

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659859

研究課題名(和文) 遺伝子Xの発現量調節による歯原性幹細胞作出の試み

研究課題名(英文) Study for establishment of odontogenic stem cells by regulation of gene "X" expression.

研究代表者

清島 保 (KIYOSHIMA, Tamotsu)

九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20264054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経、筋肉、心筋などの様々な細胞に分化しうる細胞ではなく、歯を構成するエナメル芽細胞あるいは象牙芽細胞にのみ分化しうる組織幹細胞(歯原性幹細胞)の作出を角化細胞や線維芽細胞から試みた。胎生期の口腔粘膜上皮が間質へ陥入する頃から、将来のエナメル器となる上皮細胞に強い発現を認める遺伝子を導入した。一部の遺伝子導入細胞株にて石灰化誘導培地による石灰化、歯原性因子やRunx2の発現や発現上昇がみられた。この細胞をヌードマウスに移植すると、移植細胞塊に石灰化や各種歯原性因子の発現が観察され、遺伝子導入により角化細胞が歯のエナメル質を作る細胞へ形転換を起こす可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The recombination of cells obtained from tooth germs successfully develop into teeth in previous studies. However, it is difficult to use human tooth germ as a cellular seed because of ethical issues. We attempted establishment of odontogenic stem cells by regulation of gene "X" expression. We herein transfected Thymosin beta 4 (Tb4) expression vector, as a gene "X" expression, into non-odontogenic HaCaT cells in this study because Tb4 has been reported to be closely related to the initiation and development of the tooth germ. Tb4-transfected cells formed nodules with calcium phosphate in calcification-inducing medium. Selected clones with larger amounts of calcium deposits expressed the upregulation of odontogenesis-related genes. These proteins were immunohistochemically observed in in vitro and vivo samples. This study demonstrated the possibility of induction of dental epithelial cell differentiation marker gene expression in non-odontogenic HaCaT cells by Tb4.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯の再生 組織再構築 歯胚形成 歯原性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療では、神経、筋肉、心筋などの様々な細胞に分化しうる細胞をより簡単に、効率よく、かつ癌化などの危険性を回避して作製されることが期待され、世界中の研究室で競い合っている。

近年、マウスやヒトの線維芽細胞に4つの転写因子の遺伝子導入により、多能性幹細胞 (iPS細胞) へとリプログラミングできることが示され (Takahashi & Yamanaka, Cell 2006)、再生医療の実現に向けてiPS細胞を用いた研究が精力的に進められている。また、2010年Vierbuchenらは、3つの転写因子の遺伝子導入により、“分化した線維芽細胞を、幹細胞という未分化な中間状態を経ずに神経細胞に変えることに成功した”と報告した (Nature 2010)。この試みは、「ダイレクト・リプログラミング」と呼ばれ、iPS細胞研究と共に世界的に注目されている。

本研究における新たな試みは、転写因子とは異なる“遺伝子X”を利用することである。この“遺伝子X”の発現を角化細胞で過剰発現させると、Runx2を発現し、一部の歯原性因子の発現もみられた。また、歯胚由来上皮細胞で発現抑制を図ると、Runx2の発現が減じ、一部の歯原性因子の発現も減少した結果を得たことによる。

そこで本研究課題では、転写因子とは異なる“遺伝子X”の発現調節によって「リプログラミング」を誘導し、歯原性幹細胞作出法を画策しようというものである。

さらにこの“遺伝子X”発現の調節制御を試みて、その効果を検討する。これは、iPS細胞作製やリプログラミングによる形質転換を行う際には転写因子の恒常的発現が施されたが、生体内では器官形成初期のみに発現し、重要な役割を果たすと考えられる因子も様々有る点を鑑みたことによる。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経、筋肉、心筋などの様々な細胞に分化しうる細胞ではなく、歯を構成するエナメル芽細胞あるいは象牙芽細胞にのみ分化しうる組織幹細胞 (歯原性幹細胞) の作出を角化細胞や線維芽細胞から試みる。

われわれは研究過程で、角化細胞や歯胚由来上皮細胞で発現を増減させると、Runx2の発現が増減し、一部の歯原性因子の発現量の変化

をもたらすある因子を見出した。この因子は転写因子とは異なるものと考えられる。

そこでこの因子をコードする遺伝子 (“遺伝子X”と仮称) の発現調節を角化細胞や線維芽細胞に施し、元の細胞の形質変化を検索し、歯原性幹細胞作出を画策する。

## 3. 研究の方法

### ① E11.0下顎およびE15.0歯胚の器官培養下Tb4アンチセンスオリゴを用いたTb4発現ノックダウンアッセイ

上記処理を行った試料の形態学的解析、歯胚発生・形態形成関連遺伝子・蛋白発現解析

### ② Tb4発現vectorを導入したヒト皮膚表皮由来のHaCaT細胞の細胞形質転換の検索

石灰化誘導培地による石灰化の発生

上記処理を行った試料の形態学的解析、歯胚発生・形態形成関連遺伝子・蛋白発現解析

さらにヌードマウスへTb4遺伝子発現細胞移植を行い、in vivoにおける形態学的解析、歯胚発生・形態形成関連遺伝子・蛋白発現解析

### ③ in situ Hybridization法を用いた歯胚発生・形態形成過程におけるTb4と高相同性を有するTb10の発現様式の検索

E11.0下顎およびE15.0歯胚の器官培養下Tb10-siRNAを用いたTb10発現ノックダウンアッセイ

上記処理を行った試料や歯原性上皮/間葉細胞株を用いた形態学的解析(細胞増殖活性や細胞死誘導等に対する検索含む)、歯胚発生・形態形成関連遺伝子・蛋白発現解析

### ④ GFP融合蛋白発現系、mRNA発現調節系および不安定蛋白質発現量制御システムを備えた歯原性上皮細胞株/不死化角化細胞株の作製各種抗オルガネラ因子抗体を用いた免疫細胞染色/各種オルガネラ因子融合蛍光蛋白発現vectorの遺伝子導入を用いて標的因子の細胞内局在の検索

これらの結果を検討して改善点の焙り出し、転写因子に限らず、器官形成期に一過性発現ある

いは特異的経時的变化を示す因子は様々報告されていることも併せて、今後の戦略の構想を練っていく。

#### 4. 研究成果

われわれは、iPS細胞のように神経、筋肉、心筋などの様々な細胞に分化しうる万能幹細胞の作製法の開発ではなく、歯を構成するエナメル芽細胞あるいは象牙芽細胞にのみ分化しうる組織幹細胞（歯原性幹細胞）の作出を角化細胞や線維芽細胞から試みた。

標的因子“遺伝子X”として胎生期の口腔粘膜上皮が間質へ陥入する頃から、将来のエナメル器となる上皮細胞に強い発現を認めたThymosin beta 4, X-linked (Tb4) を考えた。

まず歯胚発生・形態形成におけるTb4の機能的役割を検索した。E11.0下顎およびE15.0歯胚の器官培養に対してTb4アンチセンスオリゴによるTb4発現ノックダウンアッセイを行うと、歯原性上皮の間葉組織への陥入やエナメル器形成の抑制が有意に観察された。これらの試料のmRNA発現定量解析を行うと、Tb4が歯原性因子の遺伝子発現制御やこれら歯原性因子の上流にあるRunx2やNucleolinの発現制御への関与が明らかとなった。歯原性上皮細胞が間葉へ陥入する際に基底膜改造に関わるMatrix metalloproteinase-2/-9 (MMP-2/-9)の発現変化を検索すると、歯原性上皮細胞より分泌したMMP-2活性の低下がみられ、Tb4のMMP-2発現調節への関与も示唆された。また、Tb4の機能抑制により細胞移動能低下やE-cadherin発現上昇を認めた。これらの結果より、歯胚発生・形態形成においてTb4が機能的役割を担っていることが明らかとなった。

次にTb4発現vectorをヒト皮膚表皮由来のHaCaT細胞へ導入した。石灰化誘導培地にて細胞培養を行うと、遺伝子導入した一部の細胞株にて石灰化物の形成が見られ、アリザリンレッドやフォンコッサ染色に陽性反応を示した。また、元素解析を行うとリン酸カルシウムであることが示唆された。石灰化誘導を示した細胞株にてアメロジェニン、アメロブラスチン、エナメルリン蛋白などの歯原性因子の発現や発現上昇を確認した。また、それらの細胞ではRunx2の発現上昇がみられた。siRNAによる遺伝子機能抑制下では、石灰化の程度に影響が生じた。しかし、対照群とする親株やempty vectorを導入

した細胞株では、石灰誘導による石灰化や歯原性因子の発現は観察されなかった。

さらにTb4遺伝子発現細胞をヌードマウスに移植し、移植細胞塊に石灰化や各種歯原性因子の発現を免疫染色にて確認した。対照群とする親株およびempty vectorを導入した細胞株も細胞胞巣を形成したが、石灰化や各種歯原性因子の発現は観察されなかった。

一方、Tb4と高相同性を有するTb10のマウス歯胚形成過程における発現様式と機能について解析を行った。in situ Hybridization法を用いた結果、歯胚形成過程においてTb4 mRNAが上皮組織に発現しているのに対し、Tb10 mRNAは主に歯原性間葉由来の組織に発現していた。また、出生直後ではTb10 mRNAの発現は前象牙芽細胞と前エナメル芽細胞にのみ認められた。歯根形成期では、Tb10 mRNAの発現はヘルトヴィッヒ上皮鞘やその周囲の歯原性間葉系細胞に認められたが、Tb4 mRNAの発現は認められなかった。また、siRNAによるTb10機能阻害下で歯胚の器官培養を行った処、Tb10 siRNA群で歯胚の発育不良が認められた。Tb10は歯胚形成に関与していることも示唆された。

GFPおよび他の遺伝子を用いて強制発現および不安定蛋白質発現量制御を試みた。まず強制発現系による一過性遺伝子導入にて、ある膜蛋白とGFPの融合蛋白が細胞質内に顆粒状に陽性像を示すことを確認し、細胞内オルガネラへの局在が示唆された。このGFP融合蛋白の細胞質内局在は免疫染色による蛋白の細胞内局在とも類似し、この発現蛋白の機能性が一部示された。この膜蛋白の不安定蛋白質発現量制御によるmRNA発現量は、導入細胞間でmRNA発現量に株間差が見られたものの、形態学的変化はもたらさなかった。不安定蛋白質発現量制御では、mRNA発現は行うが、翻訳された蛋白速やかに排除されるためと思われる。

次期研究では、より厳密な遺伝子発現制御によりどのようなシグナル伝達系が働いているかの解明が重要な課題となろう。このような検索から得られた問題点や改善点を踏まえてさらに研究を展開していく。

#### 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 6 件)

- ① 藤原弘明、小林家吉、清島 保、永田健吾、和田裕子、大隈由紀子、塩塚真帆、木原槇子、坂井英隆

左側上顎に発生した石灰化嚢胞性歯原性腫瘍の1例

診断病理、28(2) 117-121 (2011)

- ② Kiyoshima T., Enoki N., Kobayashi I., Sakai T., Nagata K., Wada H., Fujiwara H., Ookuma Y., and Sakai H.

Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts.

Int. J. Mol. Med. 30(5): 1007-12 (2012).

DOI: 10.3892/ijmm.2012.1102.

- ③ Ookuma Y.F., Kiyoshima T., Kobayashi I., Nagata K., Wada H., Fujiwara H., Yamaza H., Nonaka K., and Sakai H.

Multiple functional involvement of thymosin beta-4 in tooth germ development.

Histochem. Cell Biol. 139(2): 355-70 (2013).

DOI: 10.1007/s00418-012-1033-1.

- ④ Kiyoshima T., Nagata K., Wada H., Fujiwara H., Shiotsuka M., Kihara M., Hasegawa K., Someya H., and Sakai H.

Immunohistochemical Expression of Thymosin b4 in Ameloblastomas and Odontomas.

Histol. Histopathol. 28(6): 775-86 (2013).

- ⑤ Shiotsuka M., Wada H., Kiyoshima T., Nagata K., Fujiwara H., Kihara M., Hasegawa K., Someya H., Takahashi I., and Sakai H.

The expression and function of thymosin beta 10 in tooth germ development.

Int. J. Dev. Biol. 57(11-12): 873-83 (2013).

DOI: 10.1387/ijdb.120240hs.

- ⑥ Kiyoshima T., Fujiwara H., Nagata K., Wada H., Ookuma Y.F., Shiotsuka M., Kihara M., Hasegawa K., Someya H., and Sakai H.

Induction of dental epithelial cell differentiation marker gene expression in non-odontogenic human keratinocytes by transfection with thymosin beta 4.

Stem Cell Res. 12(1): 309-22 (2014).

DOI: 10.1016/j.scr.2013.11.006.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 和田裕子、塩塚真帆、清島保、小林家吉、永田健吾、藤原弘明、坂井英隆

歯胚形成過程における Thymosin $\beta$ -10 の役割 ～Thymosin $\beta$ -4 との比較検討～

第 100 回日本病理学会総会

2011/4/28-30, パシフィコ横浜・会議センター (神奈川)

- ② 小林家吉、清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、坂井英隆

Thymosin beta 4 のノックダウンによる歯原性細胞の変化について

第 100 回日本病理学会総会

2011/4/28-30, パシフィコ横浜・会議センター (神奈川)

- ③ 和田裕子、清島保、小林家吉、藤原弘明、坂井英隆

Soft tissue tumour of the lower lip

第 22 回日本臨床口腔病理学会、第 5 回アジア口腔病理学会

2011/8/23-25, 福岡歯科大学主催

九州大学 (福岡)

- ④ 古庄克宏、和田裕子、清島保、小林家吉、永田健吾、藤原弘明、塩塚真帆、坂井英隆

癌治療用アポトーシス誘導ベクターの作成と導入の試み

第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2011/9/30-10/1, 長良川国際会議場 (岐阜)

- ⑤ 塩塚真帆、和田裕子、清島保、永田健吾、藤原弘明、高橋一郎、坂井英隆

マウス歯胚形成を制御する Thymosin  $\beta$ 10 の発現様式解析と機能解析

第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会  
2012/9/14-16, 奥羽大学 (福島)

- ⑥ 清島保、和田裕子、永田健吾、藤原弘明、坂井英隆  
エナメル上皮腫における Thymosin β4 の  
発現とその役割について  
第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会  
2012/9/14-16, 奥羽大学 (福島)
- ⑦ 木原槇子、清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、長谷川佳那、染矢祐孝、高橋一郎、坂井英隆  
マウス歯胚形成過程における integral membrane protein 2a (itm2a) の発現様式  
第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会  
2013/9/20-22, 岡山コンベンションセンター (岡山)
- ⑧ 藤原弘明、清島保、永田健吾、和田裕子、木原槇子、長谷川佳那、染矢祐孝、高橋一郎、坂井英隆  
Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞の作製  
第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会  
2013/9/20-22, 岡山コンベンションセンター (岡山)
- ⑨ 染矢祐孝、清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、木原槇子、長谷川佳那、高橋一郎、坂井英隆  
マウス歯肉上皮由来角化細胞への Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞誘導  
第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会  
2013/9/20-22, 岡山コンベンションセンター (岡山)
- ⑩ Makiko Kihara, Tamotsu Kiyoshima, Kengo Nagata, Hiroko Wada, Hiroaki Fujiwara, Kana Hasegawa, Hiroataka Someya, Ichiro Takahashi and Hidetaka Sakai  
Itm2a Expression during the Tooth Germ Development

Kyudai Oral Bioscience (KOB)

2014/2/28-3/1, Fukuoka Recent Hotel  
(Fukuoka)

[その他]

九州大学プレスリリース

: Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞作製の可能性

[http://www.kyushu-u.ac.jp/pressrelease/2013/2013\\_12\\_03.pdf](http://www.kyushu-u.ac.jp/pressrelease/2013/2013_12_03.pdf)

新聞記事 西日本新聞

: 歯のエナメル質再生に関する研究

2013 年 12 月

テレビ放映 NHK

: 「熱烈発信福岡 Now」

歯のエナメル質再生に関する研究

2013 年 12 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清島 保 (KIYOSHIMA, Tamotsu)

九州大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 20264054

(2) 研究分担者

坂井 英隆 (SAKAI, Hidetaka)

九州大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 80136499

永田 健吾 (NAGATA, Kengo)

九州大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 90189134

和田 裕子 (WADA, Hiroko)

九州大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 70380706

小林 家吉 (KOBAYASHI, Ieyoshi)

九州大学・大学院歯学研究科・准教授

(平成 24 年 3 月退職にて辞退)

研究者番号: 40243951

(3) 連携研究者

なし