田剛士, 中道瑛司, 日比英晴
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来エクソソームを用いたBRONJに対する治療の有効性の検討
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊純奈, 酒井陽, 日比英晴
2. 発表標題 BRONJ発症におけるエクソソームの効果の検討
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakaguchi K, Sakai K, Sugimura Y, Tsuruta T, Watanabe J, Katagiri W, Hibi H
2. 発表標題 Exosomes derived from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Watanabe J, Sakai K, Okabe K, Sugimura Y, Sakaguchi K, Tsuruta T, Hibi H
2. 発表標題 Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes for rat BRONJ model
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊純奈, 酒井陽, 岡部一登, 若山有紀子, 坂口晃平, 鶴田剛士, 日比英晴
2. 発表標題 ビスホスホネート関連顎骨壊死に対する間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた治療の可能性
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口晃平, 酒井陽, 片桐渉, 若山有紀子, 鶴田剛士, 渡邊純奈, 日比英晴
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞が分泌するエクソソームによる新たな骨再生
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiko Yamada, Kiyoshi Sakai, Yuta Chiba, Bing He, Darius Mahboubi, Craig Rhodes, Yasuo Yoshitomi, Satoshi Fukumoto, Takashi Nakamura
2. 発表標題 Epiprofin is a multi-functional factor essential to promote dental epithelial stem cell commitment to the ameloblast lineage and its proliferation and differentiation
3. 学会等名 The 2017 Japan-NIH Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊純奈, 片桐渉, 大杉将嗣, 酒井陽, 岡部一登, 相村有紀子, 坂口晃平, 鶴田剛士, 外山直人, 日比英晴
2. 発表標題 他家骨髄由来間葉系細胞の移植による骨再生の検討
3. 学会等名 第38回日本口腔インプラント学会中部支部学術大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 梶村有紀子, 酒井陽, 坂口晃平, 鶴田剛士, 渡邊純奈, 片桐渉, 日比英晴
2. 発表標題 乳歯歯髄幹細胞由来培養上清を用いた末梢神経再生治療の検討
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴田剛士, 酒井陽, 片桐渉, 大杉将嗣, 梶村有紀子, 坂口晃平, 渡邊純奈, 日比英晴
2. 発表標題 乳歯歯髄幹細胞由来成長因子は神経の血管新生を介してラット末梢性嚙下障害を改善する
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴田剛士, 片桐渉, 大杉将嗣, 酒井陽, 若山有紀子, 坂口晃平, 渡邊純奈, 日比英晴
2. 発表標題 ラット末梢性嚙下障害モデルを用いた乳歯歯髄幹細胞由来成長因子の治療効果の検討
3. 学会等名 第71回日本口腔科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴田剛士, 片桐渉, 大杉将嗣, 酒井陽, 若山有紀子, 坂口晃平, 渡邊純奈, 日比英晴
2. 発表標題 ラット末梢性嚙下障害モデルの確立と乳歯歯髄幹細胞由来成長因子による治療効果の検討
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴田剛士, 片桐渉, 大杉将嗣, 酒井陽, 梶村有紀子, 坂口晃平, 渡邊純奈, 日比英晴
2. 発表標題 ラット末梢性嚙下障害モデルにおける乳歯歯髄幹細胞由来成長因子による治療効果の検討
3. 学会等名 第61回日本口腔外科学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 坂口晃平, 片桐渉, 大杉将嗣, 酒井陽, 梶村有紀子, 鶴田剛士, 渡邊純奈, 日比英晴
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞由来培養上清を模倣した成長因子混合剤による歯周組織再生
3. 学会等名 第61回日本口腔外科学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 酒井陽, 吉崎恵悟, 千葉雄太, 池内友子, 山本朗仁, 日比英晴, 山田吉彦
2. 発表標題 歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への分化におけるEpirofinとT-box1の役割
3. 学会等名 第58回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yuta Chiba, Kiyoshi Sakai, Tomoko Ikeuchi, Keigo Yoshizaki, Darius Mahboubi, and Yoshihiko Yamada
2. 発表標題 Epirofin and T-box1 regulate the ameloblast lineage development
3. 学会等名 2017 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂口晃平, 片桐渉, 大杉将嗣, 酒井陽, 若山有紀子, 鶴田剛士, 日比英晴
2. 発表標題 幹細胞由来培養上清を模した成長因子混合剤による新たな歯周組織再生法
3. 学会等名 第37回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Oral and Craniofacial Development and Disease  <a href="http://grantome.com/grant/NIH/ZIA-DE000720-10">http://grantome.com/grant/NIH/ZIA-DE000720-10</a>  Oral and Craniofacial Development and Disease  <a href="http://grantome.com/grant/NIH/ZIA-DE000720-10">http://grantome.com/grant/NIH/ZIA-DE000720-10</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉崎 恵悟  (YOSHIZAKI KEIGO)	九州大学・歯学研究科・助教    (17102)	