

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792054

研究課題名 (和文) 細胞間コミュニケーションを利用した口腔組織構築法の開発

研究課題名 (英文) Establishment of the method for oral tissue construction using gap junctional communication.

研究代表者

山田 亜矢 (AYA YAMADA)

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 (和文)：我々は、細胞間結合因子 (Gja1分子) が、エナメル質形成に重要なアメロブラスチンの発現制御に関わる新規分子であり、アメロブラスチンの転写を活性化する機序を明らかにした。

本研究結果は、細胞間結合が一般的な細胞内シグナル伝達を厳密に制御していることを明らかにした報告であり、歯の発生研究のみならず、他の臓器形成における細胞間結合の役割に関する重要な知見といえる。

研究成果の概要 (英文)：Gja1 regulates ameloblastin expression in dental epithelium. We have reported that ERK1/2 phosphorylation induced by TGF- β 1 regulates expression of ameloblastin via gap junctional intercellular communication.

The results of this study indicated that gap junctional communication regulates intracellular signaling. And these regulatory mechanisms are important to understand the role of gap junctional communication not only in tooth morphogenesis but also in another organs morphogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、Gja1

1. 研究開始当初の背景

歯の人工的な再生や組織構築は、歯胚の再構成や歯髄幹細胞の応用など、様々な手法が試みられており、形態学的には不十分ながらも、エナメル質、象牙質を有する硬組織形成が可能となってきた。しかしながら、適切な咬頭や歯冠の大きさを維持した歯の形成は未だ不可能であり、特に十分なエナメル質の形

成には至っていない。エナメル質に関しては、骨や象牙質と異なり、病的な欠損は二度と自己修復が行われることはなく、現状では人工的な修復治療に頼らざるを得ない。したがってエナメル質を中心とした組織再生は、特に小児歯科の領域においては極めて重要な課題といえる。

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、細胞極性を有する縦長細胞への分化、そして2) エナメル基質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。現在まで我々の研究グループでは、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あ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、これら基質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。我々の考案した培養手法の確立により、飛躍的にエナメル芽細胞の分化解析が進むこととなった。しかしながら、in vitro でのエナメル基質の発現誘導に関しては、in vivo のそれと比較して低く、人工エナメルの形成には不十分であると考えられた。そこで、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、我々は歯胚に発現する遺伝子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）を行い（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）。本分子は、眼歯指異形成症（Occludodigital 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を明らかにした（山田他、第46回日本小児歯科学会2008年：大会優秀発表賞受賞）。これらの研究結果から、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の因子として細胞間結合分子が重要であることが明らかとなった。

さらに、Gjal 分子欠損マウスの解析により、エナメル質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世界で初めて発見した。以上の結果から、ギャップ結合分子の存在や制御が、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。

2. 研究の目的

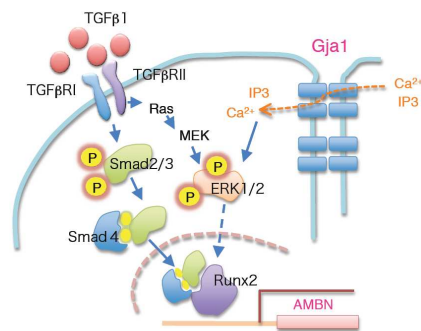
本研究では、組織特異的に発現する細胞間結合分子の機能を制御することで、歯胚組織の分化制御機構の解明と、これら知見を応用した人工エナメル質の形成法の開発を行うことを目的とした。また歯胚は、組織形態形成と硬組織形成の両者を解明できるモデルであることから、歯と同一の発生パターンを示す口腔内の唾液腺の再生や、顎顔面の硬組織の形成機構、組織構築法の解明へと発展させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Gjal 分子によるアメロブラスチン発現制御の解明

Gjal 分子は、TGF- β 1 刺激によるアメロブラスチン発現誘導について、Smad 経路のシグナルには全く影響を及ぼさず、逆に MAP Kinase ファミリーの一つである ERK1/2 のリン酸化を制御していることを明らかにした。

しかしながら、ERK1/2 のリン酸化がどのようにアメロブラスチン発現に関わっているか詳細は明らかでない。そこで、これら低分



子の ERK1/2 リン酸化制御機構とアメロブラスチン発現誘導に関して、細胞内カルシウム阻害剤や、促進剤、さらには小胞体膜に存在する IP3 受容体の阻害剤を用いて、これら分子のエナメル芽細胞分化に及ぼす影響の検討を行った。

(2) 唾液腺における Gjal 機能の解明

ヒト眼歯指異形成症の主症状である、眼球、歯の形成異常、四肢の癒合に関しては、Gjal 欠損マウスを用いた解析で、その一部を解明することが可能であると考えられた。実際、Gjal 欠損マウスでは、歯胚の形成異常のみならず、頭部顔面の形態異常と唾液腺の分岐形成の抑制を確認した。このことから、Gjal は唾液腺および頭部顔面の骨および軟骨の形成に重要であることが明らかとなった。そこで、Gjal 分子の頭部発生過程における組織内発現を明らかにするとともに、眼歯

指異形成症と同一の遺伝子変異を有する Gjal 発現ベクターを、唾液腺培養細胞に遺伝子導入を行い、これら細胞の分化に及ぼす影響について検討を行った。また、唾液腺の器官培養系を用いて、ギャップ結合阻害剤である Oleamide 等を用いて、器官構築におけるギャップ結合分子の役割について解明した。

4. 研究成果

我々は、これまで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の因子として細胞間結合因子が重要であり、特にGjal分子がエナメル質形成に重要なアメロブラスチンの発現制御に関わる新規分子であることを明らかにした。さらに、TGF- β 1刺激によってリン酸化された ERK1/2とSmad2/3が核内に移行し、Runx2のセリンをリン酸化し、アメロブラスチンの転写を活性化する機序を明らかにした。

また、Gjal分子は隣接する細胞と細胞間結合を形成し、Ca²⁺やIP3などの低分子の輸送に関わる。そこでこれら低分子によるERK1/2のリン酸化制御機構とアメロブラスチン発現誘導に関して、細胞内カルシウム阻害剤や促進剤、さらには小胞体膜に存在するIP3受容体の阻害剤を用いて、これら分子のエナメル芽細胞分化に及ぼす影響の検討を行った。その結果、細胞内カルシウム量はTGF- β 1誘導性のERK1/2のリン酸化に重要であり、小胞体膜にあるIP3受容体に細胞間結合を通過してくるIP3が結合することで、小胞体からCa²⁺が放出され、細胞内Ca²⁺濃度が上昇する。これによって、ERK1/2のリン酸化が誘導され、逆に小胞体からのCa²⁺放出が抑制されると、ERK1/2のリン酸化が抑制されることがわかった。また、小胞体膜にもGjal分子が存在し、小胞体からのCa²⁺の放出にも関与していることが示唆された。

本研究結果は、細胞間結合が一般的な細胞内シグナル伝達 (ERK シグナリング) を厳密に制御していることを明らかにした報告であり、歯の発生研究のみならず、他の臓器形成における細胞間結合の役割に関する重要な知見といえる。

また、マウス顎下腺の器官培養を用いた実験で、培養液中にギャップ結合阻害剤を添加すると、唾液腺の分岐形成が著しく阻害されるが、導管の形成には大きな変化が認められなかったことがわかった。さらに、従来より唾液腺の分岐形成促進効果を示すとされているPDGF-BBをギャップ結合阻害剤添加群に添加すると、阻害されていた分岐形成が部分的にレスキューされることがわかった。また、

PDGF-BBはFGFの発現を促進するが、ギャップ結合阻害剤添加群にFGFを添加した結果、阻害されていた分岐形成が部分的にレスキューされることがわかった。

これらの結果から、唾液腺の形成においてもギャップ結合分子が必須であることが示唆された。

適切な細胞間結合の維持は、唾液腺の形成や機能維持に重要であり、ギャップ結合の機能調節により、唾液腺の分岐形成を調節できる可能性が考えられ、口腔乾燥症の治療法開発の有用な知見となりうる。

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3件)

1. Iwamoto T., Yamada A., Arakaki M., Sugawara Y., Ono M., Futagi M., Yoshizaki K., Fukumoto E., Nakamura T., Fukumoto S. Expressions and Functions of Neurotrophic Factors in Tooth Development. *Journal of Oral Biosciences* 査読有、53(1), 2011, 13-21
2. 山田亜矢, 岩本勉, 中村卓史, 福本敏 エナメル芽細胞の分化制御機構 *小児歯科学雑誌* 査読有、48 巻 3 号、2010, 374-380
3. Wu Nan, Iwamoto T., Sugawara Y., Futagi M., Yoshizaki K., Yamamoto S., Yamada A., Nakamura T., Nonaka K., Fukumoto S. PDGFs regulate tooth germ proliferation and ameloblast differentiation. *Archives of Oral Biology* 査読有、55(6), 2010, 426-434

[学会発表] (計6件)

1. 岩本勉, 中村卓史, 吉崎恵悟, 山田亜矢, 福本敏 象牙芽細胞分化におけるギャップ結合分子の発現および機能解析 第52回歯科基礎医学会学術大会、2010年9月22日、船堀
2. Yamada A., Nakamura T., Iwamoto T., Fukumoto S. GSK-3 β inhibitor promotes reprogramming of dental pulp cell. The 88th General Session & Exhibition of the IADR, 16 July 2010, Barcelona, Spain
3. Suzuki H., Yamada A., Iwamoto T., Nakamura T., Fukumoto S.

The role of Gjal on salivary gland branching morphogenesis.

The 88th General Session & Exhibition of the IADR, 16 July 2010, Barcelona, Spain

4. 鈴木宏治、山田亜矢、岩本勉、中村卓史、福本敏
唾液腺分岐におけるギャップ結合の役割解明と再生への応用
第48回日本小児歯科学会大会、2010年5月19日、名古屋市（優秀発表賞受賞）
5. Iwamoto T., Nakamura T., Yamada A., Yamada.Y., Fukumoto S.
Pannexin 3, a gap junction protein, regulates odontoblasts differentiation.
Experimental Biology2010、26 April 2010、Anaheim, U.S.A
6. Yamada A., Iwamoto T., Nakamura T., Fukumoto S.
Regulation of ameloblastin expression via gap junctional communication.
Experimental Biology2010、26 April 2010、Anaheim, U.S.A

[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0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：