

平成 21年 4月 13日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791585

研究課題名 (和文) 細胞間結合の制御によるエナメル質再生法の開発

研究課題名 (英文) Establishment of the method for enamel regeneration using proper gap junctional communication.

研究代表者

山田 亜矢 (YAMADA AYA)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40295085

研究成果の概要：我々はエナメル質の再生およびう蝕などの宿主感受性（リスク）の原因や診断法の開発を目標として、エナメル質形成に関わる分子の包括的な解析を行ってきた。歯の発生過程に関わる新規の分子を検索し、歯に異常をきたす眼歯指異形成症の原因遺伝子である Gjal 分子に着目した。この細胞間結合蛋白である Gjal 分子について解析を行った結果、ギャップ結合分子の存在やその制御が、歯の発生に極めて重要かつ必須の分子であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：エナメル質再生、細胞間結合、Gjal

## 1. 研究開始当初の背景

歯の人工的な再生や組織構築は、歯科治療の最終目標といっても過言ではない。特にエナメル質に関しては、骨や象牙質と異なり、病的な欠損によって二度と自己修復が行われることはなく、現時点では人工的な修復治療に頼らざるを得ない。そこで我々はエナメル質の再生およびう蝕などの宿主感受性（リスク）の原因や診断法の開発を目標として、エナメル質形成に関わる分子の包括的な解析を行ってきた。エナメル質の形成には、1) 口腔上皮の陥入によって生じる歯原性上皮細胞が、縦長の細胞極性を有する細胞への分化、そし

て2) エナメルマトリックスを分泌するようなエナメル芽細胞への分化、この2つの過程が重要である。この2つの分化過程を厳密に *in vitro* で制御可能となれば、人工的なエナメル質の再生が可能となる。我々の研究室では、歯原性上皮細胞株を用いて、1) の過程において基底膜分子ラミニンの或るアイソフォームが重要であることを見出し、後半の過程においてはエナメル基質の分泌に関わる転写因子の同定と、その基質分子の一つであるアメロブラスチンのエナメル質形成における役割を明らかにしてきた。その結果、ラミニン及びアメロブラスチン分子を用いた培養法

により、歯原性上皮細胞株の大量培養と、本細胞をエナメル芽細胞に分化させる手法を見出した。しかしながら、エナメル基質の発現に関しては、*in vivo* のそれと比較して低く、人工エナメル質の形成には不十分であり、エナメル基質の発現誘導に関して、細胞外マトリックスや細胞増殖因子以外の第3の因子が関わっている可能性が示唆された。

そこで、歯の発生過程に関わる新規の分子を検索する目的で、我々は歯胚に発現する遺伝子データベースの作成に参画し、このデータベースを用いた分子スクリーニング（デジタルディフレンシャルディスプレイ）を行ってきた（山田他、第46回歯科基礎医学会総会2004年）。その中でエナメル芽細胞および象牙芽細胞の発生段階で特異的に発現する細胞間結合蛋白の同定に成功した（山田他、第44回日本小児歯科学会2006年）。エナメル芽細胞に特異的に発現する分子は、眼歯指異形成症（Occulodentodigital dysplasia）の原因遺伝子であるGap junctional protein alpha1 (Gjal)であり、本疾患は歯の先天欠如、エナメル質形成不全症を示す疾患であることから、Gjalを介した細胞間結合が、エナメル質の形成に必須であることが示唆された。また、象牙芽細胞分化過程で特異的に発現する分子は全く新規の分子であり、軟骨組織と前象牙芽細胞にのみ発現を示す分子であることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

エナメル質の再生法の開発には、エナメルマトリックスの分子機能の解析が重要であり、これまでの研究で、アメロジェニン、アメロブラスチン、エナメルリンがエナメル質形成の重要な分子であることがわかっている。我々の研究でアメロブラスチンがエナメルマトリックスの発現制御およびエナメル芽細胞の分化に必須の分子であることが明らかになっている。しかしながらアメロブラスチンの発現制御に関わる分子メカニズムは未だ不明である。さらに、我々の研究で細胞間のギャップ結合特にGjal分子がアメロブラスチン発現制御に関わる新規遺伝子であることも示唆されている。

そこで、本研究において、Gjal分子がアメロブラスチン発現に及ぼす影響について詳細に検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) ギャップ結合関連遺伝子の歯胚発生過程における発現解析

歯胚組織内におけるGjal遺伝子発現制御を検討する目的で、合成オリゴプローブを用いた*in situ* hybridization法により歯胚発生過程における遺伝子発現部位、時期等に関する詳細な解析を行った。

### (2) 発現ベクターの作成

Gjal過剰発現ベクターを用いて、ヒト眼・歯・指異形成症に認められたGjal遺伝子変異と同様の部位に、人為的に変異を加えた発現ベクターを構築した。

### (3) 過剰発現細胞の作成とその機能解析

Gjal過剰発現細胞とGjal変異遺伝子導入細胞における細胞増殖能とエナメル芽細胞分化マーカーの遺伝子発現の検討した。

### (4) Gjal欠損マウスにおける歯胚発生の組織学的検討

胎生12.5日以降の各ステージにおける歯胚形成の検討およびエナメル芽細胞分化マーカーの発現について免疫組織学的検討を行った。

### (5) Gjal欠損マウスにおける肺および唾液腺発生の組織学的検討

### (6) 遺伝子発現抑制およびギャップ結合阻害剤を用いた機能解析 (図1)

Gjal 遺伝子に対して、その分子発現を抑制するためのsiRNAiを歯原性上皮細胞にトランスフェクションし、エナメルマトリックスの発現について、RT-PCR および免疫染色により確認した。またギャップ結合阻害剤として18 $\alpha$ -glycyrrhetic acidおよびoleamideを歯原性上皮細胞に添加し、TGF- $\beta$  1刺激によるアメロブラスチンの発現誘導について検討を行った。

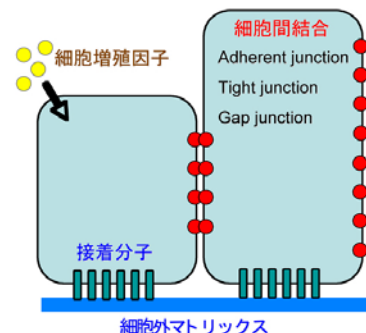


図1

## 4. 研究成果

歯胚の形成期におけるGjalの発現に関しては、マウス臼歯では胎生13.5~14.5日では発現が認められず、胎生17.5日から発現が認められた。また、6週齢のマウス切歯の組織におけるGjalの局在については、分泌前期、分泌期および成熟前期のエナメル芽細胞に多く発現が認められ、成熟後期のエナメル芽細胞では、発現が認められなかった。これらのことから、Gjal分子がエナメル芽細胞の分化時期特異的に発現し、マウスのエナメル芽細胞において細胞の分化に重要であることが示唆された。また、Gjal分子の欠損マウスを用いた解析から、頭蓋顔面の形態異常と

エナメル芽細胞の分化異常を示し、ヒトの眼歯指異形成症と類似の表現系を示すことを明らかにした。本マウスは先天性の心臓疾患と肺の形成異常のため、出生後まもなく死亡する。(図2)

図2

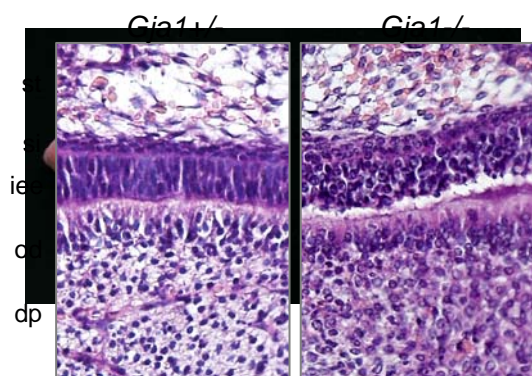


図3

本マウスのエナメル芽細胞(iee)について詳細な解析を行った結果、細胞極性が著しく阻害されていること(図3)、さらにはマウス歯胚由来 mRNA を用いたマイクロアレーの解析から、エナメル基質のうち、アメロブラスチンの発現が、Gjal 欠損マウスにおいて著しく低下している結果が得られた。このことから、ギャップ結合、特に Gjal 分子がアメロブラスチン発現制御に関わる新規分子であることが明らかとなった。さらに Gjal によるアメロブラスチン発現に関わる分子シグナルの同定にも成功し、ギャップ結合分子の発現が、細胞外からの増殖因子刺激による細胞内シグナル分子 MAPKinase のリン酸化制御に関わることを発見した。以上の結果から、ギャップ結合分子の存在やその制御が、歯の発生に極めて重要かつ必須の分子であることが明らかとなった。

#### 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2件)

- ① Yamamoto S., Fukumoto E., Yoshizaki K.,

Iwamoto T., Yamada A., Tanaka K., Suzuki H., Aizawa S., Arakaki M., Yuasa K., Oka K., Yang Chai, Nonaka K., Fukumoto S.

Platelet-derived Growth Factor Receptor Regulates Salivary Gland Morphogenesis via Fibroblast Growth Factor Expression

*The Journal of Biological Chemistry* 査読有 2008,283(34):23139-23149

- ② Yoshizaki K., Yamamoto S., Yamada A., Yuasa K., Iwamoto T., Fukumoto E., Harada H., Saito M., Nakasima A., Nonaka K., Yamada Y., Fukumoto S.

Neurotrophic Factor Neurotrophin-4 Regulates Ameloblastin Expression via Full-length TrkB

*The Journal of Biological Chemistry* 査読有 2008,283(6):3385-3391

[学会発表] (計5件)

- ① Suzuki H., Yamada A., Fukumoto S.  
Gap junctional regulation of salivary gland morphogenesis  
The 3<sup>rd</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai • Sendai Japan • 2009.1.15

- ② Fukumoto S., Yamada A.  
Gap junctional communication regulates ameloblast differentiation  
The 3<sup>rd</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai • Sendai Japan • 2009.1.15

- ③ 鈴木宏治, 山田垂矢, 山本晋也, 岩本 勉, 木村泰子, 笹野泰之, 福本 敏  
唾液腺分岐形成におけるギャップ結合分子の役割  
第50回歯科基礎医学会学術大会・東京・2008.9.23

- ④ Yamada A., Fukumoto E., Iwamoto T., Harada H., Nonaka K., Fukumoto S.  
Gjal regulates TGF-β1 induced ameloblastin expression  
86<sup>th</sup> IADR/CADR General Session and Exhibition • Toronto Canada • 2008.7.3

- ⑤ 山田垂矢, 岩本 勉, 福本恵美子, 野中和明, 福本 敏  
細胞間結合を利用したエナメル芽細胞の分化制御法の開発  
第46回日本小児歯科学会大会・大宮市・2008.6.12

[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◇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〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 亜矢 (YAMADA AYA)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：40295085

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：