

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253092

研究課題名(和文) 上皮陥入組織における器官決定機構の解明と人為的誘導法の開発

研究課題名(英文) Regulation and determination of organ derived from invaginated epithelium

研究代表者

福本 敏 (FUKUMOTO, SATOSHI)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30264253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯や毛は上皮の陥入により形成が開始し、陥入した上皮細胞は、神経堤細胞由来の間葉組織と相互作用を示し、その結果、歯や毛が形成される。しかし、どのように形成される器官が決定するのか、その分子機構は明らかでない。我々は転写因子の1つであるSox21が、歯胚の上皮に発現すること、さらにSox21欠損マウスの切歯に、毛が生じることを発見した。ChipSeq解析からSox21はAnapc10の発現直接制御し、Sox21欠損ではAnapc10発現は減少し、Sox21の過剰発現においてはその発現が上昇することを見出した。すなわちSox21によるAnapc10の発現制御が、器官決定に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tooth and hair are formed by invagination of epithelium. Invaginated epithelium interacts with neural crest derived mesenchymal tissues, and then formed tooth and hair. However, mechanism of organ determination has never clearly understood. Sox21 is one of the transcription factor, and expressed in dental epithelium. Sox21 knockout mice showed hair formation in incisor indicating that Sox21 may be involved in the determination of organs. Decrease Sox21 inhibited ameloblast marker gene expression, and induced hair marker genes including keratins. ChipSeq analysis showed that Sox21 directly binds to Anapc10 gene promoter region and regulated their expression in dental epithelium. In Sox21 knockout mice, Anapc10 expression was decreased in tooth germ. Further, Sox21 over expression induced Anapc10 expression. These results suggested that Sox21 regulates Anapc10 expression and organ determination.

研究分野：小児歯科

キーワード：上皮陥入 器官形成 歯の再生

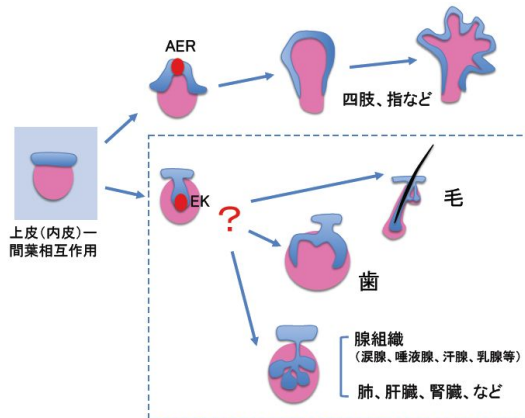
### 1. 研究開始当初の背景

小児歯科領域における歯科再生研究では、主に永久歯との交換に伴い脱落する乳歯歯髄を用いた方法が検討されている。歯髄細胞には 0.5-1.0%程度の割合で歯髄幹細胞が含まれることが知られており、この幹細胞は神経細胞、骨芽細胞、脂肪細胞等さまざまな細胞に分化することから、特に非侵襲的に採取できる乳歯由来歯髄幹細胞は、再生医療のための細胞ソースとして着目されている。また、この歯髄幹細胞には神経保護機能や免疫機能を調整する作用があることから、脊髄損傷や自己免疫疾患の治療への応用が期待されている。

我々は、この神経堤由来の間葉組織である歯髄幹細胞の人工誘導等の試みを行なうとともに、歯の発生に重要である歯原性上皮細胞の分化機構についての解析も進めてきた。歯原性上皮細胞は、口腔上皮の一部が肥厚し、陥入することで生じる上皮細胞で、1)内エナメル上皮、2)中間層細胞、3)星状網細胞、4)外エナメル上皮に分類され、この中で内エナメル上皮がエナメル質をつくるエナメル芽細胞に分化する。我々は iPS 細胞から、エナメル芽細胞の分化誘導に世界で初めて成功した (Arakaki M et al. *J Biol Chem* 2012)。また、最先端・次世代研究開発支援プログラムに採択され、この歯原性上皮細胞が、歯に形態異常を生じる疾患 (外胚葉異形成症や眼歯指異形成症等) で、どのように細胞の分化誘導が阻害され、歯胚のかたちづくりに影響しているかを明らかにした。これまでマウス胎児由来細胞を用いた歯の再生が試みられているが、我々の歯関連細胞の人工誘導の技術を持ってしても、一定の大きさの組織 (器官) を作製し歯の欠損部分に移植しても、血管系の再構築がなされなければ、組織が壊死をおこし生着することは無い。したがって、マウス等の小型動物 (歯胚の大きさが 1mm 程度) では歯の再生が可能であっても、大型動物の歯の再生は困難を極めることが予想される。

その一方で、口腔内の上皮細胞が陥入した際は、歯や唾液腺を生じるが、毛を生じることが無い。また逆に、皮膚において上皮細胞が陥入すれば、毛包や汗腺が形成されるが歯の形成は認めない。また内皮細胞の落ち込みにより、部位特異的に肺、肝臓、腎臓等が形成される。この細胞陥入の部位による器官決定機構が存在している為に、口腔内には毛は発生しないし、皮膚から歯が発生しないのではないかと考えた。この初期過程を制御できれば、口腔内に人工歯胚を移植しなくとも、上皮の陥入と、それに続く器官の運命決定機構の利用により、口腔内で一から歯胚を形成できるのではないかと考えた (逆に皮膚に人為的に毛包を

形成できる)。つまり、陥入上皮の運命決定 (下図) に関わる因子の同定が、器官形成および再生のために有効な知見になるだろうと考えた。



### 2. 研究の目的

我々はこの仮説を証明する為に、マウスの胎児および出生直後の皮膚と口腔粘膜より mRNA を抽出し、上皮陥入後の器官決定に関わる遺伝子の包括的なスクリーニングを行った。その結果、Sox21 が歯胚上皮に分化に伴って強く発現する一方で、毛の陥入部位には本分子が発現していないことを見いだした。また、Sox21 を欠損したマウスにおいては、切歯の歯肉部分より毛が生じていることを発見した。さらに米国国立衛生研究所との共同研究 (歯特異的遺伝子のスクリーニング) において、エナメル質形成不全症モデルマウスの解析において新規分子である X 因子の欠損マウスが Sox21 と同様に切歯歯肉より毛を生じることが明らかとなった (下図)。これらの結果から、歯の上皮細胞には毛への分化を抑制する Sox21 などの分子が発現しており、これらの分子の作用により陥入上皮が毛ではなく歯胚細胞に分化し歯を形成していることが予想された。国内外を含めても、器官発生に関わる抑制因子の同定に成功した報告は皆無である。



予備実験のデータとして、Sox21 欠損マウスでは、通常単層のエナメル芽細胞が、分泌したエナメル基質内に上皮が進入し、毛包状の組織を形成する。その結果、エナメル質の形成異常とともに、できたエナメル質には小さなピット (小さい穴) を生じ、

そこに毛が発生する。つまり、Sox21 はエナメル基質を分泌するエナメル芽細胞の一部において、毛への分化を抑制している分子であることが分かる。しかしながら、Sox21 の歯胚発生過程における発現や分子機能についてはこれまで全く報告されていない。

そこで本研究においては、1) 新たな分子機能として毛への分化抑制因子 (Sox21 と X 因子) の歯胚発生における役割を解明するとともに、これら分子の欠損マウスの表現系解析から、陥入上皮の器官決定 (歯になるのか毛になるのか) の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。さらにこれらの知見から、Sox21 あるいは X 因子の発現抑制が毛の発生を誘導できることから、2) Sox21 および X 因子の発現抑制薬の同定と、これらを用いた器官再生法の開発を行なう。さらに、歯-毛の器官決定のみならず、同様のスクリーニングから、3) 歯-唾液腺、歯-肺、腎臓等の器官決定機構を明らかにするための包括的な分子スクリーニングを行なう。我々の研究グループでは、iPS 細胞から歯原性上皮 (エナメル芽細胞) の分化誘導に成功していることから、上記の研究から得られた知見をもとに、iPS 細胞から毛の誘導、唾液腺、肺、腎臓等の細胞誘導を試みる。

### 3. 研究の方法

本研究では、器官決定因子 (歯-毛の決定) のうち、予備研究で得られた分子と新規にスクリーニングを行って得られる因子の分子機構を解明し、歯および毛の器官決定スイッチを自在にコントロールすることを目指す。その過程として、以下の研究を実施する。

#### (1) Sox21 および X 因子の歯胚発生における時空間的発現の解析と機能予測

これら分子の発現解析には、免疫染色、in situ hybridization 法を用いて行う。またこれらの因子が、歯や毛の発生にどのように関わっているかをより詳細に解明する為に、それぞれの器官発生に異常を示すモデル動物において、異常な器官発生過程で、これらの分子がどのように発現が変化するかを検討し、native な状態での機能を明確化する。例えば、歯のエナメル質形成においては、アメロプラスチン欠損マウスや、follistatin 欠損マウスあるいは過剰過剰発現マウスの歯胚における Sox21 遺伝子等の発現を検討する。

#### (2) Sox21 および X 因子により制御される結合因子、転写候補遺伝子の同定

結合因子や転写因子の同定に関しては、それぞれの分子にタグを結合した発現ベクターを構築し、本ベクターを歯原性細胞株に遺伝子導入する。その後、タグに対する抗体を用いた免疫沈降を用い、転写後に関わる因子の同定には ChIPSeq を、相互作用を示す因

子の同定には TOF-MS 解析を行う。

#### (3) 新規上皮器官決定因子の包括的な遺伝子スクリーニングとその機能解明

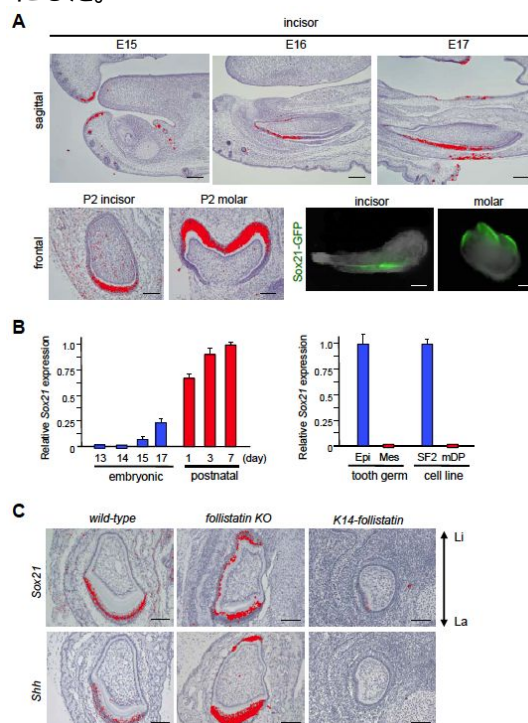
歯胚における上皮陥入時期 (マウスの胎生 11 日) における上皮細胞および間葉細胞組織より mRNA を抽出し、マイクロアレイ法や CAGE 法を用いた包括的な遺伝子スクリーニングにより、新たな候補分子の同定を行う。

#### (4) iPS 細胞を用いた器官構築技術の開発と器官誘導因子と類似作用を有する薬剤同定

Sox21 に関しては、その遺伝子発現を制御する薬剤の同定の為に、Sox21 プロモーターにレポーター遺伝子を結合し、もともと Sox21 発現が認められる歯原性上皮細胞においては、本ベクターを遺伝子導入し、FDA 承認の薬剤ブラーリーから、発現を抑制する薬剤の同定を行う。また、Sox21 発現の認められない皮膚線維芽細胞に本ベクターを遺伝子導入し、同様のスクリーニングから Sox21 を誘導する薬剤の同定を行う。

### 4. 研究成果

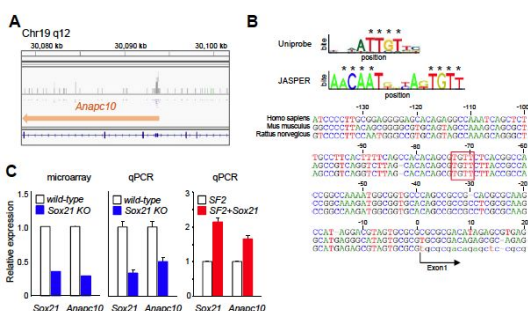
これまでの我々の研究から、Sox21 が上皮陥入組織において、歯か毛かの運命決定に関わることが示唆されたことから、まず Sox21 の歯胚発生段階における発現様式を明らかにした。



In situ hybridization による解析から、Sox21 はエナメル上皮に特異的に発現を示した (上図 A)。この発現は歯胚発生とともに上昇し (上図 B)、上皮に特異的な発現を示し、間葉には発現を示さなかった (上図 C)。通常、マウス切歯では、エナメル質は片側にしか形成されないが、Follistatin 欠損マウスでは、

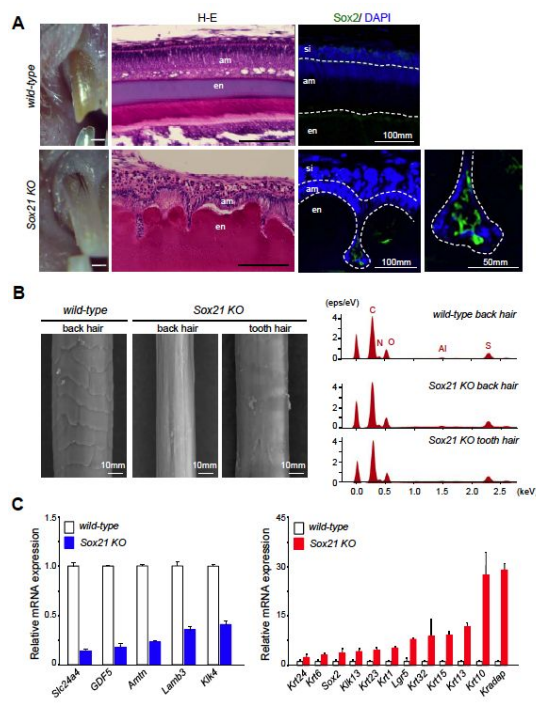
両側にエナメル質が形成され、逆に Follistatin 過剰発現マウスにおいては、エナメル質は全く形成されない。これらマウスにおいて、Sox21 はエナメル芽細胞に特異的な発現を示した。

次に、Sox21 欠損マウスにおいては、歯のエナメル質形成部位より毛が生じたことから、Sox21 は毛の発生に抑制的に作用していることが示唆された。また Sox21 は転写因子であるため、Sox21 によって転写される分子が、歯か毛かの運命決定に関与していると考え、Sox21 によって転写制御される分子を、ChipSep 法を用いてスクリーニングを行った。その結果、Sox21 は Anapc10 のプロモーター領域に結合することを見出した（下図 A）。



実際、Anapc10 のプロモーター領域には、Sox21 の結合配列が存在しており（下図 B） Sox 21 欠損マウスでは、Anapc10 の発現が減少していること、Sox21 の過剰発現により Anapc10 の発現が促進されることから、本分子は Sox21 によって発現制御される分子の 1 つであろうと考えた。

なぜ、Sox21 が欠損することで、歯より毛が生じるのかを明らかにする目的で、Sox21 欠損マウスより形成された毛に関して詳細に解析を進めた。



Sox21 欠損マウスにおいては、エナメル芽細胞より毛の上皮陥入が生じており（上図 A）

生じた毛に関して毛の皮膚の毛と表面構造も、成分構成も同一であった（左図 B）。また、Sox21 欠損によりエナメル芽細胞の分化マーカーの発現が著しく減少し、その反対に毛のマーカー分子の上昇が認められた。これらの遺伝子発現の制御に関して、前述の Anpc10 が関与していることを見出した。

包括的な遺伝子スクリーニングと、関連分子の遺伝子欠損マウスの解析から、歯から毛を生じる少なくとも 5 種類の分子の同定（Sox21 欠損マウスと同じ表現系を提示）に成功し、現在も解析を進めている。

## 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 9 件)

Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Saito K, Yamada A, Han X, Funada K, Fukumoto E, Haruyama N, Iwamoto T, Takahashi I, Fukumoto S.

Nephronectin plays critical roles in Sox2 expression and proliferation in dental epithelial stem cells via EGF-like repeat domains.

Sci Rep. 査読有, 7 巻: 45181. 2017 年  
doi: 10.1038/srep45181.

Ono M, Oshima M, Ogawa M, Sonoyama W, Hara ES, Oida Y, Shinkawa S, Nakajima R, Mine A, Hayano S, Fukumoto S, Kasugai S, Yamaguchi A, Tsuji T, Kuboki T.

Practical whole-tooth restoration utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a postnatal canine model.

Sci Rep. 査読有, 7 巻: 44522. 2017 年  
doi: 10.1038/srep44522.

Nakamura T, Jimenez-Rojo L, Koyama E, Pacifici M, de Vega S, Iwamoto M, Fukumoto S, Unda F, Yamada Y.

piprofin Regulates Enamel Formation and Tooth Morphogenesis by Controlling Epithelial-Mesenchymal Interactions During Tooth Development.

J Bone Miner Res. 査読有, 32 巻: 601-610. 2017 年  
doi: 10.1002/jbmr.3024.

Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Yamada A, Saito K, Ishikawa M, Xue H, Funada K, Haruyama N, Yamada Y, Fukumoto S, Takahashi I.

Plakophilin-1, a Novel Wnt signaling Regulator, Is Critical for Tooth Development and Ameloblast Differentiation.

PLoS One. 査読有, 11 巻:e0152206. 2016 年

doi: 10.1371/journal.pone.0152206.

Liu J, Saito K, Maruya Y, Nakamura T, Yamada A, Fukumoto E, Ishikawa M, Iwamoto T, Miyazaki K, Yoshizaki K, Ge L, Fukumoto S.

Mutant GDF5 enhances ameloblast differentiation via accelerated BMP2-induced Smad1/5/8 phosphorylation. *Sci Rep*. 査読有, 6 巻: 23670. 2016 年  
doi: 10.1038/srep23670.

Lu X, Fukumoto S, Yamada Y, Evans CA, Diekwisch TG, Luan X.

Ameloblastin, an Extracellular Matrix Protein, Affects Long Bone Growth and Mineralization. *J Bone Miner Res*. 査読有, 31 巻: 1235-46. 2016 年  
doi: 10.1002/jbmr.2788.

Ishikawa M, Williams GL, Ikeuchi T, Sakai K, Fukumoto S, Yamada Y.

Pannexin3 and connexin 43 modulate skeletal development through their distinct functions and expression patterns. *J Cell Sci*. 査読有, 129 巻: 1018-30. 2016 年  
doi: 10.1242/jcs.176883.

Yamada A, Futagi M, Fukumoto E, Saito K, Yoshizaki K, Ishikawa M, Arakaki M, Hino R, Sugawara Y, Ishikawa M, Naruse M, Miyazaki K, Nakamura T, Fukumoto S.

Connexin 43 Is Necessary for Salivary Gland Branching Morphogenesis and FGF10-induced ERK1/2 Phosphorylation. *J Biol Chem*. 査読有, 291 巻: 904-912. 2016 年  
doi: 10.1074/jbc.M115.674663.

Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Yuasa K, Yoshizaki K, Iwamoto T, Saito M, Nakamura T, Fukumoto S.

Interaction between fibronectin and  $\alpha 1$  integrin is essential for tooth development. *PLoS One*. 査読有, 10 巻:e0121667. 2015 年  
doi: 10.1371/journal.pone.0121667.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

保住 健太郎 (HOZUKI KENTARO)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 10453804

江草 宏 (EGUSA HIROSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 30264253

斉藤 正寛 (SAITO MASAHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 40215562

斉藤 幹 (SAITO KAN)

東北大学病院・講師

研究者番号: 40380852

阪井 丘芳 (SAKAI TAKAYOSHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 90379082