

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2019

課題番号：26861550

研究課題名(和文)HERS形成におけるRhoシグナリングの制御とPaxillinの相互作用の解明

研究課題名(英文)Clarification of the regulation of Rho signaling and the interaction of Paxillin in HERS formation

研究代表者

熊上 深香(坂野深香)(Kumakami, Mika)

岩手医科大学・歯学部・常任研究員

研究者番号：30710826

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): 歯根形成は、エナメル器のCervical loop(CL)に由来する細胞によってHertwig上皮鞘(HERS)が形成され開始する。我々は、細胞の走化性を制御するアダプター分子であるPaxillinが、外エナメル上皮(OEE)細胞の移動や増殖を制御し、HERSの形成や成長に関与しているのではないかと考えた。本研究では、Paxillinの活性化におけるRhoシグナリングの重要性とそれに伴うHERS細胞の走化性や細胞動態を観察した。その結果、HERS形成と維持にはRhoシグナルの活性化が重要であること、さらにmalassezの上皮遺残(ERM)形成に深く関わっていることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで歯根形成においてHERSからERMが形成されるメカニズムには、「アポトーシス」と「細胞の離脱」の二説があり結論が出ていなかった。我々が新規に開発したex vivoリアルタイムイメージングシステムは、HERS細胞動態をリアルタイムで観察することを可能にし、HERSから細胞が離脱してERMが形成される様子を実際に捉えることに成功した。このことはERM形成メカニズム論争に終止符を打つ決定的な証拠を提示した画期的成果である。また、ERMが歯根膜の恒常性を維持する働きがあることなどの新たな知見が得られ、これらは今後の歯根・歯周組織研究における新たな研究領域の創生に寄与すると期待できる。

研究成果の概要(英文): Tooth root formation is initiated by the formation of Hertwig's epithelial root sheath(HERS) by cells derived from the enamel organ Cervical loop(CL). We wondered that the adapter molecule Paxillin, which regulates chemotaxis of cells, may regulate the migration and proliferation of outer enamel epithelial (OEE) cells and may be involved in the formation and growth of HERS. In this study, we observed the importance of Rho signaling in activation of Paxillin and the associated chemotaxis and cell dynamics of HERS cells. As a result, it was revealed that activation of Rho signal is important for HERS formation and maintenance, and that it is deeply involved in the formation of epithelial remnant (ERM) of malassez.

研究分野：口腔組織・発生学

キーワード：歯の発生 ヘルトヴィッヒ上皮鞘 細胞遊走 歯根発生 細胞接着 HERS01a細胞株

1. 研究開始当初の背景

Spondylometaepiphyseal dysplasia (SMED) や Melnick-Needles syndrome(MNS)など体の成長や手指の成長が遅延するような全身的な骨格異常を伴う疾患では、歯根の成長が抑制され、短根歯が見られる。一方、Oculo-facio-cardio-dental (OFCD) syndrome では、眼疾患・顔面異常・心臓疾患にくわえ、歯根が長くなることが報告されている。しかし、これらの歯根形成異常の発症メカニズムについてはいまだ解明されていない。

歯根形成はエナメル器 CL の内エナメル上皮 (IEE) と外エナメル上皮 (OEE) 細胞から発生した HERS が歯乳頭細胞の増殖や分化を誘導することで始まる。HERS の発生や伸張が歯根象牙質の成長と深く関連していることから、我々は上記のような歯根の発生異常の病因解明には、HERS の発生や伸張のメカニズムを知る必要がある。

歯根発生に関わる細胞成長因子の研究では、FGF3 や FGF10、EGF の発現低下が HERS 形成開始の重要なシグナルであること、また IGF や HGF の発現が HERS の成長を促進することを明らかにした。(Fujiwara et al., 2005 ; Sakuraba et al., 2011) 。さらに申請者らは CL や HERS の細胞動態を観察するリアルタイムイメージングや DiI を用いた細胞追跡法によって、OEE 細胞が IEE 細胞よりも活発に増殖・伸張していること、この伸張する OEE や HERS にインテグリン裏打ちタンパクの一つである Paxillin が特に強く発現することを見いだした(Sakano et al., J.Perio.Res., 2013) (Fig.2)。以上のことから、HERS は主に外エナメル上皮細胞に由来しているという仮説を報告した。

Paxillin は focal adhesion kinase とともに接着班を構成し、インテグリンを介する細胞外マトリックスへの細胞接着機構と、それに伴う細胞内へのシグナル伝達機構に関わるアダプター分子であるが、近年、細胞の活発な移動や増殖にも関わることが報告されている(Sen et al., JCI., 2012)。

2. 研究の目的

歯根発生の開始時にエナメル器の Cervical loop(CL)に由来する細胞によって Hertwig 上皮鞘 (HERS) が形成される。HERS は歯根象牙質の形成を誘導することが知られているが、HERS 形成のメカニズムについては十分に理解されていない。我々は、細胞の走化性を制御する Paxillin が外エナメル上皮(OEE)やHERS細胞に強く発現することを見いだした。Paxillin は focal adhesion kinase とともに接着班を構成し、インテグリンを介する細胞外マトリックスへの細胞接着機構と、それに伴う細胞内へのシグナル伝達機構に関わるアダプター分子であるが、近年、細胞の活発な移動や増殖にも関わることが報告されている(Sen et al., JCI., 2012)。さらに HERS 形成開始期における RhoA の発現パターンを検証し、HERS 細胞に RhoA が強く発現することも示した。

また、Paxillin が活発に機能するためには Rho シグナリングの重要性を示唆した報告もある(Lim et al., J. Cell Biology 2008)。以上のことから、「Paxillin の発現調節と Rho シグナリングとの関係が細胞骨格制御と走化性の制御に重要である」と仮説を立てるに至った。我々は、Paxillin による OEE 細胞の移動や増殖の制御が HERS の形成や成長に関与しているのではないかと考え、Paxillin の活性化における Rho シグナリングの重要性とそれに伴う HERS 細胞の走化性や細胞動態を明らかにする。この研究の成果は、正常歯根形成メカニズムの解明のみならず、歯根形成異常の病因解明と治療法の開発につながると期待できる。

3. 研究の方法

(1) 歯根成長過程での HERS における Paxillin, Rho シグナルの関係を免疫組織学的に明らかにする。

(2) HERS における細胞増殖・移動を同時に観察できるリアルタイムイメージングシステムを確立する。上皮特異的 tdTomato 発現トランスジェニックマウスとそのマウスの HERS 細胞株の作製を作製して、細胞の動態をリアルタイムで観察する。

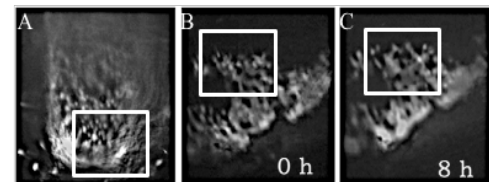
(3) HERS 細胞株における細胞遊走/細胞骨格制御へ Paxillin の役割並びに Rho シグナルの機能を明らかにする。Rho の活性化剤ならびに抑制剤を用いて HERS 細胞の遊走と Rho シグナル, Paxillin 分子の役割を明らかにする。

(4) Dominant-negative-RhoA マウスを作製して、Rho シグナルの機能抑制による HERS 形成に及ぼす影響を調べる。RhoA dominant negative form Tg マウスの HERS における Paxillin の発現パターンを組織化学的に明らかにする。

4. 研究成果

(1) HERS における Paxillin と Sema4D の発現。HERS には Paxillin が強く発現しており、同時に SemaphorinD (Sema4D)も発現していた。一方、HERS から遊走して離脱する細胞の Paxillin の発現は低下していた。HERS 細胞の上皮細胞としての維持と移動には Paxillin が深く関与していることが示唆された。

(2) HERS のイメージング法の確立と HERS 成長と Malassez 遺残上皮の発生機構の解明。CK14cre-TdTomato 発現マウスの歯根発生中の HERS をリアルタイムイメージング法によって観察した。Malassez 上皮は HERS の断裂によるものではなくて、細胞遊走によって作り出されていることを観察した。またその遊走には Contact inhibition of locomotion(CIL)が関わっていること推測された。



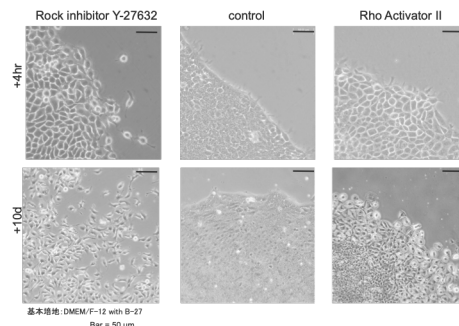
A. TdTomatoマウスを用いたHERSの成長とMalassez遺残上皮発生のイメージング。B, C. 時間経過とともにHERSの歯冠側の細胞は、HERSから離脱して歯根膜内へ遊走する像が観察できた。

(3) tdTomato 陽性 HERS 細胞と歯小囊細胞との相互作用による HERS 細胞の遊走と上皮間葉転換。

tdTomato 陽性の HERS 細胞と歯小囊細胞を共培養して HERS 細胞の遊走と上皮間葉転換を観察した。その結果、上皮コロニーの周辺部の細胞は歯小囊細胞の動きに合わせて遊走を開始した。その細胞は、tomato 陽性で E-cadherin 陰性、N-cadherin 陽性であった。以上からこの細胞の遊走には上皮間葉転換が関わっていると考えられた。

(4) HERS 形成における活性型 Rho シグナルの局在と Rho kinase の発現。

外エナメル上皮細胞から HERS に至る過程で Rho シグナルが活性化していることが明らかとなった。そこで、HERS 細胞株に Rho 活性化剤と抑制剤を加えて、Rho による HERS 細胞の動態を観察した。Rho の機能低下は細胞の遊走を促進し、一方機能亢進は上皮性を高めた。以上より、Rho シグナルによって HERS 細胞の遊走性がコントロールされていることが示された。

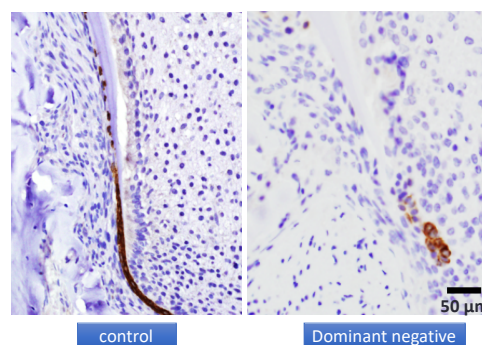


ROCK抑制剤を添加すると細胞の接着が緩み、辺縁の細胞は遊走し始める。一方、Rhoの活性化剤を添加すると細胞間接着は高まり、より上皮性が亢進した。

(5) Dominant-negative-RhoA マウスをいた Rho シグナルの機能抑制による HERS 形成に及ぼす影響。

Rho シグナルの活性化を低下させると HERS の伸張が抑制され、同時に歯根象牙質形成も抑制された。HERS 細胞の多くは上皮間葉転換によって消失したと考えられるが、今後さらなる検討が必要である。

これらの結果から、HERS 形成と維持には Rho シグナルの活性化が重要であることが示唆された。加えて Rho シグナルの低下は HERS の断裂と関連することが示唆され、malassez の上皮遺残形成に深く関わっていることも明らかとなった。



Dominant negative RhoA マウスではHERSの成長が抑制され、歯根が短くなった。同時に、malassezの遺残上皮も消失した。

(6) 成果のまとめ

上皮特異的 tdTomomato 発現マウスによる歯根形成の ex vivo リアルタイムイメージングの構築とその解析に成功し、歯根形成に関わる上皮細胞のダイナミクスを明らかにした。これまで歯根形成において HERS から Malassez の残存上皮が形成されるメカニズムには、「アポトーシス」と「細胞の離脱」の二説があり結論が出ていなかった。我々が新規に開発した ex vivo リアルタイムイメージングシステムは、HERS 細胞動態をリアルタイムで観察することを可能にし、HERS から細胞が離脱して ERM が形成される様子を実際に捉えることに成功した。このことは長年議論されてきた ERM 形成メカニズム論争に終止符を打つ決定的な証拠を提示した画期的成果である。さらに歯根形成における Rho シグナル関連分子の発現を免疫染色にて明らかにした。HERS 形成過程では、HERS 先端方向への HERS 細胞の遊走 (HERS 伸長) や HERS に生じる断裂の際に見られる上皮間葉転換 (EMT) に、Rho シグナリング/アクチン、さらには Paxillin の調節機構が重要な役割を果たしていることを見出した。

さらにこの成果の in vivo 検証実験として、HERS 細胞で Rho シグナリングが抑制されるトランスジェニックマウスの歯根を解析したところ、HERS の伸長の抑制とともに歯根象牙質の成長が抑制される。in vivo でも Rho シグナリングが HERS 形成・維持・成長に重要な役割を担っていることが示された。さらに、このマウスでは歯根膜内のマラッセの上皮遺残 (ERM) が消失し、歯根膜幅の減少や萎縮が生じることから、Rho シグナル が歯周組織の恒常性維持に対して必須の役割を担っていることも示唆された。Malassez の残存上皮が歯根膜の恒常性を維持する働きがあることなどの新たな知見が得られ、これらは今後の歯根・歯周組織研究における新たな研究領域の創生に寄与すると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoki Fujiwara, Ji-Won Lee, Mika Kumakami-Sakano, Keishi Otsu, Je-tae Woo, Sachiko Iseki, Masato Ota.	4. 巻 497(3)
2. 論文標題 Harmine promotes molar root development via SMAD1/5/8 phosphorylation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 924-929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤原尚樹、熊上深香、大津圭史、原田英光	4. 巻 41(1)
2. 論文標題 Hertwig上皮鞘の特性と発達に関わる因子	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 医大歯誌	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kumakami-Sakano M., Otsu K., Fujiwara N., Harada H.	4. 巻 325(2)
2. 論文標題 Regulatory mechanisms of Hertwig's epithelial root sheath formation and anomaly correlated with root length.	5. 発行年 2014年
3. 雑誌名 Exp. Cell Res	6. 最初と最後の頁 78-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 藤原尚樹、熊上深香、大津圭史、原田英光
2. 発表標題 Hertwig 上皮鞘形成と断裂における新規仮説. サテライトシンポジウム15「歯周組織の臨床と基礎 脈管系を中心に」
3. 学会等名 第57回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 大津圭史、熊上-坂野 深香、増田智幸、藤原尚樹、原田英光
2. 発表標題 Semaphorin 4D-Rho A シグナルによるエナメル芽細胞分化制御.
3. 学会等名 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会
4. 発表年 2014年

1. 発表者名 熊上 深香、 大津 圭史、藤原 尚樹、原田 英光
2. 発表標題 歯根発生メカニズムの新規仮説と歯根形態異常
3. 学会等名 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会
4. 発表年 2014年

1. 発表者名 藤原 尚樹、熊上 深香、大津 圭史、原田 英光
2. 発表標題 マウス臼歯歯根成長における Rho signaling の役割.
3. 学会等名 日本解剖学会 第60回東北・北海道連合支部学術集会.
4. 発表年 2014年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考