

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792294

研究課題名(和文) 新規エナメル芽細胞マーカー Sox21 は歯原性上皮細胞の分化を調節するのか？

研究課題名(英文) Novel ameloblast marker Sox21 regulate the differentiation of dental epithelial cells?

研究代表者

齋藤 幹 (SAITO, Kan)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40380852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 成熟エナメル芽細胞マーカーであるSox21は、成熟エナメル芽細胞から終末エナメル芽細胞への分化誘導へ関与していた。

そのため、Sox21の発現が消失する事により、成熟エナメル芽細胞の細胞極性が消失し、その結果、エナメル小柱形成が阻害され、エナメル小柱の結晶構造異常及び石灰化不全をきたすことにより、エナメル質形成不全になることが判明した。

また、エナメル芽細胞におけるSox21の発現はShhによって調節されていた。

研究成果の概要(英文)： Sox21 which is a novel mature ameloblast marker was related to the differentiation to terminal ameloblasts from mature ameloblasts. Therefore, The cell polarity of a mature ameloblast disappears by absence of Sox21. For this reason, since a formation of an enamel rod is impeded, the abnormalities in a crystal structure and hypomineralization of an enamel rod are triggered. Finally, The defect of Sox21 causes an amelogenesis imperfecta. Moreover, the expression of Sox21 in an ameloblast was regulated by Shh.

研究分野：小児歯科

キーワード：エナメル芽細胞

1. 研究開始当初の背景

エナメル質形成不全の原因には先天性や後天的因子がある。近年、臼歯-切歯石灰化不全(Molar・Incisor・Hypomineralisation; MIH) が問題となっている。発生率地域によって異なるが、2.8%から25%の間であり、小児歯科医師にとって出会う機会の多い疾患である。特徴として正常歯に比べ4倍程度齲蝕感受性が高いため、適切な齲蝕予防処置が重要となる。しかし、本疾患に関する研究が行われているが、その原因はまだ明らかとなっていない。そこで今回、新たにエナメル質形成の関係遺伝子を探る事によってエナメル質分化の仕組みを解明する基礎的研究と、これら分子を応用した遺伝子診断マーカーやエナメル質形成の臨床応用を考える。

2. 研究の目的

マウス前歯は人間の歯と異なり、エナメル質が唇側にのみ存在する。また、マウス前歯は常に成長しており、切端部では成熟した細胞がほとんどである反面、根尖部では未分化な細胞が多く、幹細胞が存在する。そこで、唇側根尖部の細胞を回収し、発現している遺伝子のスクリーニングを行い、エナメル質形成に関与する新たな分子を模索した。

まず最初に、マイクロアレイ法を用いる事によって、マウス切歯の唇側で発現している分子が、数十種類発見された。その内、**SRY-related HMG box gene 21 (Sox21K0)** 唇側部のエナメル芽細胞に限局して強く発現しており、エナメル質形成に関与していると推測された。そこで今回、Sox21 欠損マウスを用いて Sox21 による歯に対する影響を検討することにした。

3. 研究の方法

(1) Sox21K0 マウスの歯の形態解析：

ヘマトキシリン・エオシン染色や走査型電子顕微鏡(SEM)・マイクロCTによる観察を行い、Sox21K0 マウスにおける歯の形態や構造を調べ、正常マウスとの相違点を調べ、歯における表現系を探る。

(2) Sox21 調節遺伝子の解析：

Sox21 を調節している候補分子を絞り込み、候補タンパクをエナメル芽細胞に加えて培養を行い、Sox21 発現を調べることにより、上流分子を検討する。

(3) Sox21 により調節される遺伝子の解析：

マイクロアレイ法にて Sox21 と関連する分子をスクリーニングする。その後、PCRにてこれら候補分子を絞り込み、Sox21 により影響を受ける分子について検討を行う。

(4) 歯における Sox21 の機能の解析：

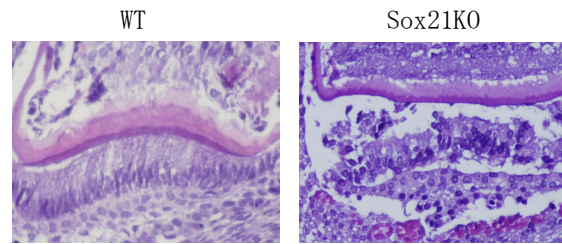
実験 3)の結果より、細胞増殖・接着・アポトーシスなどに関連する遺伝子が抽出された場合、Sox21 がこれら細胞の機能に影響を与えているのかを検討する。

4. 研究成果

(1) Sox21K0 マウスの歯の形態解析：

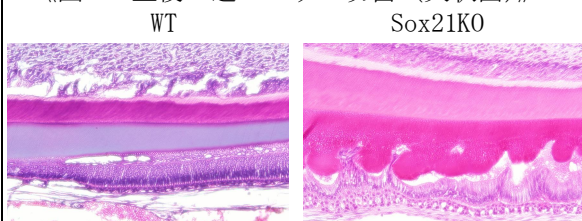
生後2日目の Sox21K0 マウスの歯胚をヘマトキシリン・エオシン染色したところ、未分化エナメル芽細胞では野生型(WT)と非常に類似しており、エナメル芽細胞分化の初期への影響はほとんど見られなかった。しかし、細胞分化が進んだ終末エナメル芽細胞では WT マウスは規則正しく一列に配置されているのに対して、Sox21K0 マウスでは細胞極性が失われ、エナメル質形成に異常が見られることが判明した(図1)。

《図1: 生後2日 マウス切歯(冠状面)》



次に成長の進んだ生後6週目のマウスにおける成熟エナメル芽細胞の形態についてもヘマトキシリン・エオシン染色にて組織学的検討を行った。WTでは細胞極性を有し、規則正しく配置しており、エナメル質も滑らかで厚みのある形態であるのに対し、Sox21K0 マウスではエナメル芽細胞が不規則になり、細胞極性を失った細胞が波状に配列していた。そのため、エナメル質も同様に波状に形成されていた(図2)

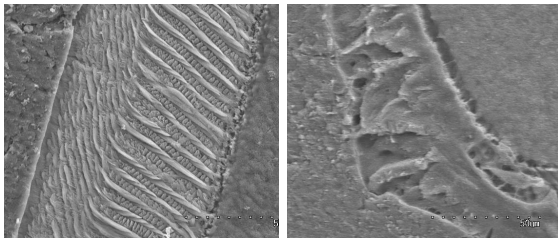
《図2: 生後6週 マウス切歯(矢状面)》



そこで、生後6週目の歯を走査型電子顕微鏡にて観察したところ、WT マウスではエナメル質表面が滑らかであるのに対し、Sox21K0 マウスではエナメル質の表面が多孔性構造となっていた。この結果は図2で示した様に、生後6週目のマウスにおけるヘマトキシリン・エオシン染色によるエナメル質の形態と一致していた。

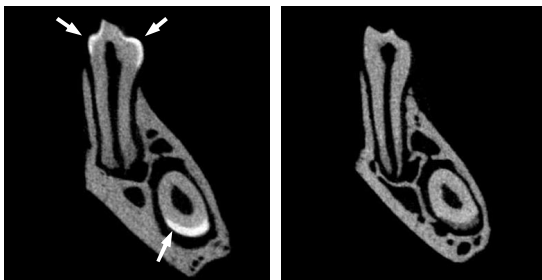
更に、リン酸処理を行った断面を観察したところ、野生型では規則的なエナメル小柱構造が確認できるにもかかわらず、Sox21K0 マウスではエナメルが薄く、更にエナメル小柱構造が失われていることが分かった(図3)。

《図 3: 生後 6 週 マウス臼歯断面》
WT Sox21KO



更にマイクロ CTにて生後 6 週目の歯を撮影したところ、WT では臼歯部及び切歯に高石灰化したエナメル質(図 4: 白矢印)が観察されるのに対し、Sox21KO では臼歯、切歯共に白色部は見られず、高石灰であるエナメル質が観察されなかった。そこで、信号強度を元に石灰化度を評価したところ、象牙質の石灰化にはほとんど差が見られなかったのに対して、エナメル質の石灰化度は約 1/10 に減少していることが判明した。

《図 4: 生後 6 週 マウス下顎骨》
WT Sox21KO



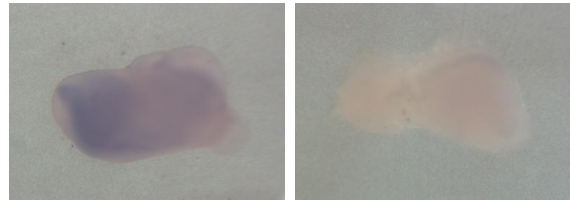
以上のことから、Sox21KO マウスではエナメル質形成不全が見られた。その原因はエナメル芽細胞の細胞極性が失われる事により、エナメル芽細胞の配列が乱れ、そのため、規則的なエナメル質形成が阻害される事によって、不規則な結晶構造が形成され、石灰化度が低下したのではないかと考えられた。そこで、Sox21 欠損によるエナメル質形成不全の原因メカニズムについて更に検討することにした。

(2) Sox21 調節遺伝子の解析:

Sox21 が成熟エナメル芽細胞マーカーであるのに対し、前エナメル芽細胞マーカーとしてソニックヘッジホッグ(Shh)が知られている。切歯における Shh と Sox21 の発現分布を検討したところ、高分化領域では Sox21 が発現し、未分化領域では Shh が発現していたが、その発現領域は重複している部位が存在した。そこで、Shh が Sox21 の発現を調節している可能性があると考え、マウス切歯に Shh の阻害剤であるシクロパミンを加え、器官培養を行った。48 時間後に切歯を回収し、Sox21 のプローブを作成し、Whole mount In situ

にて Sox21 の発現を検討した。その結果、Sox21 の発現が明らかに減少する事が判明した(図 5)。

《図 5: マウス切歯のシクロパミン培養》
非添加群 添加群



更に RT-PCR 法を用いて Sox21 の発現を検討した。、そこ結果、マウスエナメル芽細胞にシクロパミンを加えた場合では Sox21 発現が減少し、Shh タンパクを加えた場合では Sox21 発現が上昇した。以上の結果から、Sox21 の発現は Shh により調節されていると考えられる。

(3) Sox21 により調節される遺伝子の解析:

次に Sox21 の下流分子を検討することにした。まず、WT マウス及び Sox21KO マウスからエナメル芽細胞を回収し、マイクロアレイ法にて発現量に差がある分子を調べた。これらの候補分子に対して、特異的プライマーを作成し、RT-PCR 法にて候補分子の絞り込みを行った。その結果、アメロチンやカリクレイン 4 の発現減少が認められた。これら分子は終末エナメル芽細胞マーカーとして知られている。それに対し、成熟エナメル芽細胞マーカーであるエナメリンやアメロジェニンには発現量の変化が見られなかった。この結果から、Sox21 が欠損する事により、成熟エナメル芽細胞から終末エナメル芽細胞への分化が抑制されている可能性が示された。

(4) 歯における Sox21 の機能の解析:

次に Sox21 が、アメロチンやカリクレイン 4 の発現を調節していることが判明したが、直接的に調節しているかどうかは不明である。そこで、Sox21 発現ベクターを作成し、ラット歯原性上皮細胞株である sf2 細胞へトランスフェクションを行った。この Sox21 強制発現細胞株を元にクロマチン免疫沈降法(Chip 法)を行い、Sox21 特異的に結合している遺伝子を回収し、次世代シーケンシングを行うことによって、Sox21 結合分子の特定を行った。その結果、LOC100363098, Trnag-ccc, Trnak-cuu, Sertad4, Ctnnb11, Trnae-cuc, Trnag-ucc, Trnad-guc, Trnal-cag, Trnag-gcc, Npas4, Ctnna2, LOC679989, Cdh13, Vgf, Ap1s1, LOC362665 (Camta1), Phf21b, LOC681069 など、約 40 種類の候補遺伝子が見つかった。

そこで Sox21 強制発現細胞株と対象株との間でこれら分子の発現量の変化を

real-time-PCRにて検討を行った。その結果、一つの分子が Sox21 強制発現細胞で発現上昇が見られた。また、この分子の発現を Sox21KO マウスのエナメル芽細胞で検討した結果、マイクロアレイではこの分子は発現量が3割へと減少しており、real-time-PCRでも4割程度に減少していた。次に sf2 細胞に Sox21 の siRNA を使用して Sox21 の発現を抑制し、Sox21 と結合する候補分子の発現量を検討した。その結果、Sox21 過剰発現で増加した分子が Sox21 抑制により、発現減少する事が判明した。このことから、Sox21 が直接的にこの分子の発現量を変化させている可能性が示唆された。

次にこの分子の siRNA を使用して、sf2 細胞における発現を抑制したところ、アメロチンやカリクレイン4の発現減少が認められた。

以上の結果をまとめると、成熟エナメル芽細胞マーカーである Sox21 は Shh により調節され、成熟エナメル芽細胞から終末エナメル芽細胞への分化阻害及びエナメル芽細胞の細胞極性を消失させることにより、エナメル小柱形成を阻害し、結晶構造異常をきたすことにより、エナメル質形成不全になることが判明した。

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 2 件)

- ① Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Yuasa K, Yoshizaki K, Iwamoto T, Saito M, Nakamura T, Fukumoto S.
Interaction between Fibronectin and β 1 Integrin is Essential for Tooth Development.
Plos One. 10(4):e0121667. 2015 査読有
- ② Fukumoto S, Nakamura T, Yamada A, Arakaki M, Saito K, Xu J, Fukumoto E, Yamada Y.
New insights into the functions of enamel matrices in calcified tissues.
Japanese Dental Science Review. 50(2):47-54, 2014 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 齋藤 幹, 福本 敏
Sox21 による歯と骨格形成への影響
第 56 回歯科基礎医学会学術大会 福岡国際会議場(福岡) 2014 年 9 月 25 日-27 日
- ② 齋藤 幹, 福本 敏
歯の発生過程における転写因子 Sox ファミリーの役割

第 64 回東北大学歯学会 東北大学(仙台)2013 年 12 月 13 日

- ③ Kan Saito, Emma Juuri, Frederic Michon, Satoshi Fukumoto
Sox21 regulates ameloblast terminal differentiation. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, La Londe Les Maures (France) May 26-31, 2013
- ④ 齋藤 幹, 山田 亜矢, 中村 卓史, 福本 敏
新規エナメル芽細胞マーカー Sox21 による歯胚分化に対する影響
第 51 回日本小児歯科学会 長良川国際会議場(岐阜) 2013 年 5 月 23-24 日
- ⑤ 齋藤 幹, 福本 敏
歯の発生過程における転写因子 Sox ファミリーの役割
第 11 回口腔医科学フロンティア学術集会 宮崎県宮崎市宮崎パームビーチホテル(宮崎) 2013 年 3 月 2 日
- ⑥ 齋藤 幹, 釜崎 陽子, 日高 聖, 藤原 卓
乳歯の残存期間に関する調査研究
第 50 回日本小児歯科学会 東京国際フォーラム(東京) 2012 年 5 月 12-13 日

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
齋藤 幹 (SAITO, Kan)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 40380852