

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462794

研究課題名(和文) エナメル芽細胞分化を制御する微小環境変化と星状網血管との関係

研究課題名(英文) Relationship between blood vessels in stellate reticulum and microenvironmental change in ameloblasts differentiation

研究代表者

大津 圭史(Otsu, Keishi)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：60509066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、血管の走行にともなって変化する組織内酸素濃度がどのようにエナメル芽細胞分化を制御しているのかを明らかにすることである。トランスジェニックマウスやエナメル上皮細胞株を使った実験から、未分化なエナメル上皮細胞は分化したエナメル芽細胞にくらべより低酸素環境にあり解糖系優位のエネルギー代謝状態であること、さらに幹細胞マーカーの発現とRhoAの活性は酸素濃度依存性であることがわかった。これらの結果より、血管走行によって規定される組織内酸素濃度は、RhoAシグナルや細胞内エネルギー代謝の制御を介してエナメル芽細胞分化をコントロールしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify how the tissue oxygen concentration varying with the blood vessel distribution regulates ameloblasts differentiation. Experiments using transgenic mice and dental epithelial cell lines revealed that undifferentiated dental epithelial cells were under more hypoxic condition, and relied more on glycolysis to generate energy compared to differentiated ameloblasts. Further, RhoA activity and stem cell marker expression in dental epithelial cells depended on oxygen concentration. Together, these results demonstrated that tissue oxygen concentration controlled the dental epithelial cell differentiation through RhoA signaling and cellular energy metabolism.

研究分野：口腔組織・発生学

キーワード：歯 エナメル芽細胞 低酸素 Rhoシグナリング 血管新生

1. 研究開始当初の背景

歯の発生過程では帽状期になるとエナメル器の中に星状網細胞が現れ、さらに鐘状期後期になるとその周囲に血管が侵入してくる。これは一般的な上皮組織にはみられない特殊な現象である。その生物学的意義は、エナメル芽細胞への酸素・栄養供給や、エナメル質へのミネラル供給のためと考えられているが、その真偽は明らかでない。

申請者らはこれまで歯の発生におけるエナメル芽細胞分化メカニズムの解明に取り組んできた (2008 スタートアップ, 2010 若手 B, 2012 若手 B)。その中で、1)、Rho シグナルの活性化がエナメル芽細胞分化に必要であること (図 1)

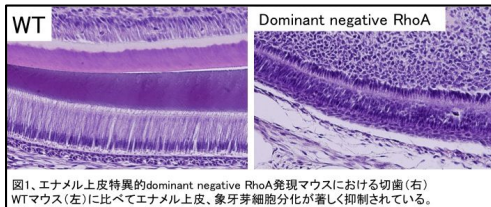


図1. エナメル上皮特異的 dominant negative RhoA 発現マウスにおける切歯 (右) WT マウス (左) に比べてエナメル上皮、象牙芽細胞分化が著しく抑制されている。

2) 逆に、Rho シグナルの不活性化は EMT (上皮間葉転換) を誘導しエナメル上皮細胞の分化に抑制的にはたらくこと、を報告し、Rho シグナリングがエナメル芽細胞分化のスイッチ因子であることを示した。(Otsu, J. Cell. Physiol., 2010, 2012 年歯科基礎医学会賞受賞)。しかし、この Rho シグナリングの上流の制御機構については不明である。

近年、HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) が間葉系幹細胞で Rho シグナルを制御していると報告された (Raheja, 2009)。HIF1 は低酸素環境で活性化し、下流の遺伝子発現を制御する転写因子である。我々の予備実験では、鐘状期前期臼歯における内エナメル上皮細胞や星状網細胞で HIF1 の強い発現が認められたことから (図 2)、これらの細胞が低酸素環境下にあることがわかった。

また、最近では心臓、肺、胎盤、骨、軟骨などの発生過程において、組織内局所の酸素濃度変化が細胞の分化・増殖の制御に関わっていることも明らかになっている (Dunwoodie, 2009)。しかしその詳

細な調節機構、歯胚発生における役割はいまだ不明である。

以上のことを総合的に考え申請者は、血管新生 (侵入) にともなう変化する組織内酸素濃度が、Rho シグナリングを介してエナメル芽細胞分化を制御しているのではないかと考えるに至った。

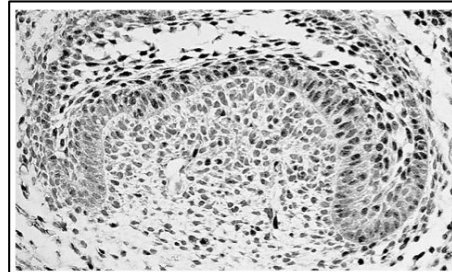


図2. 胎生18日マウス臼歯歯胚におけるHIF1αの発現内エナメル上皮細胞や星状網細胞で強い発現が認められる。

2. 研究の目的

今回の研究課題では、トランスジェニックマウスを使った組織解析、低酸素培養、シグナル伝達解析などを行い、血管新生にともなう酸素濃度変化応答システムが、エナメル芽細胞分化メカニズムとして機能していることを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 遺伝子改変マウス

(ア) ケラチン 14 プロモーターの支配下で Cre タンパクが発現するマウスと tdTomato 遺伝子上流に loxp で挟まれた Stop 配列が配置されたマウスを交配することで、エナメル上皮細胞特異的に tdTomato 蛍光が発するマウスを作製した。さらにこのマウスに血管内皮細胞マーカー FLK1 遺伝子に GFP を導入したマウス (FLK1-GFP マウス) をかけ合わせることでエナメル上皮細胞と血管を同時に蛍光標識で切るマウスを作製した。

(イ) Histone2B (H2B)-GFP-Tet-off マウスでは、ドキシサイクリン存在下で、分裂する細胞で GFP が消失する。したがって分裂のゆっくりな Slow cycling stem cell が GFP で識別できる。このマウスサンプルを新潟大学 大島勇人教授の教室から分与を受けた。

(ウ) マウスサンプルは固定、脱灰後、通

法に従い凍結またはパラフィン切片を作製し、H-E染色、免疫染色などをおこなった。

2. 組織透明化

マウスのサンプルを固定、脱灰処理後、透明化液 (Scaleview-A2 または CUBIC) に 1 週間浸漬し、組織透明化をおこなった。

3. 画像 3 次元構築

(ア) 遺伝子改変マウスの下顎臼歯の凍結連続切片を作製、画像撮影後、Photoshopにて歯胚の 3 次元構築をおこなった。

(イ) 透明化したマウス下顎をライトシート顕微鏡にて撮影し、付属のソフトにて 3 次元構築をおこなった。

4. 組織内酸素濃度検出

H2B-GFP マウスに低酸素プローブ (Hypoxyprobe) を腹腔内注射し、6 時間後組織を摘出、Hypoxyprobe 抗体を用いた免疫染色にて組織内低酸素部位を検出した。

5. 細胞培養

マウスエナメル上皮細胞株 (mHAT9d) を低酸素環境下 (5、10%) にて培養し、その後、免疫染色、qPCR をおこなった。

4. 研究成果

1. エナメル上皮細胞-tdTomato/血管内皮-GFP レポーターマウスの作製と歯胚 3 次元画像構築

ケラチン 14 プロモーター支配下で tdTomato 蛍光を発現するマウスと血管内皮細胞マーカー-FLK1 遺伝子座に GFP を導入したマウスを掛け合わせ、エナメル上皮細胞を赤色蛍光、血管を緑色蛍光で識別できる遺伝子改変レポーターマウスを作製した。作製したマウスは胎仔、新生仔において蛍光ランプにてジェノタイピング可能であり、成獣でも蛍光の発現が持続することが確認された。胎仔、新生仔の頭蓋部を固定、脱灰処理後、凍結切片、パラフィン切片を作製し、組織標本中でも tdTomato, GFP の蛍光が保たれていることを確認した。胎生 17 日のマウス臼歯の凍結連続切片を作製、撮影し画像処理ソフトにて 3 次元構築した。また、別の方法として透明化液 (Scaleview-A2 または Cubic) に浸漬し、顎顔面部を透明化したサンプルをライトシート顕微鏡にて撮影し、3 次元画像構築した。

これらの新規技術より、歯胚とその周囲、内部の血管の走行詳細を 3 次元的に可視化することに成功した。

これらの画像を詳細に調べたところ、分化したエナメル芽細胞にくらべ、エナメル上皮幹細胞が存在する上皮部位と血管の距離がより離れていることから、エナメル上皮幹細胞が相対的に低酸素環境下で維持されていることが考えられた。

2. 歯胚細胞における低酸素部位の検出

組織低酸素部位検出試薬 (Hypoxyprobe) を用いて歯胚発生における詳細な低酸素部位の特定をおこなった。その結果、星状網内に血管が侵入したのちには、エナメル芽細胞近傍での組織内酸素濃度が上昇していることがわかった。また、H2B-GFP マウスを用いて、切歯形成端星状網に存在するエナメル上皮幹細胞の局在と低酸素部位、HIF1 の発現について検討した。その結果、エナメル上皮幹細胞が低酸素状態で維持されている可能性が示唆された。

3. 酸素濃度における RhoA シグナルを介したエナメル上皮幹細胞制御と代謝特性。

酸素濃度におけるエナメル上皮幹細胞制御機構を明らかにするために、マウスエナメル上皮細胞株 (mHAT9d cell) を低酸素環境下で培養し、RhoA の活性、EMT 関連タンパク、遺伝子の発現を解析した。その結果、低酸素環境下では、RhoA の活性化と幹細胞マーカー、上皮細胞マーカーの上昇、間葉系マーカーの減少が確認された。また、高酸素環境下でのエネルギー代謝経路である酸化的リン酸化のマーカーの発現を分泌期エナメル芽細胞とエナメル上皮幹細胞で組織学的に比較したところ、エナメル上皮幹細胞にくらべ分泌期エナメル芽細胞でそれらの発現がより強いことから、エナメル上皮幹細胞は解糖系優位、分泌期エナメル芽細胞のは酸化的リン酸化優位のエネルギー代謝状態になっていることがわかった。以上の結果から、血管走行によって規定される組織内酸素濃度は、RhoA シグナルを介した EMT や細胞内エネルギー代謝の制御を介してエナメル上皮幹細胞維持、分化をコントロールしていると考えられた。

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 9件)

1. Hertwig's epithelial root sheath cells contribute to formation of periodontal ligament through epithelial-mesenchymal transition by TGF-
Satoshi Itaya, Kyoko Oka, Kayoko Ogata, Shougo Tamura, Michiko Kira-Tatsuoka, Naoki Fujiwara, Keishi Otsu, Eichi Tsuruga, Masao Ozaki, and Hidemitsu Harada, Biomedical Research 38(1) 61-69 2017
2. The Semaphorin 4D-RhoA-Akt signal cascade regulates enamel matrix secretion in coordination with cell polarization during ameloblast differentiation
Keishi Otsu, Hiroko Ida-Yonemochi, Naoki Fujiwara, Hidemitsu Harada, Journal of Bone and Mineral Research 31(11) 1943-1954 2016
3. Hertwig 上皮鞘の特性と発達に関わる因子
藤原尚樹、熊上深香、大津圭史、原田英光
岩手医科大学歯学雑誌 41(1) 1-9 2016
4. The glycogen metabolism via Akt signalling is important for the secretion of enamel matrix in tooth development
Ida-Yonemochi H., Otsu K., Ohshima H., Harada H., Mechanisms of Development 139 18-30 2016
5. Sox2 contributes to tooth development via WNT signaling
Lee MJ, Kim EJ, Otsu K, Harada H, Jung HS Cell & Tissue Research 365 77-84 2016
6. Rho GTPases in ameloblast differentiation
Otsu K.*, Hidemitsu Harada (*corresponding author), Japanese Dental Science Review 52(2) 32-40 2016
7. CXCR4/CXCL12 signaling impacts enamel progenitor cell proliferation and motility in the dental stem cell niche

Yokohama-Tamaki T, Otsu K, Harada H, Shibata S, Obara N, Irie K, Taniguchi A, Nagasawa T, Aoki K, Caliari SR, Weisgerber DW, Harley BA, Cell and Tissue Research 362(3) 633-642 2015

8. Live imaging to elucidate cell dynamics in tooth organogenesis and regeneration.
Harada H, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Otsu K, J Oral Biosci 57(2) 65-68 2015

9. Regulatory mechanisms of Hertwig's epithelial root sheath formation and anomaly correlated with root length.
Kumakami-Sakano M, Otsu K, Fujiwara N, Harada H, Experimental Cell Research 325(2) 78-82 2014

[学会発表](計 17件)

1. エネルギー代謝を介したエナメル芽細胞分化制御機構
大津圭史 第122回 日本解剖学会総会・全国学術大会 「長崎大学 (長崎県・長崎市)」 2017年3月30日
2. エナメル芽細胞分化過程における AMP-activated protein kinase (AMPK)の発現と機能
依田浩子、大津圭史、原田英光、大島勇人 第122回 日本解剖学会総会・全国学術大会 「長崎大学 (長崎県・長崎市)」 2017年3月30日
3. 細胞特異的蛍光タンパク発現マウスと組織透明化を用いた組織3次元イメージング解析
高橋颯、大津圭史、藤原尚樹、原田英光 岩手医科大学歯学会第42回総会 「岩手医科大学 (岩手県・盛岡市)」 2016年12月3日
4. Semaphorin 4D-RhoA-Akt シグナルはエナメル芽細胞分化において amelogenin 分泌と細胞極性を協調的に制御する

大津圭史、依田浩子、藤原尚樹、原田英光 第58回歯科基礎医学会学術大会「札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）」2016年8月25日

5. The Semaphorin 4D-RhoA-Akt signal cascade regulates enamel matrix secretion in coordination with cell polarization during ameloblast differentiation
Keishi Otsu, Hiroko Ida-Yonemochi, Naoki Fujiwara, Hidemitsu Harada. The Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD) 2016「Helsinki（Finland）」2016年6月13日

6. 上皮間葉相互作用の視点から考える新たな歯根形成メカニズム
大津圭史 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会「ビッグパレットふくしま（福島県・郡山市）」2016年3月30日

7. 遺伝学的細胞運命マッピングと透明化技術を用いた歯胚3次元イメージング解析
高橋 颯、大津圭史、藤原尚樹、原田英光 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会「ビッグパレットふくしま（福島県・郡山市）」2016年3月28日

8. Akt シグナルがグルコース代謝を促進しエナメル芽細胞分化を誘導する
依田浩子、大津圭史、大島勇人、原田英光 第38回日本分子生物学会「神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）」2015年12月1日

9. Regulation of stemness of dental epithelial stem cells by Rho-YAP signaling
Keishi Otsu, Yusuke Oku, Naoyuki Nishiya, Naoki Fujiwara, Hidemitsu Harada 第57回歯科基礎医学会学術大会「朱鷺メッセ（新潟県・新潟市）」2015年9月12日

10. イメージングから考える歯の形態形成機構の新規視点

原田英光、熊上深香、大津圭史、藤原尚樹 第57回歯科基礎医学会学術大会「朱鷺メッセ（新潟県・新潟市）」2015年9月11日

11. Regulation of stemness of dental epithelial stem cells by Rho signaling
Keishi Otsu, Yusuke Oku, Naoyuki Nishiya, Naoki Fujiwara, Hidemitsu Harada
ISSCR 2015 Annual Meeting「Stockholm（Sweden）」2015年6月25日

12. Regulation of dental epithelial cell differentiation by Rho signaling
Keishi Otsu, Hiroko Ida-Yonemochi, Mika Kumakami-Sakano, Naoki Fujiwara, Hidemitsu Harada. The 4th Tripartite Conference on Tooth and Bone「成田ビューホテル（千葉県・成田市）」2015年6月14日

13. Role of Semaphorin-Rho signaling in ameloblast differentiation
大津圭史 第120回「神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）」日本解剖学会総会・全国学術総会 2015年3月21日

14. Role of Semaphorin-Rho signaling in ameloblasts differentiation.
Otsu K. The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program for FY 2014「Seoul（Korea）」2014年11月10日

15. Semaphorin 4D - Rho A シグナルによるエナメル芽細胞分化制御
大津圭史、熊上-坂野 深香、増田智幸、藤原尚樹、原田英光 第56回 歯科基礎医学会学術大会・総会「福岡国際会議場（福岡県・福岡市）」2014年9月24日

16. マウス臼歯歯根成長における Rho signaling の役割
藤原尚樹、熊上深香、大津圭史、原田英光

日本解剖学会 第60回東北・北海道連合支部学術集会「プラザおでって(岩手県・盛岡市)」2014年9月6日

17. Role of Semaphorin-Rho signaling in ameloblast differentiation
Otsu K., Sahara Y., Harada H. EMBO|EMBL Symposium: Epithelia「Heidelberg (Germany)」2014年8月27日

〔図書〕(計 4件)

1. 修復象牙質-歯髄の痛みと歯髄の治癒の新しい関係

原田英光、大津圭史、藤原尚樹 日本歯科評論 76(4) 152-156 2016年4月

2. 歯の発生-歯堤と呼ばれる歯の幹細胞集団

原田英光、大津圭史、藤原尚樹 日本歯科評論 76(1)(879) 145-150 2016年1月

3. 顎堤の吸収-歯と骨の切っても切れない関係とは

原田英光、大津圭史、藤原尚樹 日本歯科評論 76(2)(880) 145-149 2016年

4. 遺伝子医学MOOK別冊 細胞の3次元組織化-その最先端技術と材料技術(p333-337)

原田英光、大津圭史、藤原尚樹
株式会社 メディカルドゥ 2014年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://oralhist.iwate-med.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大津 圭史 (OTSU, Keishi)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号：60509066

(2)研究分担者

藤原 尚樹 (FUJIWARA, Naoki)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：20190100

熊上坂野 深香 (KUMAKAMI-SAKANO, Mika)
岩手医科大学・歯学部・研究員
研究者番号：30710826