

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17241

研究課題名(和文) IGF1とHif1 の歯胚発生における機能の解明と再生歯形態制御への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the functions of IGF1 and Hif1a in tooth development to regulate bioengineered tooth morphogenesis

研究代表者

大柳 俊仁 (Oyanagi, Toshihito)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90805326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、歯の形態形成におけるIGF1とHif1 の発現と機能、および相互作用を解明し、IGF1を基軸とした再生歯形態制御技術確立のための基盤的知見を獲得することである。本研究により、IGF1は歯胚上皮および間葉細胞の増殖および分化を亢進するとともに、エナメルノット形成を亢進することで、再生歯の形態を制御することが示された。さらに、低酸素シグナルとも密接な関わりのあるIGFBPが、歯胚間葉細胞の象牙芽細胞への分化に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

失われた組織や臓器を取り戻すことができる再生医療は、今もなお社会から切望されている。本研究の成果は、IGF1を基軸とした実用的な歯の再生に向けた基盤技術のさらなる発展に寄与するだけでなく、発生過程でIGF1による形態制御を受ける様々な臓器の再生にも応用できる可能性があり、将来の再生医療技術の進歩に役立つ点で非常に大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the expression, function, and interaction between IGF1 and Hif1a in tooth morphogenesis, to acquire fundamental knowledge for regulating bioengineered teeth morphology based on IGF1. As a result, it was revealed that IGF1 regulates the morphology of bioengineered teeth by enhancing the proliferation and differentiation of dental epithelial and mesenchymal cells, as well as inducing enamel knot formation. Furthermore, it was suggested that IGFBP, which is closely related to hypoxia signaling, is involved in the differentiation of dental mesenchymal cells into odontoblasts.

研究分野：医歯薬学

キーワード：IGF1 Hif1 Hif2 歯胚発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷、齲蝕および歯周炎等により歯の欠損が生じると、咀嚼能力や審美性が低下し、生活の質が損なわれる。これらの歯の欠損に対する次世代の治療方法として、歯の再生医療への期待が高まっている。申請者の所属するグループは、器官原基法を応用してマウス再生歯胚を人為的に作製し、成体マウス口腔内で再生歯が発達・萌出することを明らかにして、歯の再生実現の可能性を示した(Ikeda et al., PNAS, 2009)。しかし、発生した再生歯は天然歯と比較し顕著にサイズが小さく、異常な咬頭パターンによる形態不良を示した。歯のサイズや形は歯種によって異なり、固有の審美性や機能的役割を担う。重要なことに、歯のサイズは食物の粉碎効率に、形は咀嚼効率に影響する (Berthume et al., Anatomical Record, 2016)。以上より、歯の再生医療の目標は、天然歯と同等のサイズと形を有する歯を再生し、個々の患者の審美性と顎口腔機能を回復することである。それゆえ、天然歯に近いサイズと形を持つ再生歯作製の実現のため、形態制御技術の開発が必要である。

Insulin-like growth factor 1 (IGF1)は歯胚上皮と間葉組織に発現し、細胞の有糸分裂活性、エナメル質形成の亢進、組織の体積増加を誘導する。申請者の所属するグループは、インスリン抵抗性に起因する先天性疾患である妖精症患者において、治療のため IGF1 を長期投与された結果、顕著な歯のサイズの増大と異常な歯冠形態が認められることを報告した (Fukunaga et al., Angle Orthod, 2008)。これらの知見から申請者らは、IGF1 が歯の形態を制御する主要因子であると考え、器官原基法により発生させた再生歯胚および再生歯形態への IGF1 の作用を解析してきた。器官培養中に IGF1 を作用させた再生歯胚のサイズは、対照群と比較し有意に増大した(Oyanagi et al., Sci Rep, 2019)。また、それらの再生歯胚から発達した再生歯は、サイズに加えて咬頭数も増加した。以上の結果は、成長因子による再生歯胚および再生歯の形態制御の可能性を示した、世界で初めての知見である。しかし、IGF1 を作用させた再生歯は天然の歯と比較してなお小さく、咬頭サイズや咬頭数も少なかった。IGF1 を基軸とした再生歯形態制御のさらなる発展のためには、歯の発生における IGF1 の生物学的作用と、他分子との相互関係の解明が必要である。

Hypoxia-inducible factor 1 α (Hif1 α)は、低酸素ストレスに対する細胞の適応応答で中心的役割を果たす転写因子であるが、歯の発生における役割は不明である。申請者は、胎生マウス歯胚において Hif1 α が歯胚上皮組織に発現することを初めて明らかにし、Hif1 α が歯の発生に関与する可能性を見出した。ところで、ヒト網膜上皮細胞において IGF1 は、MAPK および PI3K を介して Hif1 α 発現と活性を亢進する。一方、マウス筋芽細胞において、低酸素下では Hif1 α 活性化により IGF1 の作用が変化する。重要なことに、Hif1 α は IGF1 の作用に影響する insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP)1、2、3 の mRNA 転写を促し、IGF1 シグナルを制御することが示唆されている。以上より申請者は、Hif1 α は IGF1 シグナルと相互に作用し、歯の形態形成を制御する因子であると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯の形態形成における IGF1 と Hif1 の発現と機能、および相互作用を解明することである。さらに、申請者らが明らかにした IGF1 による再生歯のサイズと咬頭形成亢進に対する Hif1 の作用を解析し、得られた知見からより天然歯に近い形態を示す再生歯の作製方法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 歯胚形態形成における IGF1、IGF1 受容体および Hif1 の発現解析

Reverse transcription PCR (RT-PCR)

胎齢 14.5 日 C57BL/6 マウスの下顎臼歯歯胚を外科的に摘出し、下顎臼歯歯胚から分離した歯胚上皮組織および間葉組織からそれぞれ RNA を抽出した。精製後、逆転写反応を行い、cDNA 合成を行った。マウス IGF1 および IGF1R のプライマーを用いて PCR 反応させ、得られた産物を ethidium bromide 含有 2% アガロースゲルを用いて電気泳動により分離した。

免疫染色

妊娠 13.5 (蓄状期) 14.5 (帽状期) 16.5 (鐘状期) 日 C57BL/6 マウスに pimonidazole を投与して 30 分後に屠殺、胎生マウス頭部を摘出して 4% PFA で固定した。脱水後、パラフィン包埋を行い、組織切片を作成した。組織切片上で Hypoxyprobe-1 Kit を用いて低酸素シグナルを検出し、歯胚における低酸素領域を解析した。また、Hif1 および Hif2 の発現を解析するため、脱パラフィンした組織切片を 10% donkey serum 含有 PBS によりブロッキング後、rabbit 抗 Hif1 抗体または rabbit 抗 Hif2 抗体を 4 で一晩、反応させた。PBS で洗浄後、donkey anti-rabbit IgG Alexa 568 を室温で 1 時間反応させた。サンプルは、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した。

(2) 歯胚形態形成における IGF1 および Hif1 の機能解析

歯胚の器官培養

胎齢 14.5 日 C57BL/6 マウスの下顎臼歯歯胚を摘出し、30 μ l の I 型コラーゲンゲル中に埋入し、37 で 10 分間インキュベート後、24-well plate のウェルに挿入された cell culture insert

に移動した。各ウェルに 250 μ l の 10% fetal bovine serum (FBS)、100 unit/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin を含む Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM) を加え、37 の CO₂ インキュベータにて培養を開始した。翌日、培地を 10% FBS、100 units/ml の penicillin および 100 μ g/ml の streptomycin、2mM L-glutamine、100 μ g/ml ascorbic acid を含む D-MEM に交換し、以後培地交換は 1 日おきに行った。IGF1 シグナル活性剤としてリコンビナント IGF1 を、Hif1 の機能阻害剤として KC7F2 を、Hif2 の機能阻害剤として TC-S 7009 を、それぞれ I 型コラーゲンゲルと培地へ添加した。器官培養後、位相差顕微鏡にて形態計測を行った。

歯胚由来上皮および間葉細胞培養

胎齢 14.5 日 C57BL/6 マウスの下顎臼歯歯胚を摘出して酵素処理を行い、歯胚上皮および間葉細胞を単離した。歯胚由来上皮細胞の培養には 20 μ g/ml フィブロネクチンおよび 100 μ g/ml I 型コラーゲンでコートされたディッシュまたはプレートと、CnT-Prime Differentiation medium を用いた。歯胚由来間葉細胞の培養には、10% FBS、100 units/ml の penicillin および 100 μ g/ml の streptomycin を添加した D-MEM を用いた。歯胚由来上皮はリコンビナント IGF1 存在下で、歯胚由来間葉細胞はリコンビナント IGF1 およびリコンビナント bone morphogenetic protein 2 (BMP2) 存在下で単層培養された。

リアルタイム PCR

器官培養を行った胎齢 14.5 日 C57BL/6 マウスの下顎臼歯歯胚を、上皮および間葉組織に分離し、それぞれの組織から RNA を抽出した。その後、リアルタイム PCR を用いて歯胚発生に重要な役割を持つ遺伝子と、エナメル芽細胞、象牙芽細胞、エナメルノットおよび細胞増殖マーカーの発現を解析した。さらに、歯胚由来上皮および間葉培養細胞からも RNA を抽出した。その後、リアルタイム PCR によりエナメル芽細胞および象牙芽細胞マーカー、IGFBP の発現を解析した。

(3) 再生歯胚形態形成における IGF1 の機能解析

再生歯胚の作製

胎齢 14.5 日 C57BL/6 マウスの下顎臼歯歯胚から採取した上皮および間葉細胞を高密度に区画化し、3 次元的に再構築する器官原基法(Nakao et al., Nat. Methods, 2007)を用いて、再生歯胚を作製し、器官培養を行った。IGF1 シグナル活性剤としてリコンビナント IGF1 を I 型コラーゲンゲルと培地へ添加した。器官培養後、位相差顕微鏡にて形態計測を行った。

ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション

RNA プローブは、DIG RNA labeling mix を用いて作製した。マウス fibroblast growth factor (FGF4) の遺伝子断片は、再生歯胚から抽出したトータル RNA をもとに合成された一本鎖 cDNA を鋳型とし、マウス FGF4 のプライマーを用いて PCR により増幅した。得られた遺伝子断片を pGEM-T ベクターに組み込み、それらを鋳型としてアンチセンスおよびセンス RNA プローブを作製した。5 日間器官培養した再生歯胚を、4% PFA を用いて固定後、0.1% Tween 20 を含む PBS で希釈した 6% 過酸化水素を用いて常温で 1 時間処理し、10 μ g/ml proteinase K を用いて 30 分で 3 分間処理した。さらに、後固定及びプレハイブリダイゼーションを行い、ジゴキシゲニン標識された RNA プローブを用いて 70 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。10% ヒツジ血清を用いてブロッキングを行い、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を 4 °C で一晩反応させた。抗体を洗浄後、nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphate を基質としてアルカリフォスファターゼ活性を検出した。

4. 研究成果

(1) 歯胚発生における IGF1、IGF1 受容体および Hif1 の発現について

低酸素シグナルに関わる因子として、Hif1 だけでなく、Hif2 についても解析を行うこととした。歯胚の発生過程における Hif1 および Hif2 の発現を解析した結果、各ステージで歯胚は低酸素環境にあり、Hif1 および Hif2 の発現が認められた。器官原基法で用いる帽状期の歯胚において、IGF1、IGF1 受容体および Hif2 は歯胚上皮および間葉組織の両方で発現する一方、Hif1 は歯胚上皮組織で明らかな発現が認められた(図 1)。

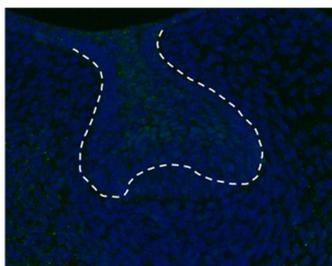


図1. 帽状期のマウス下顎臼歯歯胚における Hif1 α の発現

(2) 歯胚の形態形成における IGF1 および Hif1 の機能について

歯胚の器官培養の結果、リコンビナント IGF1 の濃度依存的に歯胚のサイズが増大し、一方、Hif2 阻害剤を作用させた歯胚では、サイズが減少することが明らかとなった。

これまでの申請者らの研究で、IGF1 が歯胚由来上皮および間葉細胞の増殖を亢進することが

明らかとなっている。歯胚の形態形成における IGF1 の機能をさらに解析するため、リアルタイム PCR を行った結果、IGF1 を添加して器官培養したマウスの下顎臼歯歯胚において、上皮組織ではエナメル芽細胞マーカー *enamelin*、間葉組織では象牙芽細胞マーカー *dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP1)* の発現が有意に亢進した。単層培養した歯胚由来上皮細胞においては、IGF1 によりエナメル芽細胞マーカー *ameloblastin* の発現が亢進した。また、歯胚由来間葉細胞に対し、象牙芽細胞分化を誘導する BMP2 と同時に IGF1 を作用させたところ、歯胚由来間葉細胞における象牙芽細胞マーカー *DMP1*、*dentin sialophosphoprotein (DSPP)* および *microtubule-associated protein 1b (MAP1B)* の発現が IGF1 により亢進した。加えて、IGFBP2、3、4 および 6 の遺伝子発現に変動が認められた。

これらの知見より、IGF1 は歯胚上皮および間葉細胞の増殖と分化を亢進し、歯胚のサイズを増大することが明らかとなった。さらに、歯胚由来間葉細胞の象牙芽細胞への分化に、IGFBP が関与することが示唆された。

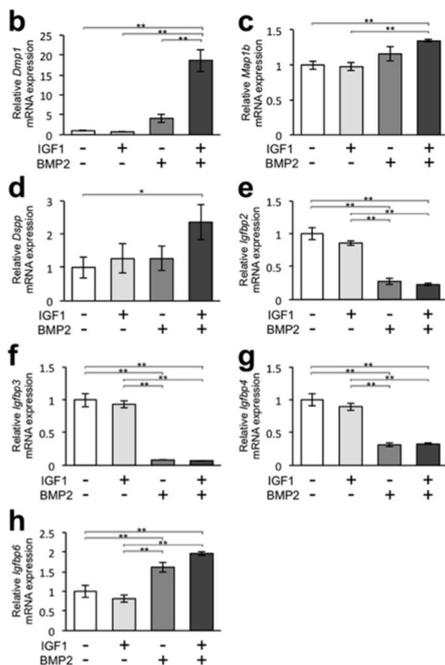


図2. マウス歯胚由来間葉細胞における象牙芽細胞マーカーおよびIGFBPの発現 (Oyanagi et al., Sci Rep, 2019)

(3) 再生歯胚の形態形成における IGF1 の作用について

これまでに申請者らは、IGF1 により再生歯胚のサイズが増大し、さらに、再生歯胚から発達した再生歯は、サイズに加えて咬頭数も増加することを明らかにした。今回、マウス再生歯胚のホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、IGF1 によりエナメルノットマーカーである *FGF4* の発現箇所数が増加した。この知見より、IGF1 によるエナメルノットマーカー発現の亢進が、再生歯の咬頭数増加に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikuko Takano, Nobuo Takeshita, Michiko Yoshida, Daisuke Seki, Toshihito Oyanagi, Seiji Kimura, Wei Jiang, Kiyoo Sasaki, Chisumi Sogi, Masayoshi Kawatsu, Teruko Takano Yamamoto	4. 巻 236(4)
2. 論文標題 Ten-m/Odz3 regulates migration and differentiation of chondrogenic ATDC5 cells via RhoA-mediated actin reorganization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 2906-2919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30058	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 Wei Jiang, Nobuo Takeshita, Toshihiro Maeda, Chisumi Sogi, Toshihito Oyanagi, Seiji Kimura, Michiko Yoshida, Kiyoo Sasaki, Arata Ito, Teruko Takano-Yamamoto	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Connective tissue growth factor promotes chemotaxis of preosteoblasts through integrin 5 and Ras during tensile force-induced intramembranous osteogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82246-9	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 Chisumi Sogi, Nobuo Takeshita, Wei Jiang, Siyoung Kim, Toshihiro Maeda, Michiko Yoshida, Toshihito Oyanagi, Arata Ito, Seiji Kimura, Daisuke Seki, Ikuko Takano, Yuichi Sakai, Ikuma Fujiwara, Shigeo Kure, Teruko Takano Yamamoto	4. 巻 4(7)
2. 論文標題 Methionine Enkephalin Suppresses Osteocyte Apoptosis Induced by Compressive Force through Regulation of Nuclear Translocation of NFATc1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JBMR Plus.	6. 最初と最後の頁 e10369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm4.10369	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 Toshihito Oyanagi, Nobuo Takeshita, Mamiko Hara, Etsuko Ikeda, Toko Chida, Daisuke Seki, Michiko Yoshida, Masahiro Seiryu, Ikuko Takano, Seiji Kimura, Masamitsu Oshima, Takashi Tsuji & Teruko Takano-Yamamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Insulin-like growth factor 1 modulates bioengineered tooth morphogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36863-6	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 曾木千純、竹下信郎、伊藤新、吉田倫子、大柳俊仁、藤原幾磨、山本照子
2. 発表標題 MENKは圧縮力による骨細胞のアポトーシスを抑制する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野 郁子、竹下 信郎、関 大輔、大柳 俊仁、吉田 倫子、木村 晴地、川津、 正慶、山本 照子
2. 発表標題 Odz3はRhoA、アクチン制御を介した遊走促進および分化の促進により、ATDC5の軟骨細胞分化を調整する
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihito Oyanagi, Nobuo Takeshita, Mamiko Hara, Etsuko Ikeda, Toko Chida, Daisuke Seki, Michiko Yoshida, Masahiro Seiryu, Ikuko Takano, Seiji Kimura, Masamitsu Oshima, Takashi Tsuji, Teruko Takano-Yamamoto
2. 発表標題 IGF1 regulates morphogenesis of bioengineered teeth via proliferation and differentiation of dental epithelial and mesenchymal cells
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018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

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
---------	---------