

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09813

研究課題名（和文）エピプロフィンによる上皮間葉転換制御機構を応用したがん治療と器官原器複製術の開発

研究課題名（英文）Epiprofin regulates EMT and MET during organogenesis

研究代表者

中村 卓史（Nakamura, Takashi）

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90585324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：器官発生過程においては、上皮間葉転換（EMT）や間葉上皮転換（MET）が重要である。転写因子エピプロフィン（Epf）は歯の発生過程において、上皮細胞では細胞が間葉化したEMTの状態を保ち、間葉組織に持続的に貫入していた。また、歯原性間葉細胞ではEpf欠損により象牙芽細胞の分化異常を呈し、間葉細胞のMETを阻害していた。このことから、Epfは間葉細胞の上皮化に関わり、層状に配列する象牙芽細胞分化に関与していることが示唆された。乳がん細胞を用いた研究からもEpfがEMTを負に制御していることが示唆される結果が得られ、Epfが上皮細胞のアイデンティティを制御している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、エピプロフィンが器官発生において上皮間葉転換（EMT）や間葉上皮転換（MET）における上皮のアイデンティティの維持を制御していることが示唆された。このことから、エピプロフィン発現を人工的に制御する器官原基再生技術への応用が期待される。また、乳がん細胞のEMTを負に制御することからエピプロフィン発現チェックによるがん悪性度評価システムやエピプロフィン発現誘導による新たながん細胞の形質変換治療の開発などへ繋がると考えている。

研究成果の概要（英文）：Events such as epithelial-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal-epithelial transition (MET) are important during organogenesis. Epiprofin (Epf), shows a characteristic expression pattern during tooth development. In tooth buds of Epf-deficient (Epf^{-/-}) mice, epithelial cells maintain mesenchymal phenotypes that so called EMT state and continuously invade dental mesenchyme. In addition, the expression of junctional proteins and odontoblast marker genes in dental mesenchymal cells of Epf^{-/-} mice were down-regulated and result in abnormal differentiation of odontoblasts. This suggests that Epf is also involved in MET-mediated epithelial transition in dental mesenchymal cells and is involved in the layer formation of odontoblasts. Further studies using breast cancer cells also showed results suggesting that Epf negatively regulates EMT. The results of this study suggest that Epf may regulate the maintenance of epithelial cell identity.

研究分野：硬組織薬理学

キーワード：器官発生 エピプロフィン 上皮間葉転換 間葉上皮転換 発生生物学 細胞生物学 転写因子 象牙芽細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞が増殖、遊走移動、凝縮を繰り返して、組織形態を変化させながら発生時の器官形成は進行していく。組織を構成する細胞は、形態学的に上皮系と間葉系に大別されるが、上皮系細胞は一般的に円筒状で、細胞同士が密に接着し、基底膜上にシート状に並んでいる。これに対し、間葉細胞は不規則な形態で、細胞同士が部分的に接着し、自由に移動できる運動性をもつ。歯、唾液腺、毛包などの上皮系器官の発生は、上皮が間葉組織に侵入しながら器官原器を形成していくが、組織をよく観察してみると上皮細胞同士は密に接着し基底膜構造を維持しながら、一部の細胞集団が一塊となり細胞遊走能を獲得し間葉組織へと陥入し器官原器を形成していることがわかる。また歯の発生後期では歯原性間葉細胞が象牙芽細胞へと分化する際、上皮細胞様にシート状に配列し、象牙基質タンパクの分泌が始まる。上皮細胞が遊走能する場合や間葉細胞が上皮細胞のようなシート状に配列する際に、エピプロフィンタンパク質 (Epfm) の発現と細胞内局在がダイナミックに変化している。

上皮系器官形成に重要な役割を演じている転写因子エピプロフィンを欠損させたマウス (Epfm KO) では、上皮および歯原性上皮細胞が間葉組織へ断続的に陥入し、多数の陥入した上皮が器官原器を複数形成することにより、過剰な数の毛包や歯を形成するという表現型を呈している。これまでに我々は歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への分化、上皮の分化、毛包形成上皮細胞への運命決定、歯数制御における Epfm の機能について報告してきたが、Epfm が欠失することと上皮の細胞遊走能が亢進し規律性が喪失した間葉転換状態に誘導される分子機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、器官発生過程において持続的に上皮が間葉組織に陥入していく過程において、上皮細胞が移動能を獲得し間葉組織に陥入していく機構、間葉細胞である象牙芽細胞がシート状に配列する機構解明を目指し、器官形成における上皮間葉転換および間葉上皮転換における Epfm の役割を明らかにする。さらにはがん細胞を用いて上皮間葉転換における Epfm の役割を解明していくことを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

歯の発生過程における上皮間葉転換の役割とその制御機構を、マウスの器官培養系を用いて解析した。また、乳がん細胞や膀胱がん細胞系を用いてエピプロフィンが器官発生時に制御している上皮間葉転換の分子機構の解明を行った。

4. 研究成果

(1) 歯の発生過程における Epfm の細胞遊走能への関与

Epfm は転写因子として同定されたが、ケラチノサイトでの研究において、細胞質内では細胞周期調節因子としてはたらき細胞増殖などに関与することが明らかとなっている。歯の発生時においても Epfm は細胞質に局在することによって、細胞増殖を活性化させることが明らかとなった。生涯を通じて伸び続けるげっ歯類の切歯の解析結果では、歯原性上皮細胞の幹細胞維持と分化誘導の切り替えにも、Epfm の細胞内局在が変化しケラチノサイトと同様の機構が存在していた。また、低活性の CMV プロモーターで発現させた Epfm は細胞質内に発現し、N-カドヘリンや Snail などの間葉系マーカーの発現が亢進する一方、細胞遊走能が強活性の CMV プロモーターで発現させた Epfm は核内に局在し遊走能が低下した。また、TGF-β で誘導される Epfm は細胞質で発現している割合が高く、発現量や細胞内局在によって上皮間葉転換に関わっていることが示唆された。

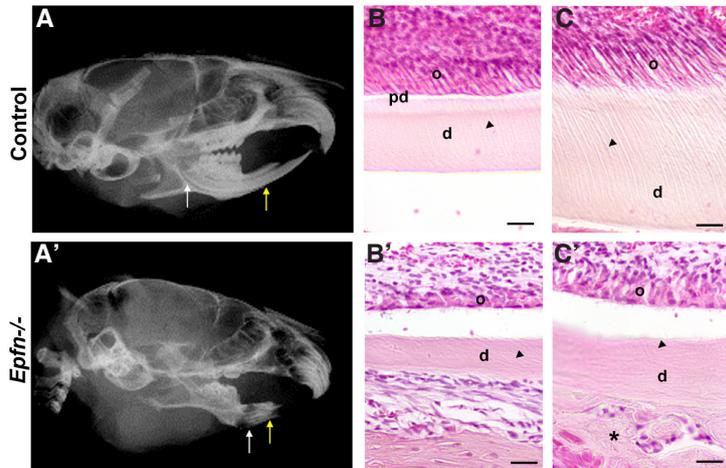


図1 エピプロフィン遺伝子欠損 (Epfm -/-) マウスの頭部X線像と歯胚の組織像 Int. J. Dev. Biol. 68: 19-24 (2024)改変

(2) 歯原性間葉細胞における Epfm の役割

Epfm 遺伝子欠損 (Epfm KO) マウスの歯は、エナメル欠損だけではなく、象牙芽細胞分化を阻害し象牙質形成に異常な表現型を呈する。Epfm KO マウスでは、象牙細管とよばれる構造の形成が

阻害されており、象牙基質中に象牙芽細胞が埋め込まれる、いわゆる骨様象牙質様の組織像が観察された (図 1)。また、歯原性間葉細胞から象牙芽細胞に分化誘導される際に増強されるアルカリホスファターゼ活性や Dspp 発現、I 型コラーゲン沈着などの初期分化マーカー遺伝子の発現が減弱していた。Epfⁿ KO マウスの歯では、象牙芽細胞特有の細胞形態や細胞極性が認められず、歯原性間葉細胞から象牙芽細胞へと分化する過程が阻害されていることが明らかとなった。さらには、象牙芽細胞の成熟に必要であり、前象牙芽細胞層に発現すべき Zo-1 や Connexin 43 といったタイトジャンクションタンパク質やギャップジャンクションタンパク質の発現が変化しており、これらの変化は、Epfⁿ KO マウスにおける象牙芽細胞の分化と象牙質形成不全の原因になっていることが示唆された (図 2)。

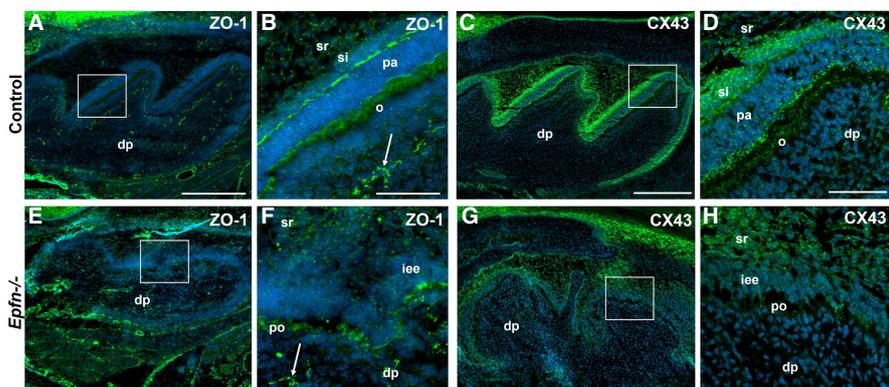


図 2 エピプロフィン遺伝子欠損 (Epfⁿ -/-) マウス発生歯胚におけるZo-1, CX43タンパク質発現 Int. J. Dev. Biol. 68: 19-24 (2024)改変

(3) 乳がん細胞における上皮間葉転換時 Epfⁿ 発現変化

E-カドヘリンなどの上皮系マーカーを発現している MCF-7 および BT-20 などの乳がん細胞株は、Epfⁿ 遺伝子ならびに Epfⁿ タンパク質を発現していた。一方、ビメンチンやN-カドヘリンなどの一連の間葉細胞マーカーを発現している乳がん細胞株 MDA-MB-231 は、Epfⁿ 遺伝子ならびに Epfⁿ タンパク質の発現は MCF-7 と比較すると非常に低レベルであった。また、がん細胞の悪性度の指標となる細胞遊走能を比較すると MDA-MB-231 は MCF-7 と比較して有意に高く、MDA-MB-231 がより高い悪性型の乳がん細胞株であることが確認された。つまり Epfⁿ 発現の喪失が、細胞遊走能を亢進される一因であることが示唆された。そこで、MDA-MB-231 に GFP 標識した Epfⁿ タンパク質を強制発現させ細胞遊走能を解析した。その結果、Epfⁿ が強制発現している GFP 陽性の MDA-MB-231 の細胞遊走能は有意に低下したが、GFP のみ発現させた MDA-MB-231 細胞の遊走能は変化がなかった。このことから Epfⁿ の発現消失が上皮細胞の上皮間葉転換を誘導し、細胞遊走能を獲得し間葉系の細胞形質をもった上皮細胞へ変換することが示唆された。

これまで我々が報告している Epfⁿ KO マウスの歯原性上皮細胞が、持続的に細胞遊走能を維持し間葉組織に貫入している表現系の分子機構解明は、器官原器を複製し再生させる新たな歯の再生医療技術の開発につながると考えている。本研究成果によって Epfⁿ 発現が上皮細胞の細胞遊走能を制御していることが明らかとなった。今後、器官発生過程での Epfⁿ による上皮間葉転換の分子機構の解明と Epfⁿ 発現制御による新たな歯の再生技術の開発に向けた応用研究を進めていく必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada Aya, Yoshizaki Keigo, Saito Kan, Ishikawa Masaki, Chiba Yuta, Hoshikawa Seira, Chiba Mitsuki, Hino Ryoko, Maruya Yuriiko, Sato Hiroshi, Masuda Keiji, Yamaza Haruyoshi, Nakamura Takashi, Iwamoto Tsutomu, Fukumoto Satoshi	4. 巻 64
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 Journal of Oral Biosciences	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chiba Yuta, Yoshizaki Keigo, Sato Hiroshi, Ikeuchi Tomoko, Rhodes Craig, Chiba Mitsuki, Saito Kan, Nakamura Takashi, Iwamoto Tsutomu, Yamada Aya, Yamada Yoshihiko, Fukumoto Satoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Deficiency of G protein coupled receptor <i>Gpr111/Adgrf2</i> causes enamel hypomineralization in mice by alteration of the expression of kallikrein related peptidase 4 (<i>Klk4</i>) during <scp>pH</scp> cycling process	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202202053R	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 Jimenez-Rojo Lucia, de Vega Susana, Ibarretxe Gaskon, Nakamura Takashi, Unda Fernando J.	4. 巻 68
2. 論文標題 Disrupted odontoblast differentiation and dentin dysplasia in <i>Epirofin</i>-deficient mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The International Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 19 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1387/ijdb.2400291j	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Nakamura and Minoru Wakamori
2. 発表標題 Elucidation of neuronal-epithelial communication in murine submandibular development
3. 学会等名 The Korean Association for Dental Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 中村 卓史、若森 実
2. 発表標題 器官発生機構を基軸とした神経応答型再生唾液腺構築への挑戦
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年～2023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	中村 はな (Nakamura Hannah) (30385827)	東北医科薬科大学・医学部・講師 (31305)	
研究分担者	若森 実 (Wakamori Minoru) (50222401)	東北大学・歯学研究科・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
---------	---------