

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861747

研究課題名(和文)Thymosin beta 4遺伝子導入による歯原性上皮細胞の作製

研究課題名(英文)Generation of the odontogenic epithelial cell by Thymosin beta 4 gene introduction

## 研究代表者

藤原 弘明 (Fujiwara, Hiroaki)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50634200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯の再生にはエナメル質を作る歯原性上皮細胞と象牙質や歯髄などを作る歯原性間葉細胞が必須である。しかし、歯原性上皮細胞の作製報告は殆どみられない。そこで本研究では、Thymosin beta 4 (TMSB4X) の遺伝子導入で歯原性上皮細胞の作製およびそのメカニズムを解明することを目的とした。その結果、TMSB4Xをヒト角化細胞に導入したところ、エナメル質様硬組織形成能およびエナメル基質蛋白の発現能を認める歯原性上皮細胞様に形質転換した。また、そのシグナル経路としてSmad、PI3K-Akt経路が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Odontogenic epithelial cells which product enamel, and odontogenic mesenchymal cells which product dentin or pulp are essential for tooth regeneration. However, the reports of the generation of odontogenic epithelial cells are hardly seen. Therefore, the aim of this study is to generate the odontogenic epithelium cells by using gene transfection of Thymosin beta 4 (TMSB4X) and to elucidate its mechanism. As a result, after TMSB4X transfection into human keratinocytes, the cell were transformed into odontogenic epithelium-like cells which had ability to form the enamel-like calcified material and express enamel-related protein. In addition, Smad and PI3K-Akt signaling pathways were suggested as this signaling pathway.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯の再生 シグナル伝達 Thymosin beta 4 Runx2

### 1. 研究開始当初の背景

当研究室では、歯の発生初期に特異的に発現する遺伝子の同定を行い、そのいくつかについては、歯胚の発生・発育に緊密な関連があることを示してきた(Yamaza et al., 2001; Wada et al., 2002; Akhter et al., 2005; Xie et al., 2007; Honda et al., 2008; Xie et al., 2009; Akhter et al., 2010; Takahashi et al., 2010; Honda et al., 2011; Ookuma et al., 2012)。その中の1つの因子である Thymosin beta 4, X-linked (以下 TMSB4X) は、(1) 歯胚の発生初期に上皮細胞に強い発現を示した(Akhter et al., 2005)、(2) 機能を阻害すると、器官培養したマウス胎生 11.0 日の下顎の歯胚形成が阻害された(Ookuma et al., 2012)、(3) 歯の発生や発育に関連した Runt-related transcription factor 2 (Runx2) や種々の歯原性因子の発現抑制がみられた(Ookuma et al., 2012)、などからこの遺伝子が歯胚の発生・発育に中心的な役割を果たしているのではないかと、という仮説を立てた。近年、この TMSB4X の強制発現によりシグナル伝達の下流因子が惹起され、細胞を直接的に形質変換させることができたことと報告された(Smart et al., 2011)。この報告により、TMSB4X が未分化な幹細胞の状態を経ずに細胞の形質を変化させる機能(Direct reprogramming)を有していることが示された。Direct reprogrammingとは、「ある種の細胞が幹細胞への変化を経ずに直接他の分化した細胞へ変化する現象」と定義され、数種類の遺伝子導入による線維芽細胞から機能的神経細胞への形質転換(Vierbuchen et al., 2010)や線維芽細胞から肝細胞に類似した細胞への形質転換(Sekiya et al., 2011)などの報告がある。

既に本課題申請者は、TMSB4X を導入したヒト表皮由来の角化上皮細胞(HaCaT 細胞)では Type II RUNX2 遺伝子の発現上昇が認められることを確認した。また石灰化誘導培地において培養すると、in vitro において細胞集簇を形成し、同部位に Alizarin-red と von Kossa 染色陽性の石灰化物の形成が認められ、RUNX2 の発現が免疫染色により確認された。以上の結果より TMSB4X 遺伝子導入により歯原性上皮細胞の作製の可能性を見出した。しかし、そのメカニズムは全く不明であり、臨床応用を行う上ではメカニズムの解

明も必要とされる。

### 2. 研究の目的

本申請課題の目的は、歯の再生に必須な歯原性上皮細胞の作製およびそのメカニズムの解明である。将来的には本申請課題により作製された細胞を利用した歯胚再生の臨床応用を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) TMSB4X 過剰発現株のヌードマウスへの移植における石灰化形成能の評価

申請者は既に TMSB4X を HaCaT 細胞に導入し、恒常性 TMSB4X 遺伝子過剰発現株を樹立している。この TMSB4X 過剰発現細胞を石灰化誘導培地含有コラーゲンゲルに混和し、ヌードマウスの背部皮下に移植した。予備実験段階において移植後 6 週目に Micro CT により石灰化物様の陰影を認めている。移植後 3、6 週間目のマウスを用いて以下の検索を行った。

Micro CT による石灰化物形成程度の評価を行った後、組織切片を作製した。まず Fluorescence in situ hybridization (FISH) により、この細胞がヒト由来の細胞であるか否かの検索をし、細胞塊がヒト由来であることを確認後、HE、Alizarin-red、von Kossa 染色をした。さらに amelogenin、ameloblastin、enamelin の免疫組織化学染色を行った。

in vitro での石灰化物の Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) を用いた元素解析を行い、石灰化物の主要構成元素とエナメル質との同定性を明らかにするために Ca/P を算出した。

#### (2) マイクロアレイ解析による TMSB4X に関連した因子の網羅的解析

TMSB4X 導入前後の HaCaT 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、以下の項目について検索を行った。

TMSB4X によりその発現が制御される因子を同定する。マイクロアレイ解析によって検出された結果に基づき、TMSB4X 過剰発現細胞株を用いて real-time PCR 法、western blotting 法を用いて TMSB4X によって制御されていると考えられ、かつ歯原性因子もしくはそれに関わりの深い因子の mRNA や蛋白の発現解析を行った。

網羅的解析により得られた結果を元に、マウス歯原性上皮細胞株 (mDE6 細胞) において TMSB4X により歯原性因子などの発現が制御されるシグナル伝達経路を real-time PCR 法や western blotting 法を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) TMSB4X 過剰発現 HaCaT 細胞における歯原性因子などの発現検索結果

TMSB4X を HaCaT 細胞に導入した群 (s-TMSB4X) では、野生群 (UT)、空ベクター群 (MOCK) と比較して歯原性上皮に発現がみられる因子 (CK14、PITX2) の有意な上昇を認めた。また、エナメル基質関連因子の mRNA および蛋白の発現レベルでは、AMELX、ENAM において UT、MOCK では発現が認められなかったが、s-TMSB4X では発現が認められるようになった。AMBN は s-TMSB4X に有意な発現上昇傾向が認められた。

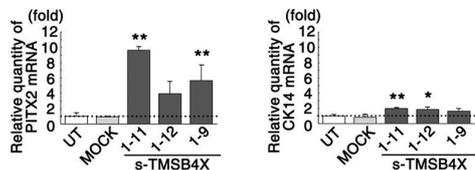


Fig. 1-1: pitx2、cytokeratin14 (CK14) の mRNA 発現解析結果。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  で vs UT。

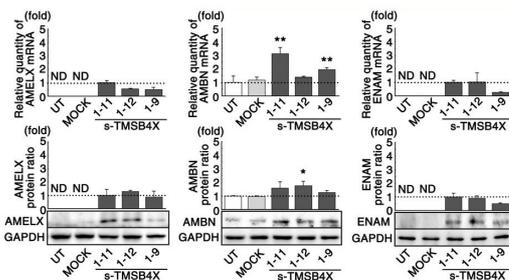


Fig. 1-2: エナメル基質関連因子 (amelogenin: AMELX、ameloblastin: AMBN、enamelin: ENAM) の mRNA、蛋白発現解析結果。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  で vs UT、ND: not detectable。

##### (2) in vitro における形成された石灰化物の評価

s-TMSB4X では UT および MOCK と比較して石灰化誘導培養後 3 週において石灰化物の形成が認められ、EDX を用いた元素解析の結果、石灰化物の主成分はカルシウム (Ca) とリン (P) であることが示され、その Ca/P の値よ

りハイドロキシアパタイトに近い成分であることが示唆された。

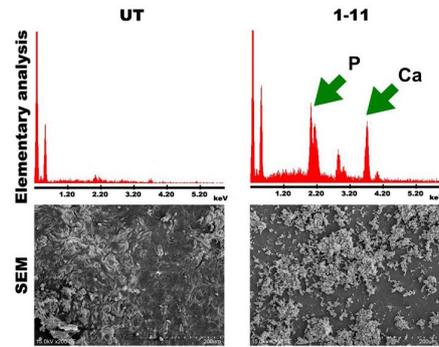


Fig. 2 in vitro での s-TMSB4X (1-11) と UT における石灰化物の元素解析結果。上段は元素解析結果、下段は SEM 像。矢印は各元素のピークを示す。

##### (3) 石灰化物における免疫組織化学染色

s-TMSB4X では UT および MOCK と比較してヌードマウス移植後 3 週において Alizarin-red および von Kossa 染色陽性の石灰化物の形成を認めた。さらにその石灰化物に対して amelogenin、ameloblastin、enamelin の免疫組織化学染色を行ったところ、陽性像を認めた。

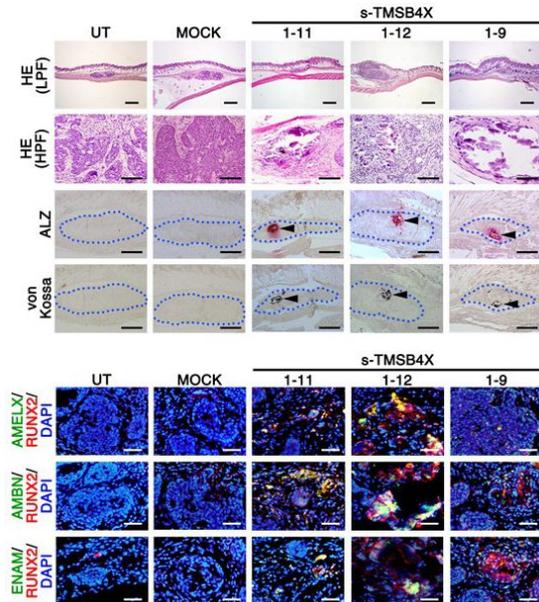


Fig. 3 UT、MOCK、s-TMSB4X 群をヌードマウスに移植し、3 週後に Alizarin-red (ALZ) および von Kossa 染色、Runx2 および amelogenin、ameloblastin、enamelin の各免疫組織化学二重染色を行った結果。青点線は移植した細胞の領域、矢尻は形成された石灰化物を示す。Scale bars: LPF; 1000  $\mu$ m、HPF; 100  $\mu$ m、ALZ, Kossa; 50  $\mu$ m、各種免疫

染色像; 100 μm

(4) マウス歯原性上皮細胞株 (mDE6 細胞) における TMSB4X-RUNX2 の経路検索結果

TMSB4X 導入前後の HaCaT 細胞を用いてマイクロアレイ解析から得られたデータをもとに mDE6 細胞を用いて TMSB4X-RUNX2 の経路の検索を行った。siRNA による TMSB4X 機能阻害下で、p-Smad1/5 および p-Akt のタンパク発現量が低下を認めた。また、p-ERK、β-catenin の蛋白発現量は有意な差を認めなかった。このことから TMSB4X-RUNX2 の経路として Smad および PI3K-Akt 経路が示唆された。

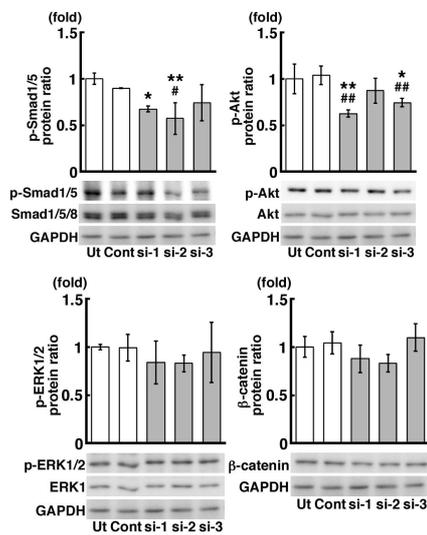


Fig. 4: mDE6 細胞における TMSB4X 機能阻害下での p-Smad、p-Akt、p-ERK、β-catenin の蛋白発現の結果。\*p<0.05、\*\*p<0.01 で vs Ut、#p<0.05、##p<0.01 で vs MOCK。

(5) 総括

TMSB4X をヒトケラチノサイトである HaCaT 細胞に導入することで、エナメル基質関連蛋白を分泌し、石灰可能を持つ細胞へと形質転換できたことが示唆された。これによって TMSB4X 遺伝子導入で歯原性上皮細胞の作製の可能性が示唆された。将来的にはヒト歯肉から採取した上皮細胞などを用いた臨床応用を目指したい。

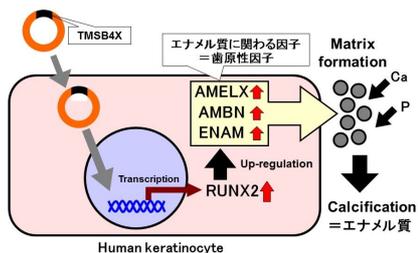


Fig. 5-1: TMSB4X 遺伝子導入による形質転換の概略図。

そしてそのシグナル経路として Smad、PI3K-Akt 経路が示唆された。このメカニズムの解明で本細胞の作製効率などに寄与できると考えられる。

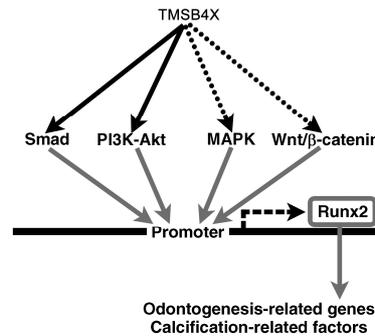


Fig. 5-2:本研究における TMSB4X から Runx2、エナメル基質関連因子等の発現経路の概略図。黒実線矢印は本研究で明らかにされた経路、黒丸破線矢印は本研究では変化を認めなかった経路、灰色実線矢印は他の研究で既に報告がみられた経路を示す。

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)

Someya H., Fujiwara H.\*, Nagata K., Wada H., Hasegawa K., Mikami Y., Jinno A., Sakai H., Koyano K. and Kiyoshima T.: Thymosin beta 4 is associated with RUNX2 expression via the Smad and Akt signaling pathways in mouse dental epithelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 35: 1169-1178 (2015) (\*: Corresponding author)

Kiyoshima T.\*, Fujiwara H.\*, Nagata K., Wada H., Ookuma YF., 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: 309-322 (2014) (\*: Equally contributed)

[学会発表](計3件)

藤原弘明、清島保、永田健吾、和田裕子、

坂井英隆：非歯原性上皮細胞への Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞への誘導. 第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月

**藤原弘明**、清島保、永田健吾、和田裕子、木原禎子、長谷川佳那、染矢祐孝、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 年 9 月

染矢祐孝、清島保、永田健吾、和田裕子、**藤原弘明**、木原禎子、長谷川佳那、古谷野潔、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 年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 弘明 (FUJIWARA Hiroaki)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号：50634200

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし