

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09863

研究課題名(和文)エナメル質石灰化転写制御因子の同定

研究課題名(英文)Control of amelogenesis imperfecta by CTIP2

研究代表者

倉重 圭史 (KURASHIGE, Yoshihito)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：30453278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル質石灰化の転写因子に関する報告はこれまでにない。本研究は、エナメル芽細胞におけるMSX2複合体の関与および転写制御因子を明らかにした。MSX2複合体であるCTIP2を強発現することによりエナメルマトリックスプロテインの上昇が認められた。このことから、エナメル質の形成においてMSX2複合体であるCTIP2が関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の形成障害は、大半がエナメル質に限局して認められる。エナメル質形成不全症は、家族性にエナメル質石灰化不全が起こり、遺伝的要因によるものであるが原因遺伝子の同定には至っていない。本研究結果から、エナメル質の形成においてMSX2複合体が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：we propose to identify the complexes associated with CTIP2 in ameloblasts, the cells involved in the synthesis of enamel proteins.

We detected identify the molecular mechanisms underlying the influence of CTIP2 on MSX2 expression but also the proteins responsible for the formation of enamel (Amelogenin, Ameloblastin, Enamelin).

研究分野：小児歯科

キーワード：MSX2 CTIP2 アメロジェニン

#### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性エナメル質石灰化不全症は、アメロジェニン、アメロプラスチン、エナメルリンなどのエナメルマトリックスプロテイン (EMP<sub>s</sub>) 遺伝子や、エナメライシン、カリクレイン 4 などの EMP<sub>s</sub> 分解酵素遺伝子が責任遺伝子とされているが、最近では種々のイオンチャンネルや転写因子および機能不明の遺伝子もその原因として報告されている。エナメル芽細胞が産生する EMP<sub>s</sub> の分泌には、転写因子 MSX2 が関与しているとの報告がある。ホメオボックス遺伝子である MSX2 は、組織の分化誘導や石灰化に関与し、数種の転写制御因子と共に複合体を形成する。骨芽細胞や T 細胞において、MSX2 複合体内には転写制御因子 PITX2 や Bcl11b (CTIP2) が存在するが、エナメル芽細胞の MSX2 複合体では、その詳細は不明である。本研究は、エナメル芽細胞における MSX2 複合体の関与および転写制御因子を明らかにし、エナメル質石灰化の機序および石灰化不全症の病因解明を目的とする。

#### 2. 研究の目的

歯の形成障害は、大半がエナメル質に局限して認められる。エナメル質形成不全症は、家族性にエナメル質石灰化不全が起こり、遺伝的要因によるものであるが原因遺伝子の同定には至っていない。エナメル質石灰化不全の原因は、外傷などによる局所的炎症反応、ビタミン D 不足およびアメロジェニンやアメロプラスチンなどの EMP<sub>s</sub> の減少による石灰化不全がある。EMP<sub>s</sub> は、エナメル質石灰化に不可欠であるが転写因子は明らかになっていない。これまでに、転写因子である MSX2 欠損マウスを使用した研究では、エナメル質の菲薄化、髓腔拡大、根管開大などのエナメル質形成不全様症状を認める報告があり (Bone,2007)、MSX2 が EMP<sub>s</sub> の転写因子である可能性が示唆されている。MSX2 は複合体を形成することが報告されており、複合体内に PITX2 や Bcl11b (CTIP2) という転写制限因子をもつことが明らかになっている。CTIP2 は、HIV-1 転写や T 細胞の分化誘導に関与しているが、エナメル質石灰化の転写因子に関する報告はこれまでにない。本研究は、エナメル芽細胞における MSX2 複合体の関与および転写制御因子を明らかにし、エナメル質石灰化の機序および石灰化不全症の病因解明を目的とする。

#### 3. 研究の方法

##### 1) 細胞培養

細胞は、ラットエナメル芽細胞株 HAT7 細胞を使用した。細胞は、10%Fetal bovine serum 含有 F-12 にペニシリン/ストレプトマイシンを添加し、5%CO<sub>2</sub>、37 °C で培養した。

##### 2) レポーター遺伝子

本研究で使用したレポーター遺伝子は、Flag-CTIP2、sh-CTIP2 を使用した。各レポーター遺伝子は、ストラスプール大学から供与されたものを使用した。

##### 3) レポーター遺伝子

レポーター遺伝子であるルシフェラーゼを繋いだ MSX2 プロモーターはストラスプール大学から供与されたものを使用した。

##### 4) 遺伝子導入効率の検討

レポーター遺伝子の導入効率を調査するため、GFP 遺伝子を CaCl<sub>2</sub> 法、Jet PRIME、Lipofectamin LTX、Lipofectamin 2000 を使用した。遺伝子導入後、FACS ARIA を使用し、遺伝子導入効率のよい試薬を使用した。

##### 5) レポーター遺伝子導入濃度の検討

使用したレポーター遺伝子濃度は 1~4 μg で導入を行い、最も導入率が高いものを使用した。

##### 6) CTIP2 による MSX2 およびエナメルマトリックスプロテインの発現変化

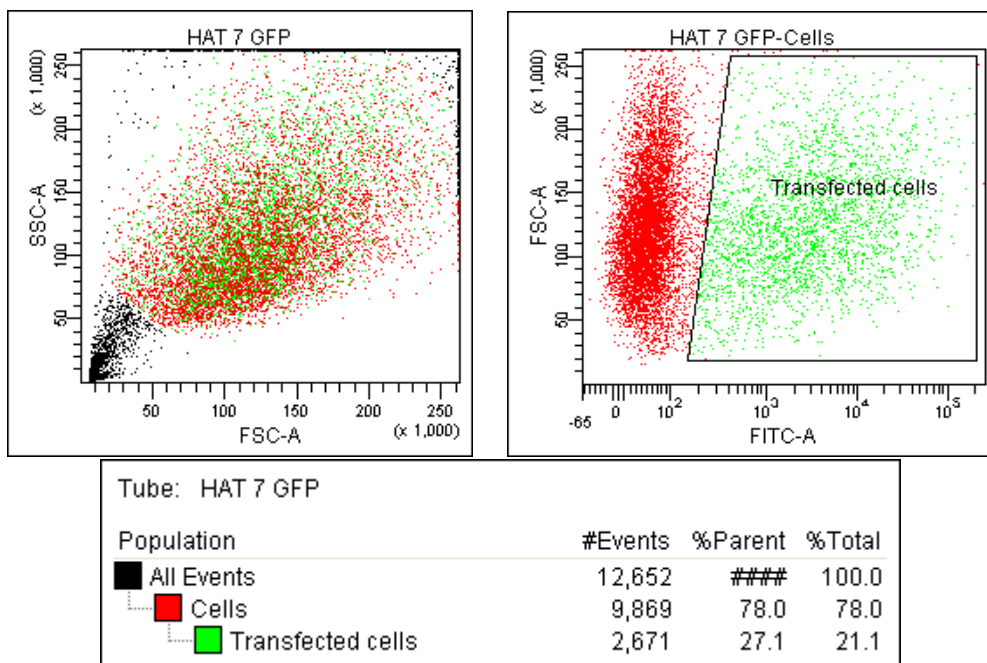
Flag-CTIP2 遺伝子導入後 HAT7 細胞は、TRIZOL を用いて通法に従い RNA を採取後、逆転写反応を行い cDNA を作成した。作成した cDNA は Real time-RT-PCR により発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) 遺伝子導入効率

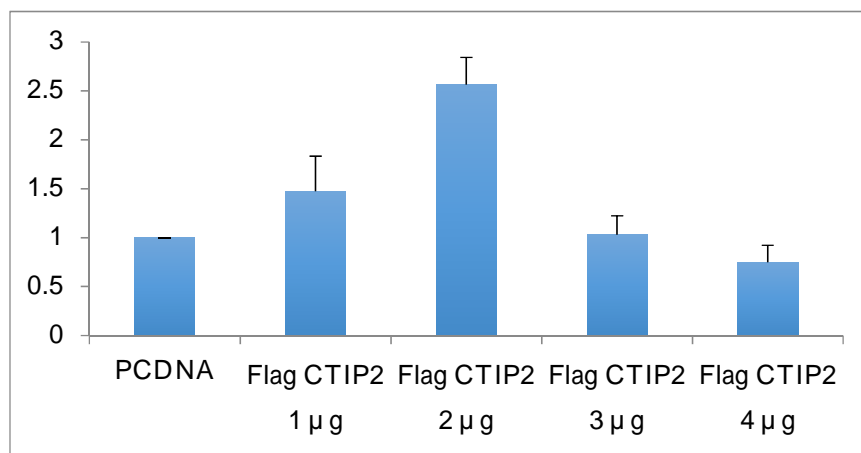
レポーター遺伝子の導入効率を調査するため、CaCl<sub>2</sub> 法、Jet PRIME、Lipofectamin LTX、Lipofectamin 2000 を使用した。CaCl<sub>2</sub> 法では、導入効率は 0%、Jet PRIME は 5.1%、Lipofectamin LTX は 9.8%、Lipofectamin 2000 は 21.1%であった。本結果から導入効率の最も高い Lipofectamin

2000 を使用した。本研究結果から、Lipofectamin 2000 を使用した。



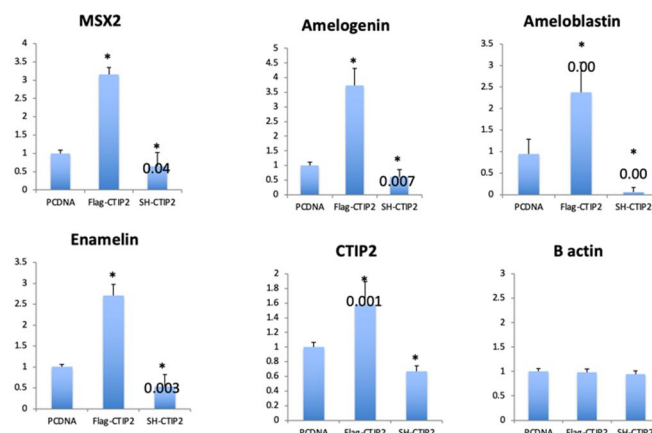
### 2) レポーター遺伝子導入濃度の検討

使用したレポーター遺伝子濃度は 1~4  $\mu\text{g}$  で導入を行った。本結果から 2  $\mu\text{g}$  がもっとも導入効率が高かった。



### 3) CTIP2 による MSX2 およびエナメルマトリックスプロテインの発現変化

Flag-CTIP2 遺伝子導入後 HAT7 細胞は、TRIZOL を用いて通法に従い RNA を採取後、逆転写反応を行い cDNA を作成した。作成した cDNA は Real time-RT-PCR により発現解析を行った。CTIP2 を強発現することによりエナメルマトリックスプロテインである、アメロジェニン、アメロプラスチン、エナメリンの優位な発現上昇が認められた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 村井 雄司, 齊藤 正人, 袁輪映里佳, Syed Taufiqul Islam, 小橋 美里, 榊原さや夏, 菅谷 裕行, 倉重 圭史, 疋田 一洋.	4. 巻 9
2. 論文標題 小児におけるデジタル印象およびアルジネート印象のストレス評価.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 デジタル歯 科学会 誌	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 袁輪映里佳, 榊原さや夏, 倉重圭史, 遠藤一彦, 齊藤正人
2. 発表標題 TMR MTA cement Mieleの歯髄炎症程度および象牙質誘導能
3. 学会等名 第 37 回日本小児歯科学会九州地方大会および総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 袁輪映里佳, Syed Taufiqul Islam, 倉重圭史, 村田佳織, 谷村明彦, 齊藤正人.
2. 発表標題 ヒト歯肉線維芽細胞の Ca <sup>2+</sup> 排出機構に対するフェニトインの作用
3. 学会等名 第 57 回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田裕介, 倉重圭史, 齊藤正人, 齋藤隆史, 伊藤修一.
2. 発表標題 接着性モノマーのカルシウム塩を配合したレジ ン系コーティング材の開発
3. 学会等名 第 57 回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Syed Taufiqul Islam, 袁翰映里佳, 野呂大輔, 倉重圭史, 齊藤正人.
2. 発表標題 Characterization of Epithelial cell rests of malassez by single cell limiting dilution
3. 学会等名 第 57 回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重圭史, 榎原さや夏, 藤田裕介, Syed Taufiqul Islam, 村井雄司, 根津尚史, 齊藤正人.
2. 発表標題 S-PRG フィ ラー含有マウスガード材における基礎的研究
3. 学会等名 第 57 回日本小児歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Erika Minowa, Syed Taufiqul Islam, Yoshihito Kurashige, Masato Saitoh.
2. 発表標題 Effects of phenytoin on the pathways for the Ca <sup>2+</sup> excretion in human gingival fibroblasts ,
3. 学会等名 27th IAPD congerss
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Syed Taufiqul Islam, Erika Minowa, Daisuke Noro, Yoshihito Kurashige, Masato Saitoh.
2. 発表標題 Characterization of cloned cells established from epithelial cell rest 's of Malassez through single cell limiting dilution
3. 学会等名 27th IAPD congerss
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉重圭史, 下道真由美, 田中真樹, 竹腰英夫, 武田秀勝, 齊藤正人
2. 発表標題 エゾウコギによる上皮細胞間結合 装置への影響
3. 学会等名 第2回 クロレラ・機能性植物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蓑輪映里佳, 根津顕弘, 倉重圭史, 齊藤正人, 谷村明彦
2. 発表標題 ヒト歯肉線維芽細胞における生理的刺激による Ca <sup>2+</sup> 応答とフェニトインの作用
3. 学会等名 第 61 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Syed Taufiqul Islam, 蓑輪映里佳, 野呂大輔, 倉重圭史, 齊藤正人
2. 発表標題 クローニングマラッセ上皮遺残細胞の特性解析
3. 学会等名 第 61 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉重圭史, 榊原さや夏, 蓑輪映里佳, Syed Taufiqul Islam, 齊藤正人
2. 発表標題 TMR MTA cement Mielleeにおける象牙質誘導能の評価
3. 学会等名 第37回日本小児歯科学会北日本地方会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	吉田 光希 (YOSHIDA Mitsuki)  (30453260)	北海道医療大学・歯学部・助教  (30110)	
研究分担者	齋藤 正人 (SAITOH Masato)  (50337036)	北海道医療大学・歯学部・教授  (30110)	
研究分担者	村田 佳織 (MURATA Kaori)  (70781053)	北海道医療大学・歯学部・助教  (30110)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------