

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20612

研究課題名（和文）器官再生を目指した細胞リソースとして的人為的上皮細胞誘導技術の開発

研究課題名（英文）Development of artificial epithelial cell induction technology as a cell resource for organ regeneration

研究代表者

福本 敏（Fukumoto, Satoshi）

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：30264253

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：歯や唾液腺、肺や腎臓などの器官を再生するためには、これらを構成する上皮（内皮）細胞を人工的に誘導するシステムが必要である。本研究では歯胚上皮の特徴を明らかにし、その特徴的な遺伝子の発現を制御することで、目的の上皮細胞を誘導する技術の開発を試みた。その結果、歯胚を構成する4種類の細胞（内エナメル上皮、中間層細胞、星状網細胞、外エナメル上皮）に特徴的な遺伝子の同定に成功し、歯の形や萌出時期の決定に関わる分子を見つけ出した。またエナメル質の形成に関わる内エナメル上皮に関しては、各分化段階に関わる分子を同定し、その発現制御により歯由来細胞を毛の細胞や皮膚の上皮細胞に転換できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の再生技術の開発は、同様の発生過程を示す肺や腎臓などの他の臓器形成にも役立つ。この技術を開発する中で、特に歯においては上皮細胞は歯が生えたと完全に失われてしまうこと、またその細胞を得るためには胎児組織を利用しなければならず、このような倫理的問題を回避しながら上皮細胞を如何にして得ることができるかは大きな課題であった。そのために歯の上皮細胞の特徴を明らかにし、その分化過程を理解し細胞の運命転換を行うことは、再生医療技術の進展に大きく役立つ。また歯をモデルとして、その発生原理をより詳細に理解し、全身の全てに器官再生に応用可能な本研究は極めて社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to regenerate organs such as teeth, salivary glands, lungs, and kidneys, we need a system to artificially induce the epithelial (endothelial) cells that make up these organs. In this study, we clarified the characteristics of the tooth germ epithelium and attempted to develop a technology to induce the desired epithelial cells by controlling the expression of its characteristic genes. As a result, we succeeded in identifying genes characteristic of the four types of cells that make up the tooth germ (inner enamel epithelium, middle layer cells, stellate reticular cells, and outer enamel epithelium), which are used to determine tooth shape and eruption. We found the molecules involved. Regarding the inner enamel epithelium, which is involved in the formation of enamel, we identified molecules involved in each differentiation stage, and by controlling their expression, we were able to transform tooth-derived cells into hair cells and skin epithelial cells.

研究分野：小児歯科

キーワード：エナメル芽細胞 歯原性上皮 再生医療

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで口腔組織においては歯や唾液腺組織に関して、器官原器法よばれる手法を用いることで人為的な器官形成が可能となり、これら技術の応用により毛の再生も可能となった。しかしその細胞ソースは、胎児組織を利用したものや、すでに形成された器官に存在する微量な幹細胞を抽出する方法であり、十分な細胞ソースの確保が困難な状況である。特に歯においては器官再生に必要な上皮細胞は、歯の萌出により失われることから、成人において上皮細胞の確保は不可能であると言わざるをえない。この問題を解決するため我々は、iPS細胞から歯の構成に必要なエナメル芽細胞、象牙芽細胞の人工誘導を試み、それに成功した (Arakaki M et al. *J Biol Chem* 2012, Ostu K et al. *Stem Cell Dev* 2012)。さらに iPS 細胞から誘導したこれら細胞を用い、歯の形成にも成功した (Kim EL et al. *Dev Dyn* 2019)。しかしながら胎児組織を利用しない方法を用いることで倫理的問題は回避されても、iPS 細胞を用いることで細胞調整に関連した高コストが大きな問題として残る。例えば iPS 細胞を作成するために遺伝子導入を行った結果、細胞の染色体に導入遺伝子が挿入され、その結果癌化など影響の有無を検討する必要があり、このような確認には全ゲノム解析や細胞の表現系解析など、高コストとなる要因が残る。一方、間葉系細胞に関しては、歯髄中に間葉系幹細胞が存在し、これらは成人においても維持されていることから、歯の再生を考えた場合、上皮の細胞ソースを如何に確保し、より低コストで実施するかが最も重要課題となる。したがって人工的に上皮系細胞を誘導する技術の開発は、器官再生を目指した再生医療技術の開発に大きく貢献できるものと考えられる。

2. 研究の目的

まず目的の上皮細胞を作出するためには、上皮陥入組織において器官形成の運命決定がどのように行われているかを解明する必要がある。上皮組織として歯、唾液腺、毛、内皮系組織として肺、腎臓をターゲットとし、それぞれの器官決定に関与する因子の同定を、cDNA マイクロアレイ、RNA シークエンス (RNAseq)、single cell RNAseq、さらには CAGE (Cap analysis of gene expression) 法を用いて試みた。その結果、歯の上皮細胞が毛への分化を抑制する因子として、Sox21 や Med1 などの転写因子や、その転写制御因子の同定に成功した (Yoshizaki K et al. *PLoS ONE* 2014, Yoshizaki K et al. *J Biol Chem* 2017)。これらの因子を欠失させることで、歯の上皮細胞から毛を誘導することに成功した。さらに、歯胚上皮細胞から毛のみならず、唾液腺上皮の誘導にも成功しており、歯原性上皮細胞が確保できれば、少なくとも歯のみならず毛や唾液腺の再生が可能になることが示唆された。そこで本研究では、すべての器官発生に必要な歯原性上皮細胞の人為的誘導技術の開発を目指す。

器官形成の鍵となる歯原性上皮細胞を、人工的に誘導するシステムを構築するために、我々が保有する遺伝子発現等データベース (上記の cDNA マイクロアレイ、RNAseq、single cell RNAseq、CAGE 法データベース) から、特定の増殖因子が皮膚上皮細胞から歯原性上皮細胞を誘導することを見出した。しかしながら単一の誘導因子のみでは、すべての皮膚上皮細胞を歯原性上皮細胞に誘導できておらず、その効率も含めた改善が必要と考えられる。さらに皮膚以外の採取が比較的容易な他の上皮系細胞 (口腔粘膜上皮等) から歯原性上皮細胞を誘導できるかどうかの検討も必要である。そこで、1) 歯原性上皮細胞を誘導可能な上皮細胞の探索、2) 人為誘導歯原性上皮細胞の器官形成能の評価、3) 効率的な歯原性上皮細胞誘導法の成熟化、を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

マウス歯胚由来の歯原性上皮細胞の特性を理解するために、細胞に発現する遺伝子の状況を single cell RNAseq、CAGE 法データベースを用いて検討を行った。歯原性上皮細胞は、エナメル質形成に関わる内エナメル上皮、未だ全く機能がわかっていない中間層細胞、星状網細胞、外エナメル上皮に分類される。これら 4 種類の歯原性上皮細胞に発現する特徴的な遺伝子に関するスクリーニングを行った。

次にデータベース解析によって同定された遺伝子が、歯胚の発生過程においてどのような発現パターン (時空間的発現状況) を示すか、免疫組織学的に検討した。一部の遺伝子に関しては、in situ hybridization を用いて検討した。

single cell RNAseq、CAGE 法データベースでの発現パターンと、免疫組織学的に検討した発現パターンが一致した分子に関して、歯原性上皮細胞細胞株 SF2 やマウス歯胚器官培養に過剰発現 (発現ベクターの遺伝子導入)、発現抑制 (siRNA 等) を行い、その分子の機能解析を行っ

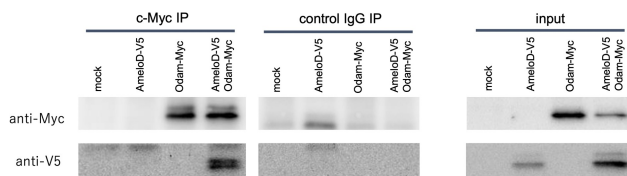
た。また歯胚での機能解析のみならず、他の上皮系細胞（毛や皮膚）との差を検討することで、より歯胚に特徴的な分子の機能や役割解明を目指した。

さらに遺伝子発現データベースをアップデートするために、single cell RNAseq、CAGE 法につきて最新の技術を用いて再度データベースを作成し、再解析を行った。

4. 研究成果

1) 内エナメル上皮について

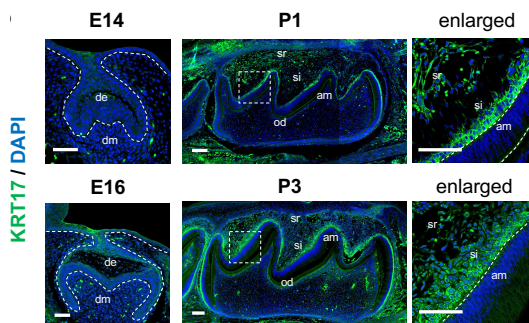
内エナメル上皮は歯胚上皮幹細胞から分化する。この分化過程において bHLH 型転写因子の一つ AmeloD が重要な役割を演じていることを見出した。AmeloD を欠損したマウスは内エナメル上皮からエナメル芽細胞の分化が抑制され、エナメル質形成不全を示した。AmeloD は上皮細胞における E カドヘリンの発現制御に関わり、上皮幹細胞から内エナメル上皮への細胞転換に関与しており、その結果エナメル質の形成に異常を示すことが分かった。そこで、AmeloD と細胞内で結合する分子のスクリーニングを酵母の two hybrid 法を用いて検討した。数多くの結合分子が同定されたが、その中でも ODAM 分子が AmeloD と直接結合していることを明らかにした（下図）。ODAM はエナメル基質の一つとして考えられていたが、細胞内で特徴的な局在を示し、細胞内のシグナル分子として機能していることが示唆された。しかしながら、CAGE 法による解析では AmeloD の歯胚での発現が確認できたが、single cell RNAseq においてはその発現が確認できなかった。このことから、AmeloD は細胞内で少量発現し、わずかな発現の変化により細胞の運命決定を行っている可能性が示唆された、



2) 中間層細胞、星状網細胞、外エナメル上皮について

single cell RNAseq 解析により、中間層細胞及び星状網細胞にはサイトケラチン 17 (Krt17) が特徴的に発現していることを確認した。また星状網細胞及び外エナメル上皮には Krt15 が発現していた。これまで中間層細胞、星状網細胞、外エナメル上皮に明確な細胞マーカーは、唯一 Notch1 が中間層細胞のマーカーとして同定されていたが、今回の結果により、Krt17 単独陽性細胞が中間層細胞、Krt15 及び Krt17 陽性細胞が星状網細胞、Krt15 単独陽性細胞が外エナメル上皮であることが判明し、内エナメル上皮には Krt15 及び Krt17 の両方が発現していないことが分かった（下図）。

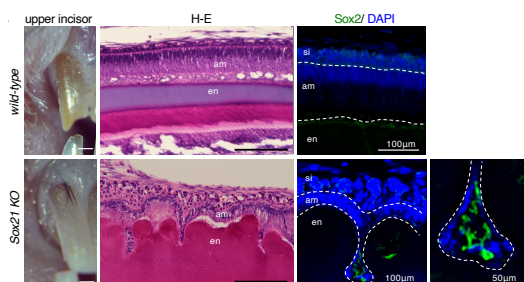
Krt15 及び Krt17 の、これら細胞での機能を明らかにするために、Krt17 に関しては SF2 細胞に siRNA にて Krt17 の発現抑制を行った結果、中間層マーカーである Notch1 の発現低下が認められた。つまり Krt17 は中間層細胞の分化に関わっていることが明らかとなった。OMIM によるヒト疾患との関連性を調査した結果、Krt17 の遺伝子異常は先天歯を生じることが分かった。つまり正常な中間層や星状網細胞の分化は、歯の萌出時期の決定に重要であることが示唆された。



次に Krt17 の機能を明らかにするために、マウス歯胚器官培養系に siRNA を用いて Krt17 の発現抑制を行った。その結果、Krt17 抑制歯胚においては、外エナメル上皮の細胞増殖が亢進し、歯胚の形態異常を示すことを見出した。同様に結果は、SF2 細胞を用いた実験においても確認された。これらの結果から、Krt17 は外エナメル上皮の細胞増殖を抑制し、歯胚の概形の決定に重要な役割を演じていることが分かった。

3) 歯原性上皮細胞から他の上皮系細胞への転換について

エナメル芽細胞に特徴的に発現する Sox21 及び S100a6 の機能解析を行った。Sox21 欠損マウスは、エナメル質形成不全を示すと共に、歯胚から毛を形成することが分かった（右図）。Sox21 は、エナメル芽細胞の分化に関わりエナメル基質の一つであるアメリプラスチンの発現制御に関与していたが、一方で歯胚上皮が毛の上皮細胞に分化することを抑制して



いることが分かった。我々の以前の研究で、Med1 分子の欠損マウスにおいて同様に歯から毛を誘導することを見出したが、Med1 に関しては中間層細胞から毛が誘導されるのに対し、Sox21 はエナメル芽細胞から毛が誘導されるという特徴的な表現系を示した。

次に S100a6 に関しては、SF2 細胞に siRNA を用いて S100a6 の発現抑制を行うことでその表現系を RNAseq にて解析した。その結果、S100a6 抑制細胞は、歯原性上皮細胞の特徴が失われ、皮膚の上皮細胞に類似した遺伝子発現を示した。

このことから、Sox21 及び S100a6 は、歯原性上皮細胞の適切な分化の維持に極めて常用な分子であるとともに、これらの遺伝子発現制御により、歯胚上皮を毛の上皮あるいは皮膚の上皮細胞に転換することが可能となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 9件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Yamada A, Yoshizaki K, Saito K, Ishikawa M, Chiba Y, Hoshikawa S, Chiba M, Hino R, Maruya Y, Sato H, Masuda K, Yamaza H, Nakamura T, Iwamoto T, Fukumoto S.	4. 巻 64(4)
2. 論文標題 GSK3beta inhibitor-induced dental mesenchymal stem cells regulate ameloblast differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Oral Biosci.	6. 最初と最後の頁 400-409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.10.002.	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 Fu Y, Miyazaki K, Chiba Y, Funada K, Yuta T, Tian T, Mizuta K, Kawahara J, Zhang L, Martin D, Iwamoto T, Takahashi I, Fukumoto S, Yoshizaki K.	4. 巻 299(5)
2. 論文標題 Identification of GPI-anchored protein LYPD1 as an essential factor for odontoblast differentiation in tooth development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 104638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.104638.	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 該当する
1. 著者名 Yuta T, Tian T, Chiba Y, Miyazaki K, Funada K, Mizuta K, Fu Y, Kawahara J, Iwamoto T, Takahashi I, Fukumoto S, Yoshizaki K.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Development of a novel ex vivo organ culture system to improve preservation methods of regenerative tissues	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29629-2.	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 Al Thamin Shahad, Chiba Yuta, Yoshizaki Keigo, Tian Tian, Jia LingLing, Wang Xin, Saito Kan, Li Jiyao, Yamada Aya, Fukumoto Satoshi	4. 巻 236
2. 論文標題 Transcriptional regulation of the basic?helix loop helix factor <i>AmeloD</i> during tooth development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 7533 ~ 7543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30389	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 該当する

1. 著者名 Yamada Aya, Yoshizaki Keigo, Ishikawa Masaki, Saito Kan, Chiba Yuta, Fukumoto Emiko, Hino Ryoko, Hoshikawa Seira, Chiba Mitsuki, Nakamura Takashi, Iwamoto Tsutomu, Fukumoto Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Connexin 43-Mediated Gap Junction Communication Regulates Ameloblast Differentiation via ERK1/2 Phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 748574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.748574	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 Jia LingLing, Chiba Yuta, Saito Kan, Yoshizaki Keigo, Tian Tian, Han Xu, Mizuta Kanji, Chiba Mitsuki, Wang Xin, Al Thamin Shahad, Yamada Aya, Fukumoto Satoshi	4. 巻 237
2. 論文標題 The tooth specific basic helix loop helix factor AmeloD promotes differentiation of ameloblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 1597 ~ 1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30639	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 該当する

1. 著者名 Jia LingLing, Chiba Yuta, Saito Kan, Yoshizaki Keigo, Tian Tian, Han Xu, Mizuta Kanji, Chiba Mitsuki, Wang Xin, Al Thamin Shahad, Yamada Aya, Fukumoto Satoshi	4. 巻 237
2. 論文標題 The tooth specific basic helix loop helix factor AmeloD promotes differentiation of ameloblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 1597 ~ 1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30639	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 該当する

1. 著者名 Shimizu Kouhei, Gi Min, Suzuki Shugo, North Brian J., Watahiki Asami, Fukumoto Satoshi, Asara John M., Tokunaga Fuminori, Wei Wenyi, Inuzuka Hiroyuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109988 ~ 109988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109988	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 該当する

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 Masuda K, Han X, Kato H, Sato H, Zhang Y, Sun X, Hirofujii Y, Yamaza H, Yamada A, Fukumoto S.	4. 巻 22
2. 論文標題 Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Modeling Genetic Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052269.	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 Yoshizaki K, Fukumoto S, Bikle DD, Oda Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Transcriptional Regulation of Dental Epithelial Cell Fate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 8952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21238952.	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 該当する

1. 著者名 Saito K, Michon F, Yamada A, Inuzuka H, Yamaguchi S, Fukumoto E, Yoshizaki K, Nakamura T, Arakaki M, Chiba Y, Ishikawa M, Okano H, Thesleff I, Fukumoto S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Sox21 Regulates Anapc10 Expression and Determines the Fate of Ectodermal Organ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101329.	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 該当する

1. 著者名 Chiba Y, Saito K, Martin D, Boger ET, Rhodes C, Yoshizaki K, Nakamura T, Yamada A, Morell RJ, Yamada Y, Fukumoto S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Single-Cell RNA-Sequencing From Mouse Incisor Reveals Dental Epithelial Cell-Type Specific Genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00841.	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 該当する

1. 著者名 Han X, Yoshizaki K, Tian T, Miyazaki K, Takahashi I, Fukumoto S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Mouse Embryonic Tooth Germ Dissection and Ex vivo Culture Protocol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio Protoc	6. 最初と最後の頁 e3515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3515.	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 該当する

1. 著者名 Otake S, Saito K, Chiba Y, Yamada A, Fukumoto S.	4. 巻 38
2. 論文標題 S100a6 knockdown promotes the differentiation of dental epithelial cells toward the epidermal lineage instead of the odontogenic lineage	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FASEB J .	6. 最初と最後の頁 e23608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202302412RR.	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
研究分担者	吉崎 恵悟 (Yoshizaki Keigo) (10507982)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	犬塚 博之 (Inuzuka Hiroyuki) (20335863)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	自見 英治郎 (Jimi Eijiro) (40276598)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	阪井 丘芳 (Sakai Takayoshi) (90379082)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	山田 亜矢 (Yamada Aya) (40295085)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	

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			
米国	米国国立衛生研究所	ハーバード大学		
中国	四川大学	北京大学		
フィンランド	ヘルシンキ大学			