

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390441

研究課題名(和文) 歯の発生における歯数制御機構の解明と再生医療への応用

研究課題名(英文) Elucidate the regulational mechanism of tooth bud formation

研究代表者

中村 卓史 (NAKAMURA, TAKASHI)

東北大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90585324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規転写因子エピプロフィン(Epiprofin)の歯原性上皮細胞の増殖と分化、そして歯胚の組織発生過程での歯数制御における役割と作用機構の解明を目的としている。歯数制御に関しては、Epfⁿ KOの解析により、歯原性上皮細胞の分化阻害に加え、細胞の増殖活性とアポトーシスの低下に起因し、ゆっくりと持続的な上皮の間葉組織への陥入と枝分かれにより引き起こされている事が示唆された。この現象を、ケラチノサイトを用いて解析した結果、Epfⁿは幹細胞から産生されるTransit Amplifying細胞の増殖、Notchシグナルを介して、細胞の運命決定に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this study is to elucidate the molecular mechanism of the regulation in the number of teeth by novel transcription factor Epiprofin in tooth germ formation and development. Our analysis of Epfⁿ KO mice revealed that Epiprofin promotes the transitory cell proliferative activities in keratinocyte as well as dental epithelial cells. In Epfⁿ KO mice, keratinocytes and dental epithelial cells keep migrating into dental mesenchyme due to the decrease of proliferation activity and apoptosis of cells. In addition, Epfⁿ contributes to activate the cell proliferation of Transit Amplifying cells produced from stem cells through Notch signaling. Furthermore Epfⁿ exerts a critical role in cell fate determination of dental epithelial cells and epithelial stem cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯 上皮 エピプロフィン 細胞増殖 Transit Amplifying cells Notch 運命決定 分化

1. 研究開始当初の背景

近年の再生医療の進歩により、部分的な歯の再生や小動物の機能的な歯の再生が可能となってきたが、ヒトへの応用可能な十分な大きさの歯を人工的に再生できたという報告例はなく、再生技術のさらなる発展が必要であると考えられる。その1つに人工歯胚を作成する際に、十分な数の細胞を未分化な状態で維持し増やしていく技術の開発があり、ヒトの歯の再生を考える上で不可欠な技術となる。これまでの研究から、歯髄組織中にある歯原性間葉幹細胞が象牙芽細胞に分化することが明らかになり、歯髄組織から調整した細胞を増殖させることで、再生医療に必要な細胞数の間葉細胞は調達出来ると考えられる。しかしながら、エナメル形成に必須のエナメル芽細胞に分化可能な歯原性上皮細胞の調整法は確立されておらず、いかにして歯原性上皮細胞を確保するかが、ヒトサイズの歯の再生においてキーとなる。

我々が同定したエピプロフィン /Sp6 (Epiprofin, Efn) は Sp/Krüppel-like factor (KLF)ファミリーに属する転写因子で、発生初期の歯原上皮に発現し、その後内エナメル上皮に限局して発現する。我々は Efn の同定、機能解析さらに遺伝子欠損マウス (Efn K0) やトランスジェニックマウス (K5-Efn) を作成し解析を進め、歯の発生における Efn の機能は、1, 歯原性上皮細胞の一過性増殖促進と分化誘導作用、2, エナメル基質遺伝子の発現誘導、3, 歯数の制御、4, 歯冠歯根の形態形成、5, 歯原性上皮の枝分かれ、6, 歯原性上皮細胞のアポトーシス、など歯胚発生に重要な機能を発揮している事を明らかにしてきた。さらに、一部報告済みであるが、皮膚、四肢、毛根、性器副甲状腺に発現している Efn が、各組織の形態形成や組織発生や機能に重要な役割を演じていることも明らかとなってきた。

2. 研究の目的

本研究課題では、新規転写因子エピプロフィン (Epiprofin, Efn) の歯原性上皮細胞の増殖と分化、そして歯胚の組織発生過程での歯数制御における役割と作用機構の解明を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 上皮特異的に Efn を発現するトランスジェニックマウス (K5-Efn) の歯胚形成と歯数制御機構の解析

上皮特異的プロモーターであるケラチン5のプロモーターの下流にマウス Efn の CDS 配列を挿入したベクターを用いてトランスジェニックマウスを作成し、Efn の過剰発現歯胚の分布を免疫組織法を用いて解析し、Efn 蛋白発現をウェスタンブロッティング法を用いて検討した。また、歯の形成を肉眼的、軟 X 線、組織学的に解析した。

(2) K5-Efn マウスにおける歯原性上皮細胞の増殖と分解の解析

歯原性上皮細胞増殖を BrdU の取り込み法を用いて E13.5 日齢の K5-Efn マウス歯胚を用いて解析した。また、出生直後のマウス下顎第一臼歯の mRNA を調整し、エナメル芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を解析した。

(3) 歯数制御に関与する古典的 Wnt シグナルにおける Efn 分子の役割解明

古典的 Wnt シグナルの活性をルシフェラーゼで評価できるレポーターベクター TOP-Flash luc を用いて、歯原性上皮細胞株 SF2 に Efn 発現ベクターを導入した場合の Wnt シグナル強度を解析した。

(4) Efn K0 マウスにおける上皮細胞の増殖とアポトーシス

Efn K0 マウスの上皮は肥厚する表現型があるのが分かっている。この表現型の発生機序を解明するため、Efn K0 マウス上皮を組織学的に観察し、免疫染色法および BrdU の取り込み法を用いて増殖活性を検討した。また、上皮は上皮幹細胞から持続的に上皮前駆細胞が産生され、生涯を通じて自己再生が繰り返される組織である。Efn K0 マウスが、上皮幹細胞の自己再生にどのように作用しているのかを Efn K0 マウスの上皮組織の遺伝子発現を野生型 (WT) マウスとマイクロアレーを用いて比較した。

(5) Efn の下流シグナルの探求

Efn は転写因子であり、免疫染色で細胞核にも局在していることが明らかとなっている。Efn K0 上皮の解析から Efn の標的遺伝子である Notch シグナルを見出し、Notch1 プロモーター領域への Efn 結合実験を ChIP アッセイ法を用いて検討した

4. 研究成果

(1) 我々が作成した K5-Efn マウスの胎生

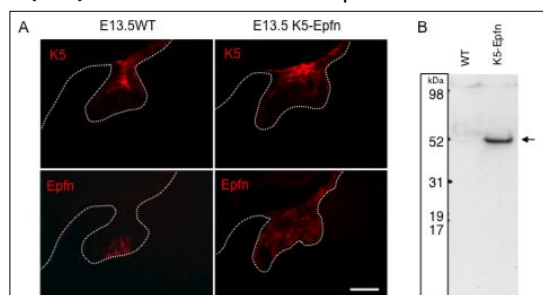


図1 K5-Efnトランスジェニックにおけるケラチン5、Efn蛋白の発現

13.5 日齢の発生歯胚に於いて、Efn の発現を検討した (図1)。その結果、ケラチン5はコントロールマウス (WT) 同様発生歯胚の歯原性上皮細胞全体に発現していた。内因性の Efn は発生歯胚の間葉細胞の近傍、将来

的に内エナメル芽細胞に分化していく領域の細胞群に強く発現していた(図1A)。また、トランスジェニックマウス歯胚に発現していた蛋白は、強制発現蛋白に負荷しているタグの抗体を用い、ウェスタンブロッティング

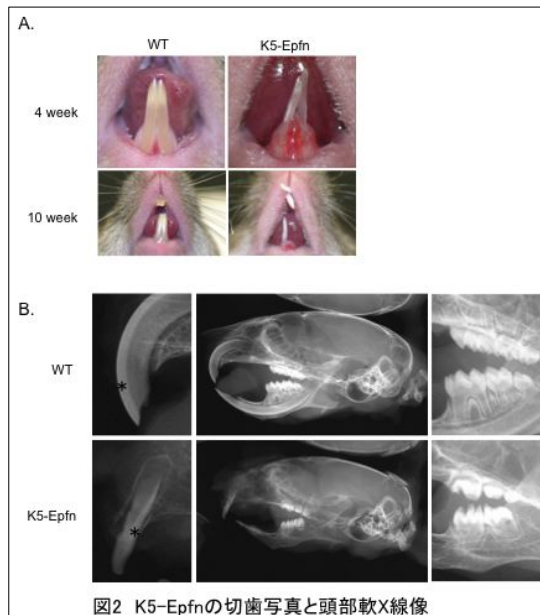


図2 K5-Epfnの切歯写真と頭部軟X線像

解析にて約 52kDa のバンドとして検出された(図1B)。生後4週齢の K5-Epfn マウス切歯部を観察すると、WT と比較すると、透明感のある白色で、形状も細く幼若であった(図2A)。10週齢になると切歯の萌出方向が螺旋状に広がり、幼若な下顎切歯は破折するケースが多く見られた(図2A)。また、軟X線解析

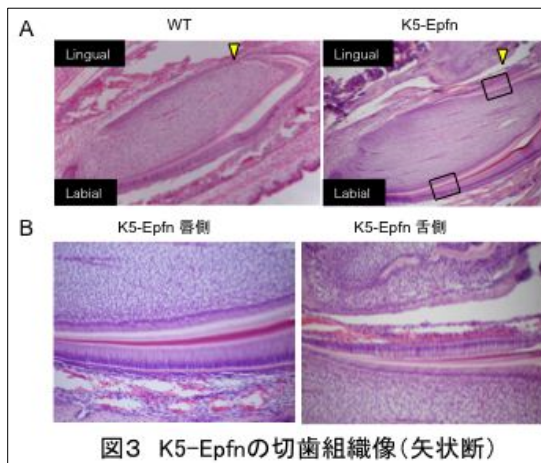


図3 K5-Epfnの切歯組織像(矢状断)

により切歯が短く、WT と比較して直線的であった。さらに通常は唇側のみエナメルが形成されるのに対し、K5-Epfn 切歯は舌側にもエナメル形成が見られた(図2B)。臼歯の形成に於いても、臼歯の歯冠歯根の形態異常が認められた。さらに、ほぼすべての K5-Epfn において下顎第3臼歯が欠失していた(図2B)。Epfn KO マウスでは多数の過剰歯が形成されたことと、これらの結果を総合すると、Epfn は 歯原性上皮細胞に発現する事により、歯数を制御している可能性が考えられた。さらに異所性のエナメル形成を確認するため切歯の切片を作成し HE 染色で組織学的に検

討した。図3Aに示すように通常は下顎切歯の唇側(Labial)にエオジンで染まるエナメル基質が観察されるが、K5-Epfn 切歯の場合、黄色の矢頭で示される舌側(Lingual)にもエナメル基質が分泌されているのが明らかとなった(図3B)。つまり、通常は舌側に発現していないEpfnがK5プロモーターによって舌側の歯原性上皮に発現することによって、エナメル芽細胞に分化誘導され、エナメル基質を分泌・沈着したことが示唆される。

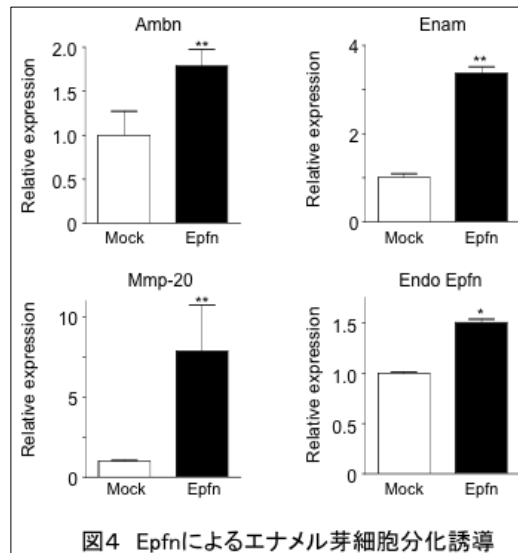


図4 Epfnによるエナメル芽細胞分化誘導

(2) Epfn を歯原性上皮細胞株 SF2 に強制発現させ、エナメル芽細胞分化マーカーであるアムロプラスチン(Ambn)、エナメルイン(Enam)、エナメライシン(Mmp-20)そしてエピプロフィン(Epfn)の発現をリアルタイムPCR法を用いて解析した。エピプロフィンは、強制発現ベクターに使用しているCDS以外の部位を認識するプライマーを用いたため内因性のエピプロフィン(Endo Epfn)発現を検出している。図4に示すように、Epfnによりすべてのエナメル芽細胞分化マーカー遺伝子発現が誘導されていることが明らかとなった。すなわち Epfn はエナメル芽細胞分化を正に制御する転写因子であることが分かった。K5-Epfn の細胞増殖を検討すると、K5-Epfn の歯原性上皮細胞における BrdU 陽性細胞数は、WT と比較して有意に多く観察された(図

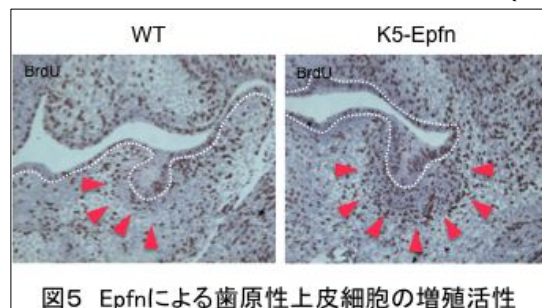


図5 Epfnによる歯原性上皮細胞の増殖活性

5)。興味深いことに、上皮に過剰発現させたEpfnの影響で、K5-Epfn 臼歯歯胚の間葉細胞の増殖能が活性化されていることが明らかとなった(図5赤矢頭)。

(3) Efn KO と K5-Efn マウスの歯数変化から、Efn は歯数を負に制御して言えると考えられる。Wnt シグナルの活性化は、過剰歯形成を誘導することから Efn による Wnt シグナルの影響を SF2 細胞を用いて検討した。予想に反し Efn は Wnt シグナルを活性化させる事が明らかとなった。Efn の発現量により、他の転写因子とのバランスによってより高度に Wnt シグナルが制御されている事も考えられ、今後の検討が必要である。

(4) Efn KO マウス上皮の組織標本を作製し、HE 染色後組織解析を行った。その結果、図6のように Efn KO マウスの上皮はコントロールであるヘテロマウス (HT) の上皮と比較し上部の細胞密度が増加し、肥厚していることが分かった。通常上皮の肥厚は、悪性腫瘍のように上皮細胞の過剰な増殖活性が原因となっている。そこで Efn KO マウス上皮細胞の増殖と細胞死の変化を検討した。

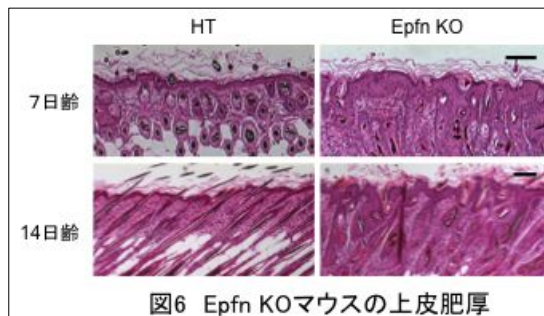


図6 Efn KOマウスの上皮肥厚

細胞の過剰な増殖活性が原因となっている。そこで Efn KO マウス上皮細胞の増殖と細胞死の変化を検討した。

図7に示すように、Efn KO マウス上皮の増殖のマーカーPCNA および ki67 の陽性細胞数が HT マウス上皮に比べて著しく減少していることが明らかとなった。同様に、G1/S 期の細胞が検出可能な BrdU 取り込み実験に於いても Efn KO マウス上皮の取り込み細胞の減少が確認された。また、細胞死アポトーシスを検出できる TUNEL アッセイでも、Efn KO マウスでの陽性細胞数の低下が確認された。この結果から、Efn KO マウス肥厚は、上皮

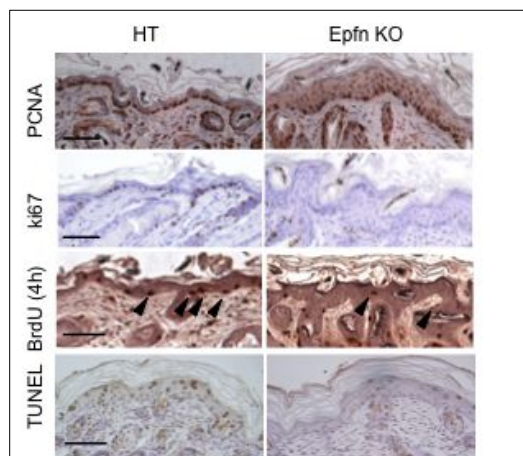


図7 Efn KOマウス上皮増殖とアポトーシス

細胞の増殖活性は低下しているものの、断続

的に細胞分裂を繰り返すことにより、上皮肥厚という表現型が呈されていることが示唆された。上皮では、基底層に存在する幹細胞が、非常にゆっくりとした増殖を維持し、幹細胞より非対称分裂により、上皮の大部分を構成する上皮細胞が産生される。幹細胞から最初に作られる上皮の前駆細胞は、TA 細胞とよばれ、非常に活発に分裂をする。Efn KO マウスの肥厚上皮が、幹細胞あるいは TA 細胞のどちらの細胞で構成されているかを検討するために、上皮細胞から mRNA を調整しマイクロアレー解析を行った。

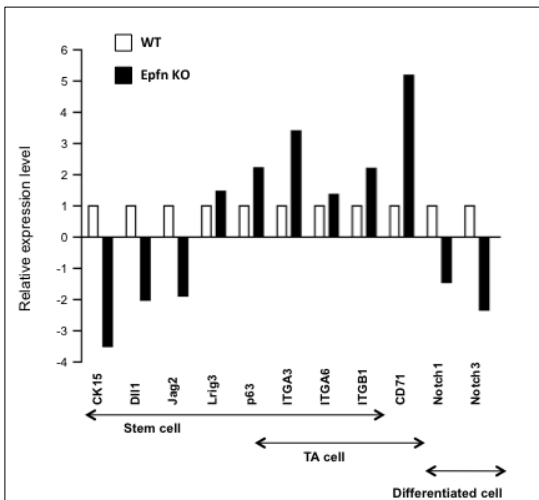


図8 Efn KOマウス上皮細胞の幹細胞・TA細胞マーカー発現

図8に示すように、Efn KO 上皮における幹細胞の割合は減弱していた。一方で、上皮前駆細胞である TA 細胞の集団が有意に増加していることが明らかとなった。TA 細胞は、活発な増殖活性特徴であるので、Efn KO 上皮を構成している細胞群は、前駆細胞でありながら、増殖活性を持たない細胞であることが明らかとなった。

この発見は、幹細胞から TA 細胞が作られる際、最初に細胞の分化方向が規定され、そのあとに細胞増殖活性が獲得されるという新しい概念に繋がっていくと考えている。

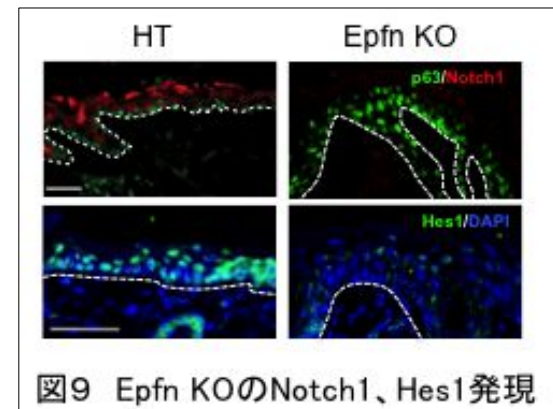


図9 Efn KOのNotch1、Hes1発現

(5) 図8のマイクロアレーの結果からも明らかのように、上皮細胞の分化マーカーである Notch1 および Notch3 の発現が Efn KO マウス上皮で減弱していた。そこでマウス上皮

切片で Notch1 およびその下流転写因子である Hes1 の発現を検討してみた。Notch1 の蛋白発現が HT マウス上皮の上層で発現が見られ、同様に Hes1 の発現も検出された。一方 Efn KO 上皮では、Notch1 ならびに Hes1 の発現が著しく低下していた。興味深いことに、未分化マーカーである p63 の発現細胞が増加していた(図9)。次に、Efn が Notch1 の上流に位置しているか否か検討するために、Notch1 のプロモーター解析をケラチノサイトを用いて行った。その結果、Efn は Notch1 のプロモーター活性を著明に上昇させた。そこで、転写因子である Efn が Notch1 のプロモーターに結合するか否かを確認するため、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行った。Notch1 プロモーターでは insilico で2つの Sp 転写因子結合部が予測されている。そこで、

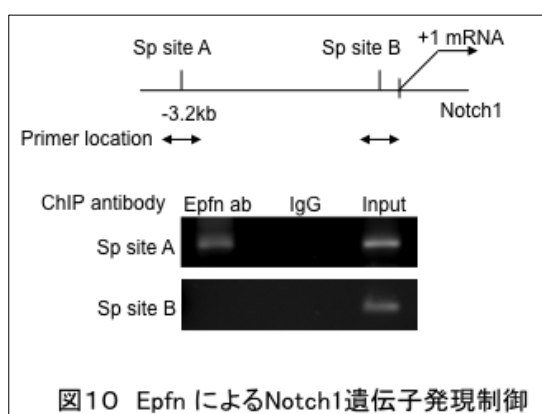


図10 Efn によるNotch1遺伝子発現制御

この2つの領域を検出できるプライマーを作成し、抗 Efn 抗体を用いて ChIP を行くと、Notch1 転写開始点近傍のプライマーでは結合が検出されなかったものの、Notch1 転写開始点から約 3.2kb 上流の領域での Efn の結合が確認できた(図10)。

今回明らかとなった Efn の機能が、上皮だけでなく歯原性上皮細胞でも認められるか、今後も継続して解析を進め、Efn 分子を応用した新たな上皮系器官再生技術の開発に貢献していきたい。

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16件)

1. Nakamura, T., Naruse, M., Chiba, Y., Komori, T., Iwamoto, T., Sasaki, K., and Fukumoto, S. Novel Hedgehog agonists promote osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 230(4):922-929, 2015 査読有り
DOI: 10.1002/jcp.24823
2. Nakamura, T., Yoshitomi, Y., Patel, V., Fukumoto, S., and Yamada, Y. Epiprofin orchestrates epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. *J. Cell Sci.* 127(24):5261-5272, 2014 査読有り

DOI: 10.1242/jcs.156778

3. Nakamura, T., and Fukumoto, S. Review: Genetics of supernumerary tooth formation, (Review) *J Oral Bioscience*, 50(4):180-183, 2013 査読有り
DOI: 10.1016/j.job.2013.06.006
 4. Nemoto, E., Ebe, Y., Kanaya, S., Tsuchiya, M., Nakamura, T., Tamura, M., and Shimauchi, H. Wnt5a signaling is a substantial constituent in bone morphogenetic protein-2-mediated osteoblastogenesis *Biochem Biophys Res Commun.* 422(4):627-632, 2012 査読有り
DOI:10.1016/j.bbrc. 2012.05.039
 5. Ibarretxe, G., Aurrekoetxea, M., Crendo, O., Badiola, I., Jimenez-Rojo, L., Nakamura, T., Yamada, Y., and Unda, F. Epiprofin/Sp6 regulates mesenchymal Wnt-BMP signaling, and the establishment of cellular junctions during the bell stage of tooth development. *Cell Tissue Res.* 22(1) :55-63, 2012 査読有り
DOI: 10.1007/s00441-012-1459-8
 6. Kamasaki*, Y., Nakamura*, T., Yoshizaki, K., Iwamoto, T., Yamada, A., Fukumoto, E., Maruya, Y., Iwabuchi, K., Furukawa, K., Fujiwara, T., and Fukumoto, S. Glycosphingolipids regulate ameloblastin expression in dental epithelial cells. *J Dent Res.* 91(1):78-83, 2012 査読有り
DOI:10.1177/0022034511424408
 7. Ishikawa, M., Iwamoto, T., Nakamura, T., Doyle, A., Fukumoto, S., and Yamada, Y. Pannexin 3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol.* 193(7):1257-74, 2012 査読有り
DOI:10.1083/jcb.201101050
 8. Arakaki, M., Ishikawa, M., Nakamura, T., Iwamoto, T., Yamada, A., Fukumoto, E., Saito, M., Otsu, K., Harada, H., Yamada, Y., and Fukumoto, S. Role of Epithelial-Stem Cell Interactions During Dental Cell Differentiation. *J Biol Chem.* 287(13):10590-601, 2012 査読有り
DOI:10.1074/jbc.M111.285874
- [学会発表](計31件)
1. Naruse, M., Saito, K., Fukumoto, S., Nakamura, T. Hedgehog Agonists Regulate Dental Mesenchymal Cell Proliferation and Differentiation. 93rd General Session & Exhibition of the IADR, 2015年3月11日

-14 日 Boston, MA USA

2. Futagi, M., Saito, K., Nakamura, T., Yamada, A., and Fukumoto, S. Mst1/2 regulate dental epithelium proliferation and ameloblast differentiation. 92nd General Session & Exhibition of the IADR, 2014 年 6 月 25 日-28 日 Cape Town, South Africa
3. Chiba, Y., Naruse, M., Nakamura, T., Fukumoto, S. Roles of Globoside (Gb4) during tooth development. 2013 International Association of Pediatric Dentistry, 2013 年 6 月 12 日-15 日 Seoul, South Korea
4. Nakamura, T., Fukumoto, S., Jimenez, L., de Vega, S., Unda, F., Yamada, Y. Roles of Epiprofin in tooth development. 2013 11th Tooth Morphogenesis and Differentiation. 2013 年 5 月 26 日-31 日 La Londe les Maures, France
5. Arakaki, M., Yamada, A., Iwamoto, T., Nakamura, T., Fukumoto, S. Induction of ameloblasts from induced pluripotent stem (iPS) cells. 2013 11th Tooth Morphogenesis and Differentiation. 2013 年 5 月 26 日-31 日 La Londe les Maures, France
6. 中村卓史 副甲状腺における新規転写因子エピプロフィンの役割、第 8 6 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日-27 日 仙台
7. He, B., Yoshizaki, K., Ishijima, M., de Vega, S., Nakamura, T., Fukumoto, S., Yamada, Y. Novel Class B bHLH Transcription factor CartD in Tooth Development. 91st General Session & Exhibition of the IADR, 2013 年 3 月 20 日-23 日 Seattle, WA USA
8. Iwamoto, T., Ishikawa, M., Yoshizaki, K., Yamada, A., Nakamura, T., Yamada, Y., Fukumoto, S. Pannexin 3, a gap junction protein, regulates odontoblast differentiation. 90th General Session & Exhibition of the IADR, 2012 年 6 月 18 日-23 日 Iguacu Falls, Brazil

〔図書〕(計 3 件)

1. 新規転写因子エピプロフィンによる副甲状腺ホルモン発現制御、中村卓史、福本敏、中村はな、千葉雄太、山田吉彦、岩本容泰 **内分泌・糖尿病・代謝内科** 第 38 巻 第 1 号 165-171 (平成 26 年)
2. Nakamura, T., Fukumoto, S., and Yamada, Y. Review: The regulation of tooth

development and morphogenesis. *Interface Oral Health Science* 2011. 14-21, 2012

3. Fukumoto, S., Arakaki, M., Iwamoto, T., Yamada, A., and Nakamura, T. Review: Epithelial cell lines in the field of dental research. *Interface Oral Health Science* 2011. 327-333, 2012

〔その他〕

新聞掲載 1 件
河北新報(朝刊) 平成 26 年 11 月 25 日(社会面 24 ページ)

ホームページ

http://www.kahoku.co.jp/tohokunews/201411/20141125_13010.html

<http://news.goo.ne.jp/article/beautynews/trend/beautynews-6334.html>

<http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=373617&lindID=5>

<http://woman.mynavi.jp/article/141113-80/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 卓史 (TAKASHI NAKAMURA)
東北大学・歯学研究科(大学院)・准教授
研究者番号: 90585324

(2)研究分担者

阪井 丘芳 (TAKAYOSHI SAKAI)
大阪大学・歯学研究科(大学院)・教授
研究者番号: 90379082

齋藤 正寛 (MASAHIRO SAITO)
東北大学・歯学研究科(大学院)・教授
研究者番号: 40215562

(3)連携研究者

福本 敏 (SATOSHI FUKUMOTO)
東北大学・歯学研究科(大学院)・教授
研究者番号: 30264253