

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03898

研究課題名(和文)細胞-細胞間および細胞-細胞外コミュニケーションによる器官形成メカニズムの解読

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of organ formation by cell-cell and cell-extracellular communications

研究代表者

岩本 勉 (Iwamoto, Tsutomu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90346916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物体であるわれわれの個々の細胞は、周囲の細胞や細胞自身を取り囲む細胞外環境と相互作用することによって、その分化運命が決定され、それぞれが専門化した役割を担った細胞となり、その集合体によって最終的に精巧な器官を構築する。つまり細胞を取り巻く細胞外環境は、器官形成における決定的な制御因子となる。本研究期間において、歯の発生過程で重要な役割を担う歯原性上皮細胞の新規細胞外マトリックスタンパク質Vwdeを同定し、歯のエナメル質形成に重要な役割を担っていることを明らかにした。また、歯原性間葉細胞において液性因子としてのFGF2の新たな役割、さらにはホメオボックス遺伝子の役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯は生活を営む上で重要な器官であるが、一度失われると再生することはない。現在は人工的な材料によって回復が図られているが、克服すべき課題が多い。また、再生医療が多くの領域で進んできているものの、歯の再生医療は他領域にとって遅れをとっている。本研究で得られた知見はその一助になると確信する。細胞分化において環境因子は薬剤よりも上位にある。すなわち、細胞にとって適切な環境が整っていない条件下で、薬剤を投与した場合、期待する効果を得ることは難しい。よって、細胞にとって適切な環境である場を整えることで、薬剤を投与することなく、内因性因子を活性化する方法の探索は新規治療法を創出する一助にもなると確信する。

研究成果の概要(英文)：As multicellular organisms, cells in our body determine their cell fate by interacting with surrounding other types of cells and the extracellular environment to differentiate into specialized cells and finally build elaborate organs by their aggregation. Therefore, the extracellular environment factors surrounding a cell are a critical regulator of organogenesis. In this study, we identified a novel extracellular matrix protein Vwde in odontogenic epithelial cells, which plays an important role in tooth development, and revealed that it plays an important role in enamel formation in teeth. We also identified novel roles for FGF2 and Irxs in dental mesenchymal cells in tooth.

研究分野：小児歯科学

キーワード：器官形成 歯の発生 細胞-細胞間シグナル 細胞-細胞外シグナル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

われわれ人間は、多細胞生物であり、われわれの体は個々の細胞の集合体で構成されている。これらの個々の細胞は、自身を取り囲む周囲の細胞や組織液や細胞外マトリックスなどの細胞外基質分子、さらには、温度や気体条件、機械的圧力などの細胞外環境と相互作用することによって、厳密、かつ繊細な条件で細胞の分化運命が決定され、それぞれが特定の専門化した役割を果たす細胞となり、それらの集合体によって最終的に精巧な器官が構築される。すなわち、細胞を取り巻く細胞外環境は、器官形成における重要な制御因子となる。

これまでにわれわれは細胞外環境のうち、細胞外圧に着目をした研究を行ってきた<sup>1</sup>。細胞には外力を感知する能力があり、それを細胞内の生物学的な信号に変換するメカニズムを備えており、これをメカノトランスダクションという。このメカノトランスダクションを応用することで、細胞に圧を加えることなく、細胞に圧を負荷した状況と同等の刺激を与えることが可能となると考える。このメカニズムを応用することで、細胞は自身や周囲の細胞の分化に必要な量とタイミングで内因性の成長因子やサイトカインを産生し、適切な細胞応答を引き出すことが可能となると考え、本法の応用により従来にはない新たな疾患治療戦略の開発が期待できると考える。

### 2. 研究の目的

(1) これまで静水圧に応答し骨および歯の間葉系幹細胞の分化運命に関わる分子として、メカノセンサーチャネル Piezo1 を同定した<sup>1,2)</sup>。Piezo1 の機能阻害は、静水圧負荷によるメダカの鱗骨の形成阻害も引き起こしたことから、骨芽細胞におけるメカノトランスダクションを担う必要不可欠な分子であることを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。そこで、Piezo1 を介したメカノトランスダクションに C 末の R-Ras 結合ドメインが重要ではないかと考え、その機能を探索することとした。さらに、Piezo1 は象牙芽細胞の分化過程においても WNT シグナルを活性化し、そのうち、Piezo1 は RUNX2 を介して WNTs の発現を誘導していることが示唆された<sup>2)</sup>。そこで、この分子メカニズムを明らかにすることとした。

(2) 細胞外環境因子は複合的に作用を示すことから<sup>3)</sup>、これらの最適な組み合わせをみつけることで、歯の発生段階において、細胞自身が自身の細胞外環境とモルフォゲンの存在の下で機械刺激の感受がどのような役割を担い、自身や周囲の細胞運命を決定に寄与しているのかの解明に取り組むことが 1 つの大きな目的である。そこで、歯科ですでに臨床応用がされている FGF2 の歯髄幹細胞における細胞外環境へ及ぼす影響を解析することとした。

(3) バイオインフォマティクスによる歯の発生過程に機能する新規分子の同定を進める。歯の発生過程に機能する遺伝子についてはその詳細が不明な点が多い。そこで、本研究においては、von Willebrand factor D and EGF domains (Vwde) および Iroquois Homeobox 遺伝子を中心にその発現と役割の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) Piezo1 のメカノトランスダクションのメカニズムを明らかにするために、pcDNA-DEST40 に Piezo1 full length および C 末の R-Ras 結合領域を欠失させた truncated form の発現ベクターを作成し、これまで解析を行ってきたヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞に遺伝子導入をし、それぞれの発現安定細胞株を作成する。これらの細胞株を用いて、加圧培養装置による細胞培養下、または Piezo1 活性化低分子化合物 Yoda1 を用いて、細胞内のカルシウムシグナルについては、Fura-4AM を用いたカルシウムイメージング法および細胞内シグナル分子のリン酸化を Western blotting 法を用いて解析を行う。また、Piezo1 が RUNX2 を介して WNT16 の発現を直接的に誘導しているかどうかを明らかにするために、クロマチン免疫沈降法にて解析を行う。

(2) ヒト脱落乳歯由来歯髄細胞株 SDP11 細胞に対して、PrimerArray® (human cytokine-cytokine receptor interactions) を用いて qPCR 法にて、FGF2 を投与によって発現の変化するサイトカインのスクリーニングを行い、その発現に関与するシグナル伝達経路を各種シグナル伝達経路に関わる阻害剤で処理をすることによって、Western Blotting 法にて解析を行う。

(3) Vwde の歯の発生過程における発現時期と発現細胞の同定を RT-PCR 法、Northern blot 法、In situ hybridization 法、Immunostaining 法を用いて解析をする。また、歯原性上皮細胞株 M3H1 細胞を用いて発現および機能解析を行う。さらに、CRISPR-CAS9 法を用いて KO マウスの作成を行い、歯の表現系解析を行う。Iroquois Homeobox (Irx) については、発現している Irx family の歯胚における発現を RT-PCR 法、Immunostaining 法にて解析をする。また、歯原性間葉細胞 mDP 細胞を用いて、Irx の遺伝子の発現および増殖、石灰化に及ぼす影響を siRNA 法を用いて解析をする。さらに、target 分子の探索を qPCR 法を用いて解析をする。

### 4. 研究成果

(1) Piezo1 : Piezo1 full length および C 末の R-Ras 結合領域を欠失させた truncated form の発現安定細胞の作成を UE7T-13 細胞で試みたが、同細胞で発現安定細胞株を作成することが

できなかった。そこで、細胞株をヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney cells 293 : HEK293) 細胞を用いることとし、それぞれの発現安定細胞株の作成を行なった。これらの細胞を用いて細胞内シグナルについて検討を行い、現在得られた知見を学術雑誌に投稿中である。また、Piezo1 と RUNX2、WNT 分子について、クロマチン免疫沈降法にてその直接的な役割について解析を行い、現在得られた知見を学術雑誌に投稿準備中である。

(2) ヒト脱落乳歯由来歯髄細胞株 SDP11 細胞に 20ng/ml の FGF2 を投与し、48 時間処理後、サイトカインの包括的遺伝子発現解析を qPCR 法を用いて行なった。その結果、FGF2 は歯髄細胞株 SDP11 細胞において、ケモカイン C-C モチーフリガンド 11 (CCL11) の発現を時間および用量依存的に有意に阻害することを見出した。この抑制は、AZD4547 FGF 受容体 (FGFR) 阻害剤で処理すると減少し、FGF2 が SDP11 細胞における CCL11 の発現を負に制御することを示した。さらに、FGF2 は SDP11 細胞において、p38 MAPK, ERK1/2、そして JNK のリン酸化を誘導したが、興味深いことに、JNK 阻害剤 SP600125 による処理のみが、FGF2 による CCL11 の抑制を阻害することを明らかにした。これらの結果は、ヒト脱落乳歯由来歯髄細胞における FGF2 と CCL11 の関連性を示した。

(3) Vwde は歯にきわめて特異的に発現していることを PCR 法で示した。In situ ハイブリダイゼーション法および免疫組織学的解析により Vwde は内エナメル上皮細胞に発現することを明らかにした。また、Vwde は、歯原性上皮細胞株 M3H1 細胞のエナメル芽細胞への分化過程で誘導され、Vwde を遺伝子導入した M3H1 細胞は細胞増殖を抑制される一方で、エナメル芽細胞への分化が促進された。さらに、Vwde は細胞間接合タンパク質である N-カドヘリン (Ncad) の発現を強く誘導することを見出した。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いて、Vwde ノックアウトマウスを作製したところ、Vwde 欠損マウスのエナメル質は野生型と比較し、石灰化度が低く、エナメル質に破折を生じていることを明らかにし、Vwde がエナメル質の成熟に関与している可能性を示した(図1)。また、Iroquois Homeobox (Irx) family の歯における発現を RT-PCR 法および Immunostaining 法にて解析をしたところ、Irx3 は、歯原性上皮細胞および間葉細胞の両方に発現することを見出した。そのうち歯原性間葉細胞における Irx3 の機能解析を行なった。歯原性間葉細胞 mDP 細胞に発現する内因性の Irx3 を siRNA 法でノックダウンすると、その石灰化が阻害され、さらに、qPCR 法による解析で Wnt5a が特異的に抑制されることを明らかにし、Irx3 が歯原性間葉細胞の分化に Wnt5a を介して関与している可能性を示した。



図1 Vwde 欠損マウスの臼歯にみられる破折線

#### <引用文献>

- 1) Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells.; Sugimoto A, Miyazaki A, Kawarabayashi K, Shono M, Akazawa Y, Hasegawa T, Ueda-Yamaguchi K, Kitamura T, Yoshizaki K, Fukumoto S, **Iwamoto T.**  
*Sci Rep.* 2017 Dec 18;7(1):17696.
- 2) Coordination of WNT signaling and ciliogenesis during odontogenesis by piezo type mechanosensitive ion channel component 1.; Miyazaki A, Sugimoto A, Yoshizaki K, Kawarabayashi K, Iwata K, Kurogoushi R, Kitamura T, Otsuka K, Hasegawa T, Akazawa Y, Fukumoto S, Ishimaru N, **Iwamoto T.**  
*Sci Rep.* 2019 Oct 14;9(1):14762.
- 3) Combination of ions promotes cell migration via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in human gingival fibroblasts.; Yamaguchi-Ueda K, Akazawa Y, Kawarabayashi K, Sugimoto A, Nakagawa H, Miyazaki A, Kurogoushi R, Iwata K, Kitamura T, Yamada A, Hasegawa T, Fukumoto S, **Iwamoto T.**  
*Mol Med Rep.* 2019 Jun;19(6):5039-5045.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kurogoushi Rika, Hasegawa Tomokazu, Akazawa Yuki, Iwata Kokoro, Sugimoto Asuna, Yamaguchi-ueda Kimiko, Miyazaki Aya, Narwidina Anrizandy, Kawarabayashi Keita, Kitamura Takamasa, Nakagawa Hiroshi, Iwasaki Tomonori, Iwamoto Tsutomu	4. 巻 22
2. 論文標題 Fibroblast growth factor 2 suppresses the expression of C-C motif chemokine 11 through the c-Jun N-terminal kinase pathway in human dental pulp-derived mesenchymal stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2021.10791	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 Iwata Kokoro, Kawarabayashi Keita, Yoshizaki Keigo, Tian Tian, Saito Kan, Sugimoto Asuna, Kurogoushi Rika, Yamada Aya, Yamamoto Akihito, Kudo Yasuei, Ishimaru Naozumi, Fukumoto Satoshi, Iwamoto Tsutomu	4. 巻 237
2. 論文標題 von Willebrand factor D and EGF domains regulate ameloblast differentiation and enamel formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 1964 ~ 1979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30667	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 Narwidina Anrizandy, Iwamoto Tsutomu (他17名、last author)	4. 巻 650
2. 論文標題 Iroquois homeobox 3 regulates odontoblast proliferation and differentiation mediated by Wnt5a expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.02.004	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 Iwata Kokoro, Kawarabayashi Keita, Yoshizaki Keigo, Sugimoto Asuna, Fukumoto Satoshi, Iwamoto Tsutomu
2. 発表標題 Identification and characterization of von Willebrand factor D and EGF domains as a novel extracellular matrix protein in teeth
3. 学会等名 第69回国際歯科研究学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩田こころ, 河原林啓太, 吉崎恵悟, 杉本明日菜, 福本 敏, 岩本 勉
2. 発表標題 歯原性上皮におけるカドヘリン発現を制御する新規細胞外マトリックスタンパクvon Willebrand factor D and EGF domains
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩田こころ, 杉本明日菜, 岩本 勉
2. 発表標題 歯胚特異的に発現するvon Willebrand factor D and EGF domainsの歯の発生過程における発現解析
3. 学会等名 日本小児歯科学会第36回関東地方会大会
4. 発表年 2021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	山本 朗仁  (Yamamoto Akihito)  (50244083)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授   (16101)	

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