

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24085

研究課題名(和文) HIF-2 による象牙芽細胞分化制御の解明-iPS細胞を用いた歯胚発生への応用-

研究課題名(英文) Analysis of roles of HIF-2a in odontoblast differentiation for regeneration of tooth germs using iPS cells.

研究代表者

木村 晴地 (KIMURA, SEIJI)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：40850590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、歯胚発生におけるHIF-2 の機能と分子機構を明らかにし、将来HIF-2 をiPS細胞から歯胚発生能をもつ細胞の樹立に応用するための基盤的知見を獲得することを目的として解析を行った。その結果、歯胚発生におけるHIF-2 の下流因子としてnotchシグナリング因子が同定され、これらの因子により歯原性細胞の分化が制御されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで歯の発生の分子制御に関する報告が多くなされてきた。しかし、我々が初めて明らかにした、生体において歯胚が低酸素環境にあることを考慮すると、歯原性細胞における低酸素応答による歯胚発生制御の解明が必須である。本研究により世界で初めて、HIFファミリーのうちHIF-2 が歯原性細胞の分化を制御することが示され、さらにその機能はnotchシグナリング因子を介することが明らかとなった。今後、iPS細胞から歯胚発生能をもつ細胞を樹立するうえで、この新規分子メカニズムが重要な役割を担う可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I analyzed the function and molecular mechanism of HIF-2 in tooth germ development to get basic knowledge for applying HIF-2 signaling to generate tooth germs using iPS cells in the future. I have identified a notch signaling molecule as a downstream factor of HIF-2 in tooth germ development, and it has been shown that these factors regulate the differentiation of odontogenic cells.

研究分野：矯正歯科

キーワード：HIF-2 象牙芽細胞 エナメル芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎生期の局所的な低酸素環境では、転写因子 HIF が活性化し、正常な組織発生に寄与する。歯の発生と低酸素の関わりについては、低酸素によるエナメル芽細胞の機能不全が知られる。この知見から HIF の歯の発生における役割が推察されるが、その科学的根拠は不明であった。我々は、胎生マウス歯胚が低酸素環境にあり、歯性上皮と間葉において HIF-2 α が発現することを明らかにした。また、器官培養で HIF-2 α 阻害剤を作用させた歯胚は、サイズの減少を示した。以上より、歯胚発生における HIF-2 α を基軸とした低酸素応答の重要性が初めて示された。しかし、HIF-2 α の歯胚発生における役割の詳細は未だ明らかではなかった。

我々のグループは、iPS 細胞の歯の再生への応用を目指し、マウス iPS 細胞への Pax9 と BMP4 遺伝子導入による、歯性間葉細胞様細胞の樹立に成功した。この細胞の歯胚発生能解析のため、マウス歯性上皮組織と 3 次元的に再構築し器官培養を行ったが、歯胚は発生しなかった。この iPS 細胞由来歯性間葉細胞を、将来的に再生歯胚作製の細胞ソースとして用いるためには、この細胞の分化レベルの制御が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、歯胚発生における HIF-2 α の機能と分子機構を明らかにし、将来 HIF-2 α を iPS 細胞から歯胚発生能をもつ細胞の樹立に応用するための基盤的知見を獲得することを目的とした。これにより、低酸素応答に着目した歯胚発生制御研究の新展開につながり、また歯の発生に必要な iPS 細胞由来の細胞ソース作製技術への応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) 歯胚の器官培養

妊娠マウスは頸椎脱臼して屠殺し、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た。下顎臼歯歯胚を 35 μ l の 型コラーゲンゲル中に埋入し、37 $^{\circ}$ C 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、100 unit/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin、2mM L-glutamine、100 μ g/ml ascorbic acid を含む Dulbecco's modified eagle medium を加え、37 $^{\circ}$ C の CO $_2$ インキュベータにて培養を開始した。培地交換は 1 日おきに行った。HIF-2 α の機能阻害のために、20 μ M TC-S 7009 を 型コラーゲンゲルと培地へ添加した。

(2) 免疫染色

器官培養した歯胚を 4% paraformaldehyde (PFA) にて固定した。脱水後、組織をパラフィンに包埋し、5 μ m の厚さで組織切片を作製した。HIF-2 α の検出のために、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 HIF-2 α 抗体を 4 で一晩、切片上で反応させた。PBS にて洗浄後、donkey anti-rabbit IgG Alexa 568 を室温で 1 時間反応させた。

蛍光免疫染色画像は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影された。

(3) 歯原性上皮細胞株 SF2 の低酸素培養

SF2 は、10%FBS、100 units/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin を含む DMEM/F-12 を用いて 37°C で培養した。培養 2 日目に HIF-2 α の機能阻害のために、20 μ M TC-S 7009 を培地へ添加し、Hypoxia Chamber を用いて 5%O₂ 下の低酸素環境で培養を行った。

(4) リアルタイム PCR

TC-S 7009 を培地に添加して培養した SF2 から RNA を精製し、Notch シグナリング因子およびエナメルマトリックスタンパクの発現をリアルタイム PCR で解析した。

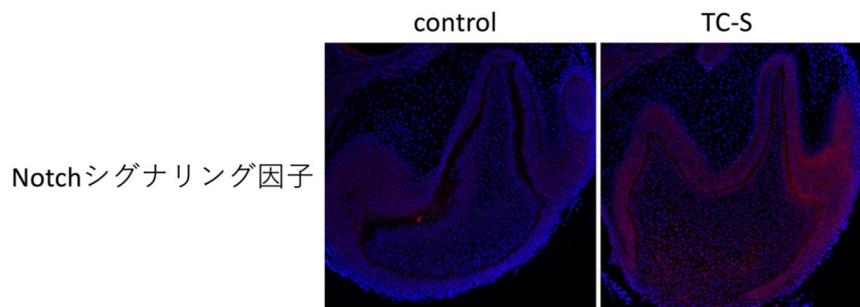
(5) SF2 への遺伝子導入

発現プラスミドの遺伝子導入により Notch シグナリング因子を過剰発現させた SF2 からタンパク質を精製し、amelogenin の発現を western blot により解析した。

4 . 研究成果

(1) HIF-2 α 阻害剤による Notch シグナリング因子の発現変化

マウス臼歯歯胚の器官培養において HIF-2 α 阻害剤 TC-S 7009 を作用させ、Notch シグナリング因子の発現を免疫染色にて解析した。その結果、TC-S 7009 により、歯胚上皮における Notch シグナリング因子の発現増加が認められた。一方、歯胚間葉においては、この Notch シグナリング因子の明らかな発現変化は認められなかった。

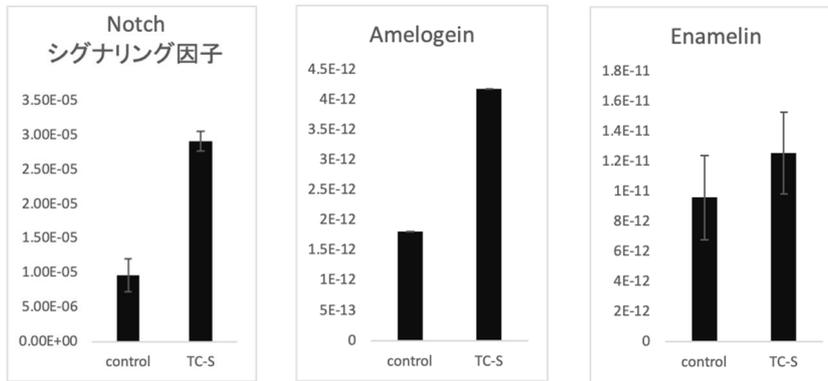


(2) SF2 における HIF-2 α 阻害剤による Notch シグナリング因子およびエナメルマトリックスタンパクの発現変化

研究開始当初は、歯胚間葉における HIF-2 α の役割を重点的に解析する予定であったが、下流の Notch シグナリング因子が HIF-2 α により明らかな発現変化を示したことから、歯原性上皮細胞における HIF-2 α と Notch シグナリング因子の働きについて、さらなる解析を行うこととした。

歯原性細胞株 SF2 に TC-S 7009 を作用させ、Notch シグナリング因子およびエナメルマトリックスタンパクの発現を、リアルタイム PCR で解析した。その結果、TC-S 7009 による Notch シグナリング因子の発現上昇が認められた。また、エナメルマトリックスタンパクである amelogenin

および enamelिन の発現も、TC-S 7009 により増加した。



(3) SF2 における Notch シグナリング因子過剰発現によるエナメルマトリックスタンパクの発現変化

SF2 に発現プラスミドの遺伝子導入により Notch シグナリング因子を過剰発現させ、amelogenin の発現を western blot により解析した。その結果、Notch シグナリング因子の過剰発現による amelogenin の発現増加が認められた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sogi Chisumi, Takeshita Nobuo, Jiang Wei, Kim Siyoung, Maeda Toshihiro, Yoshida Michiko, Oyanagi Toshihito, Ito Arata, Kimura Seiji, Seki Daisuke, Takano Ikuko, Sakai Yuichi, Fujiwara Ikuma, Kure Shigeo, Takano Yamamoto Teruko	4. 巻 4
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 1-13
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 Jiang Wei, Takeshita Nobuo, Maeda Toshihiro, Sogi Chisumi, Oyanagi Toshihito, Kimura Seiji, Yoshida Michiko, Sasaki Kiyoo, Ito Arata, Takano-Yamamoto Teruko	4. 巻 11
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 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------