

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05032

研究課題名(和文)細胞周期と転写制御因子エピプロフィンによる上皮系器官構成細胞の運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Epiprofin regulation in cell proliferation and differentiation in tooth development

研究代表者

中村 卓史 (Nakamura, Takashi)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90585324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：エピプロフィン/Sp6 (Epiprofin, Epfn) は、Sp/KLFファミリーに属する転写因子で、歯原上皮細胞の分化と増殖を制御する。本研究の成果により、Epfnの多彩の生物活性には、Epfn蛋白のリン酸化が関与していることが明らかとなった。また、Epfnの発現を誘導する小分子化合物の同定に成功し、マウス臼歯歯胚を用いた器官培養系においてエナメル芽細胞分化の誘導活性が確認された。しかしながら、K5-Epfnトランスジェニックマウスで認められた異所性のエナメル形成などは確認されなかった。本研究成果は、歯やエナメルの再生医療の実現化に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously identified Epiprofin(Epfn) as a novel member of Sp transcription factor family that is expressed in certain ectodermal organs, such as teeth, hair follicles, nails and skin. During tooth development, Epfn regulates cell proliferation as well as cell migration at the early stages and cell differentiation in the later mature stage by controlling the phosphorylation of Epfn. We also identified a small molecule that strongly induced the expression of Epfn in dental epithelial cells. We are applying the Epfn-inducible small molecule in enamel biosynthesis of regenerative dentistry.

研究分野：再生歯学

キーワード：エナメル芽細胞 転写因子 エピプロフィン 歯の再生

## 1. 研究開始当初の背景

上皮系器官に発現するエピプロフィン/Sp6 (Epiprofin, Epfn) は、Sp/Krüppel-like factor (KLF)ファミリーに属する Zn フィンガー転写因子である。Epfn は発生初期の歯原上皮全体に発現し、その後、内エナメル上皮に限局して発現する。また、上皮において Epfn は、幹細胞と増殖能の高い前駆細胞で構成されている基底細胞層および分化が進み細胞分裂が停止した細胞で構成される上基底細胞層のケラチノサイトに発現している。毛根においては細胞増殖の活発な毛根最下部のマトリックスおよびキューティクルを行う細胞層に発現している。我々は Epfn の生体での機能を解析するため、エピプロフィン遺伝子欠損マウス (Epfn KO) およびトランスジェニックマウス (K5-Epfn) を作成し解析を進めてきた。その結果、歯の発生における Epfn の機能は、1, 歯原性上皮細胞の一過性増殖促進と分化誘導作用、2, エナメル基質遺伝子の発現誘導、3, 歯数の制御、4, 歯冠歯根の形態形成、5, 歯原性上皮の枝分かれ、6, 歯原性上皮細胞のアポトーシス阻害、など歯胚発生に重要な機能を発揮している事を明らかにしてきた。また上皮や毛根では、Epfn KO マウスの歯胚形成異常と共通の機構破綻による表現系が認められた。Epfn KO の歯ではエナメルの欠損、上皮ではケラチノサイトの後期マーカー発現の減弱、毛ではキューティクルの欠損である。つまり各組織の特徴的な細胞の最終分化が阻害されていたのである。さらに解析すると組織を構成する上皮細胞層の肥厚と細胞増殖活性の低下、分化阻害による未分化な前駆細胞の蓄積、アポトーシス阻害という3つの組織で共通した表現系を呈していた。そこで上皮細胞の増殖とアポトーシス制御に注目し関連した分子をスクリーニングした結果、Epfn KO の歯胚発生時でも認められた Retinoblastoma (Rb) 蛋白のリン酸化が著しく減少していた現象が、同様に上皮と毛根でも認められた。これらの結果から、Epfn は、上皮細胞の運命決定に重要な役割を演じているだけでなく、細胞周期調節因子に作用し、細胞増殖活性を發揮し、さらには、細胞周期離脱 (cell cycle exit) に関与し細胞の最終分化やアポトーシス反応の制御機構も統括して調整している可能性が明らかとなっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、エピプロフィン (Epiprofin, Epfn) による細胞周期制御と転写制御を介した上皮系器官構成細胞の運命決定機構の解明を目指す。具体的には、Epfn 遺伝子欠損マウス (Epfn KO) 上皮特異的 Epfn トランスジェニックマウス (K5-Epfn) の発生歯胚と上皮・毛根、および初代培養細胞ならびに歯原性上皮細胞とケラチノサイト細胞株を用

い、(1) Epfn の細胞周期制御の分子機構の解明、(2) 細胞増殖・分化時における Epfn の蛋白間相互作用ドメインの決定と共役因子の同定 (3) Epfn 発現調節を応用した上皮器官組織幹細胞の効率的誘導法の確立、を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) Epfn KO マウス歯胚における細胞周期制御の分子 Rb1 蛋白のリン酸化の検討

Epfn KO マウスは、歯胚形成異常の表現型を呈するがその原因と考えられる一つに細胞増殖能の低下が考えられる。野生型、ヘテロおよび Epfn KO マウスの胎生 16.5 日齢発生歯胚を用い、Rb 蛋白のリン酸化のウェスタンブロット解析を行った。

(2) Epfn 蛋白のリン酸化部位の推測と同定

Epfn 蛋白のリン酸化部位を予測し、予測されたセリン、スレオニン、チロシン残基をアラニンに発現ベクターを作成し、歯原性上皮細胞に導入後、V5 タグ標識を用いて免疫沈降し、リン酸化抗体 (Phos-tag) を用いて検討した。

(3) 歯原性上皮細胞における Epfn 蛋白のリン酸化による生物活性評価

歯原性上皮細胞株に、Epfn 蛋白および Epfn リン酸化部位をアラニンあるいはアスパラギン酸に変異を加えた Epfn 変異体蛋白発現ベクターを作成し、歯原性上皮細胞の細胞増殖、細胞遊走能、エナメル芽細胞への分化能を検討した。

(4) 歯原性上皮細胞においてエナメル芽細胞への分化調節因子である BMP4 や Follistatin (FST) の作用に Epfn がどのように関わっているかを歯原性上皮細胞の培養系を用いて検討した。

(5) 歯原性上皮細胞で Epfn の発現を誘導させる小分子化合物のスクリーニングを行い、Epfn 誘導因子の同定を試みた。

(6) Epfn 遺伝子誘導能を有する小分子化合物による歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への分化能ならびに歯胚器官培養系において異所性のエナメル芽細胞分化、エナメル形成能を検討した。

## 4. 研究成果

(1) これまでの結果から Epfn 遺伝子欠損マウスの発生歯胚において、Rb リン酸化歯原性上皮細胞の異常局在が明らかとなっている。野生型、ヘテロ型および Epfn KO マウスの胎生 16.5 日齢発生歯胚における Rb1 蛋白のリン酸化をウェスタンブロット法により検討した。その結果、非リン酸化およびリン酸化 Rb1 蛋白の両者を認識する抗体で

は、野生型、ヘテロおよび Efn KO マウスのサンプルでの差は認めなかった。一方、Rb1 のリン酸化蛋白を認識する抗体を用いたウェスタンブロット解析では、野生型とヘテロ型に有意な発現変動は認められなかったが、Efn KO 歯胚での Rb1 のリン酸化蛋白発現が減弱していた。

## (2) Efn 蛋白のリン酸化部位の推測と同定

MLTAVCGSLGSGHTEAPHASPPRLDLQLQTYQGHTSPEAGDYPSPLQPG	# 50
ELQSLPLGPEVDFSGYELPGASSRVTCEDLESPLAPGPFKLLQPM	# 100
SHHYESWFRFTHPGAEDGSWDLHPGTSWMDLPHYQALTSFGHGALQA	# 150
GLGGYVGDHQLCAPPPHAAHLLPAAGGQHLGPPDGAKALEVAAPESQ	# 200
GLDSSLGGAARPKGSRSSVPRSSGQTVCRPCNLEAERLGAFCGPDGK	# 250
KHLHNCHIPGCGKAYAKTSHLKAHLRWSGDRPFVFNWLFCKRPFARSDE	# 300
LQRHLQHTGTGKFPKCAVCSRVFMRSDHLAKHMKTHEGAKEEAAGAASGE	# 350
GKAGGAVEPPGGKREAEAGVAPSN	# 400
.....S..S.....S.....T...TS.....Y.S.....	# 50
.....S..Y.....SS..T.....S.S.....	# 100
.....S.....T.....S.....S.....T...TS.....	# 150
.....S.....T.....S.....S.....S.....	# 200
.....SS.....S..S.....SS..T.....	# 250
.....S.....S.....S.....S.....S.....	# 300
.....T.T.T.....S.....S.....S.....	# 350
.....S.....S.....S.....S.....S.....	# 400

図1 ヒト Efn 蛋白のアミノ酸配列とセリン・スレオニン・チロシン部位

図1はヒト Efn 蛋白のアミノ酸配列とリン酸化部位の候補となるセリン、スレオニン、チロシン残基の部位を示す。これらの配列をリン酸化部位の予測プログラムおよび他の種の Efn 蛋白の相同性から複数のリン酸化部位に絞り、候補部残基をアラニンに置換した変異体 Efn 蛋白発現ベクターをそれぞれ作成し、歯原性上皮細胞株に導入した。細胞に遺伝子導入48時間後、サンプルに発現した変異体 Efn 蛋白を V5 タグを用いて回収し、リン酸化残基を検出できる Phos-tag 抗体を用いて検討した。その結果、Efn 蛋白 N 端にリン酸化部位があることが明らかとなった。

## (3) 歯原性上皮細胞における Efn 蛋白のリン酸化による生物活性評価

Efn 蛋白 N 端リン酸化部位をアラニンおよびアスパラギン酸に変異させた発現ベクターを歯原性上皮細胞株に導入後、細胞増殖、細胞遊走能ならびにエナメル芽細胞への分化能について検討した。野生型 Efn と比較しアラニンに変異させた Efn 蛋白は、細胞増殖、細胞遊走能が低下する一方、エナメル芽細胞への分化誘導の増強が観察された。対照的にアスパラギン酸変異をさせた Efn は、エナメル芽細胞への分化能は有意な差は認められなかったが、細胞増殖、細胞遊走能を強力に増強させた。

(4) 歯原性上皮細胞に BMP4 を添加し48時間培養するとエナメル芽細胞へ分化誘導が認められるが、FST を BMP4 と同時添加すると BMP4 によるエナメル芽細胞分化誘導が消失した。しかしながら、野生型 Efn の発現ベクターの導入すると、FST と BMP4 とを同時添加した場合でもエナメル芽細胞への分化誘導が認められた。この現象は、BMP4 が存在しない FST 単独投与でも認められ、Efn によ

るエナメル芽細胞分化誘導は、BMP4 シグナルの下流で作用していることが強く示唆された。

(5) 実験(4)の結果より、歯原性上皮細胞に Efn を導入するとエナメル芽細胞誘導することが分かり、将来の歯やエナメルの再生に Efn が有用であることが明らかとなった。しかしながら、遺伝子導入の系では臨床応用に大きなハードルとなり、実現化は難しい。そこで30種類の小分子化合物を歯原性上皮細胞に作用させ Efn の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、ヘッジホッグシグナルのアゴニストである HH-Ag を用いた場合、歯原性上皮細胞の Efn 発現を増強させることが明らかとなった。

(6) HH-Ag 1.11 を胎生14.5日齢マウス第一臼歯歯胚を用いた器官培養系に1mMの濃度で添加し2週間培養した。コントロールには同量の DMSO を加えた。器官培養の臼歯歯胚の遺伝子発現を検討したところ、Efn 並びにエナメル芽細胞の分化マーカーであるアメロプラスチン、エナメルリン、KLK4 の発現が増強していた。また、培養後の歯胚から組織切片を作成し、エナメル基質の形成を評価した。その結果、エナメル形成においてはコントロールと HH-Ag1.11 を添加して培養した歯胚に差は認められず、異所性のエナメル形成も観察されなかった。

これらの結果から、Efn は細胞増殖、細胞遊走には N 端部のリン酸化が必要であり、細胞分化に作用する転写因子としては、同部の脱リン酸化が関与していることが示唆された。また、K5-Efn のような動物モデルでは Efn の発現増強により、異所性の歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞分化を誘導し、その結果、異所性のエナメル形成を認めた。しかしながら、発生歯胚の器官培養の系では、HH-Ag1.11 は強力に Efn 発現を誘導し、さらにアメロプラスチンなどのエナメル基質の遺伝子発現を誘導するものの、異所性のエナメル基質の添加などの活性を発揮するには不十分であることが明らかとなった。

歯やエナメル再生を目指す場合、Efn の発現誘導に加え、さらに in vitro や器官培養系では再現されていない生物現象を特定し、介入していく培養系が必要であることが明らかとなった。

## 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14件)

1. Nakamura, T., Jimenez-Rojas, L., Koyama, E., Pacifici, M., de Vega, S., Iwamoto, M., Fukumoto, S., Unda and Yamada, Y. Epiprofin regulates enamel

- formation and tooth morphogenesis by controlling epithelial-mesenchymal interactions during tooth development. **J. Bone Miner. Res.** 32(3):601-610 2017 査読有り doi: 10.1002/jbmr.3024
2. Iwamoto, T., Nakamura, T., Ishikawa, M., Yoshizaki, K., Sugimoto, A., Ida-Yonemochi, H., Ohshima, H., Saito, M., Yamada, Y., and Fukumoto, S. Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities, **PLoS ONE**, Volume 12, Issue 5, Article number e0177557 2017 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0177557
3. Nakamura, T., Chiba, Y., Naruse, M., Harada, H., and Fukumoto, S. Globoside accelerates the differentiation of dental epithelial cells into ameloblasts, **Int J Oral Sci.** 8(4):205-212. 2016 査読有り doi: 10.1038/ijos.2016.35
4. Li, L., Tang, Q., Nakamura, T., Suh, JG., Ohshima, H., and Jung, HS. Fine tuning of Rac1 and RhoA alters cuspal shapes by remodeling the cellular geometry. **Scientific Reports**, 6:37828. 2016 査読有り doi:10.1038/srep37828
5. Liu, J., Saito, K., Maruya, Y., Nakamura, T., Yamada, A., Fukumoto, E., Miyazaki, K., Yoshizaki, K., Ge, L., and Fukumoto, S. Mutant GDF5 enhances ameloblast differentiation via accelerated BMP2-induced Smad1/5/8 phosphorylation **Scientific Reports**, 6:23670. 2016 査読有り doi: 10.1038/srep23670.
6. Tadaki, M., Anada, T., Shiwaku, Y., Nakamura, T., Nakamura, M., Kojima, M., Arai, T., Fukumoto, S., and Suzuki, O. A 3D culture model study monitoring differentiation of dental epithelial cells into ameloblast-like cells **RSC Advances**, 6(67):62109, 2016 査読有り doi: 10.1039/C6RA04570G
7. Aurrekoetxea, M., Irastorza, I., García-Gallastegui, P., Jiménez-Rojo, R., Nakamura, T., Yamada, Y., Ibarretxe, G., and Unda, F. Wnt/ $\beta$ -catenin regulates the activity of Epiprotein/Sp6, SHH, FGF and BMP to coordinate the stages of odontogenesis. **Front Cell Dev Biol.** 4:25, 2016 査読有り doi: 10.3389/fcell.2016.00025
8. Yamada, A., Futagi, M., Fukumoto, E., Saito, K., Yoshizaki, K., Ishikawa, M., Arakaki, M., Hino, R., Sugawara, Y., Nakamura, T., and Fukumoto, S. Connexin 43 regulates salivary gland branching morphogenesis and FGF10-induced ERK1/2 phosphorylation. **J Biol Chem.**, 291(2):904-912, 2016 査読有り doi: 10.1074/jbc.M115.674663.
9. Sakisaka, Y., Kanaya, S., Nakamura, T., Tamura, M., Shimauchi, H., and Nemoto, E. p38 MAP kinase is required for Wnt3a-mediated osterix expression independently of Wnt-LRP5/6-GSK3 $\beta$  signaling axis in dental follicle cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 478(2):527-32. 2016 査読有り doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.076. 2016
10. Nemoto, E., Sakisaka, M., Tsuchiya, M., Tamura, M., Nakamura, T., Shimonishi, M., and Shimauchi, H. Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. **J Periodontal Res.**, 51(2):164-174, 2016 査読有り doi: 10.1111/jre.12294.
11. Sakisaka, Y., Tsuchiya, M., Nakamura, T., Tamura, M., Shimauchi, H., and Nemoto, E. Wnt5a attenuates canonical Wnt-induced alkaline phosphatase expression in dental follicle cells. **Exp. Cell Res.**, 336(1):85-93, 2015 査読有り doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.013.
12. Ohta, Y., Okabe, T., Larmoura, C., Di Rocco, A., Maijenburg, M., Phillips, A., Speck, NA., Wakitani, S., Nakamura, T., Yamada, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Pacifici, M., and Iwamoto, M. Articular cartilage endurance and resistance to osteoarthritic changes require transcription factor Erg. **Arthritis & Rheumatology**, 67(10):2679-2690, 2015 査読有り doi: 10.1002/art.39243.
13. Saito, K., Fukumoto, E., Yamada, A., Yuasa, K., Yoshizaki, K., Iwamoto, T., Saito, M., Nakamura, T., and Fukumoto, S. Interaction between Fibronectin and  $\beta$ 1 Integrin is Essential for Tooth Development. **PLoS one**, 10(4):e0121667. 2015 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0121667
14. Nakamura, T., Naruse, M., Chiba, Y.,

Komori, T., Iwamoto, T., Sasaki, K., and Fukumoto, S. Novel Hedgehog agonists promote osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 230(4):922-929, 2015 査読有り doi: 10.1002/jcp.24823.

〔学会発表〕(計6件)

1. Li, L., Tang, Q., Nakamura, T., Ohshima, H., and Jung, HS. How to control the cupsal patterning; epithelial morphogenesis, 第59回歯科基礎医学学会学術大会、2017年9月16-18日 松本

2. Guang, M., Yoshida, T., Nakamura, T., Gong, P., and Wakamori, M. Zn<sup>2+</sup> Hyperpolarizes Osteoblastic MC3T3-E1 Cells by Activating IK and BK Channels, The 95th General Session & Exhibition of the IADR, 2017年3月22-25日 San Francisco, USA

3. Yoshida, T., Guang, M., Nakamura, T., and Wakamori, M. The mechanisms of osteoblast differentiation and proliferation stimulated by zinc in MC3T3-E1 cells. 2017 NIH-Japan symposium, 2017年2月15-17日, 仙台

4. 中村卓史, 中村友昭, 若森実, 福本敏, エピプロフィンによる骨代謝調節、第58回歯科基礎医学学会学術大会、2016年8月24-26日 札幌

5. Nakamura, T., Fukumoto, S., Aurrekoetxea, M., Unda, F., and Yamada, Y. Transcriptional regulation of Epiprofin, The 12<sup>th</sup> Tooth Morphogenesis and Development, 2016年6月13-18日 Porvoo Helsinki, Finland

6. 齋藤幹、山田亜矢、新垣真紀子、二木正晴、中村卓史、福本敏 歯の萌出時期と嚢胞形成に関わるインテグリン beta1 の分子機構について 第53回日本小児歯科学会大会、2015年5月21-22日 広島

〔図書〕(計1件)

1. エナメル芽細胞の分化制御機構 中村卓史 成瀬正啓 齋藤幹 福本敏 季刊腎と骨代謝 2016 Vol.29, No. 1 15-24 臨床医学出版

〔その他〕

東北大学プレスリリース

<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2016/1>

1/press20161107-01.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 卓史 (TAKASHI NAKAMURA)

東北大学・歯学研究科(大学院)・准教授  
研究者番号: 90585324

(2)研究分担者

福本 敏 (SATOSHI FUKUMOTO)

東北大学・歯学研究科(大学院)・教授  
研究者番号: 30264253

江草 宏 (HIROSHI EGUSA)

東北大学・歯学研究科(大学院)・教授  
研究者番号: 30379078