

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05688

研究課題名(和文) 陥入上皮の運命決定に関わる制御因子の同定と歯の再生法への応用

研究課題名(英文) The mechanism of cell fate determination in epithelial-mesenchymal interaction during tooth development

研究代表者

吉崎 恵悟 (Yoshizaki, Keigo)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10507982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)： 歯、肺、唾液腺、腎臓および毛など様々な器官は上皮-間葉相互作用によって形成されることが知られている。これらの器官は発生初期において、上皮細胞が間葉細胞に陥入するという共通の様式をたどるが、その後の分化課程において特異的な因子が関与することで器官の運命決定がなされていると考えられる。本研究では、歯から毛が生じる遺伝子欠損マウスモデルを用いて、細胞運命転換が起こるメカニズムの解析を行った。さらに同モデルマウスはエナメル質形成不全症を呈しており、本研究により歯から毛への運命転換が可能である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： Epithelial-mesenchymal interaction plays critical roles for the development of organs such as tooth, lung, salivary gland, kidney and hair. During this process, epithelial thickening and budding into mesenchyme are common phenomenon, while the decision of cell fate is made by the specific transcriptional controls of individual organs. In this study, we analyzed the mechanisms of cell fate conversion using mouse model, which generates ectopic hair in tooth. This mouse model also showed enamel hypoplasia in tooth, indicating that the capability of dental cell fate transition into hair cells.

研究分野： 歯科矯正学

キーワード： 歯 歯原性上皮細胞 細胞分化 細胞運命決定 歯の再生

## 1. 研究開始当初の背景

歯は肺、唾液腺、腎臓および毛などの器官と同様に、上皮-間葉相互作用によって形成されることが知られている。歯の発生は、胎生期に上皮細胞の肥厚により始まり、上皮細胞が間葉細胞に陥入することで歯の形態形成が開始される。この際、上皮細胞と間葉細胞が相互に影響することで厳密な形態形成制御がなされている。上皮細胞は、外エナメル上皮、星状網細胞、中間層細胞および内エナメル上皮に分化し、内エナメル上皮が将来エナメル質を形成するエナメル芽細胞へと分化する。一方、げっ歯類の切歯は生涯伸び続けることが知られている。これはサービカルループと呼ばれる幹細胞の供給源が存在しているためで、そこから様々な上皮細胞に分化する幹細胞が供給されるため、切歯が形成され続ける。このように歯原性上皮幹細胞が歯の発生に重要であることが判明してきたが、歯原性上皮幹細胞の細胞運命決定機構の詳細は未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で、転写調節因子 **MED1** を上皮特異的に欠損させるとマウス切歯から異所性に毛が生じることが判明した。この知見は歯原性上皮幹細胞の多能性を示し、陥入上皮細胞の運命決定は同遺伝子によって調節されている可能性が考えられる。そこで本研究では、同遺伝子の機能解析を通して、歯原性上皮幹細胞の細胞運命決定機構の解明を目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) **MED1** 遺伝子欠損マウス切歯より生じる毛を、免疫染色法を用いて組織学的に解析した。また、胎生 14 日齢マウス切歯サービカルループより採取した細胞から歯原性上皮幹細胞株 **CLDE** を作成し、遺伝子導入を用いて **MED1** の機能解析を行った。

(2) **MED1** 遺伝子欠損マウス臼歯を採取し、組織学的に解析した。さらに走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いてエナメル質の表面性状を解析した。また、免疫沈降法を用いて **MED1** と **Notch1** の結合を確認した。さらに、クロマチン免疫沈降法を用いて **Alpl** プロモーターにおける **MED1** の結合を確認した。

(3) qPCR 法を用いて基底膜分子ネフロネクチン (**Npnt**) の歯の発生における発現パターンの解析を行った。また、器官培養法を用いて **Npnt** の歯胚形成能に与える影響を解析した。さらに、EGF-like repeat 領域を欠損させた **Npnt** 発現ベクターを作成し、機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 転写調節因子 **MED1** による細胞運命決定制御機構の解明

**MED1** 遺伝子欠損マウスの切歯より毛が生じる部位を組織学的に解析したところ、歯原性上皮細胞のうち、中間層細胞が肥厚し、細胞増殖能が亢進していた。そこで、歯原性上皮幹細胞マーカーである **Sox2** の発現を、免疫染色法を用いて確認を行った。野生型マウスにおいては、サービカルループ近傍において分化が進むと、**Sox2** 陽性細胞が速やかに消失するが、遺伝子欠損マウスにおいて、中間層細胞に **Sox2** 陽性細胞が残存しており、**Sox2** 陽性中間層細胞の細胞塊が認められた。以上の結果から **MED1** が幹細胞の維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。そこで、歯原性上皮細胞株 **CLDE** 細胞を樹立し、研究を行った。**CLDE** 細胞は **Sox2** 陽性を示し、**Ca<sup>2+</sup>** 刺激により **Sox2** 発現が消失し、分化することが確認された。そこで、**MED1** siRNA を用いて **MED1** の発現を抑制し、**Sox2** 陽性細胞数を確認したところ、control 群に **Ca<sup>2+</sup>** を添加すると、**Sox2** 陽性細胞が減少するのに対し、**MED1** siRNA 遺伝子導入群では変化が認められなかった。以上の結果から、**MED1** を欠損させると、歯原性上皮幹細胞が幹細胞状態を維持したまま中間層細胞になり、細胞塊を作ることによって異所性に毛が形成される可能性が考えられた。

## (2) **MED1** によるエナメル質石灰化機構の解明

**MED1** 遺伝子欠損マウスは切歯および臼歯においてエナメル質形成不全症を呈していた。一方、臼歯においては毛の形成は認められないことから、エナメル質形成における **MED1** の影響を、臼歯を用いて解析した。組織学的解析および SEM 解析により、**MED1** 遺伝子欠損マウス臼歯において、エナメル小柱の形成不全が認められ、石灰化および結晶化が不良である可能性が示唆された。さらに qPCR 法を用いて遺伝子発現を確認したところ、遺伝子欠損マウスにおいて、石灰化に関わる **Alpl** の発現が著しく減少していた。**Alpl** は、歯の上皮細胞において中間層細胞に強く発現していることから、**MED1** は中間層細胞の分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに中間層細胞は **Notch** シグナリングの受容体である **Notch1** を強く発現しているため、同シグナリングとの関連を解析したところ、**MED1** は切断型 **Notch1** と結合し、**Alpl** のプロモーター領域で発現制御を行っている可能性を見出した。

## (3) **Sox2** を制御する基底膜分子ネフロネクチン (**Npnt**) の同定および機能解明

歯は上皮-間葉相互作用により形成されるが、上皮細胞と間葉細胞の間に介在する基底膜がシグナルの受け渡しに重要な役割を果たしていることが知られている。そこで歯の発生時期に強く発現する基底膜分子をスクリーニングしたところ、**Npnt** を同定した。同分子は EGF-like repeat 領域と RGD 領域を持

つ細胞外マトリックスで、歯の形態形成期である胎生13日齢 (E13)からE15に強く発現していた。器官培養法を用いて歯の形態形成に与える影響を確認したところ、siRNA Npnt 遺伝子導入群では優位に歯胚の大きさが減少していた。さらに Npnt の機能解析を行ったところ、Npnt の EGF-like repeat 領域は Sox2 発現を減少させることで、歯原性幹細胞を内エナメル上皮へと分化させる可能性が示唆された。

#### 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11件)

① Sugimoto A, Miyazaki A, Kawarabayashi K, Shono M, Akazawa Y, Hasegawa T, Ueda-Yamaguchi K, Kitamura T, Yoshizaki K, Fukumoto S, Iwamoto T.

Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells.

Sci Rep. 2017; 7(1):17696. doi: 10.1038/s41598-017-18089-0.

② Furukawa Y, Haruyama N, Nikaido M, Nakanishi M, Ryu N, Oh-Hora M, Kuremoto K, Yoshizaki K, Takano Y, Takahashi I.

Stim1 Regulates Enamel Mineralization and Ameloblast Modulation.

J Dent Res. 2017; 96(12): 1422-1429. doi: 10.1177/0022034517719872.

③ Yoshizaki K, Hu L, Nguyen T, Sakai K, Ishikawa M, Takahashi I, Fukumoto S, Den Besten P, Bikle DD, Oda Y, Yamada Y.

Mediator 1 Contributes to Enamel Mineralization as a Coactivator for Notch1 Signaling and Stimulates Transcription of the Alkaline Phosphatase Gene.

J Biol Chem. 2017; 292(33):13531-13540. doi: 10.1074/jbc.M117.780866. PMID: 28673966

④ Iwamoto T, Nakamura T, Ishikawa M, Yoshizaki K, Sugimoto A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Saito M, Yamada Y, Fukumoto S.

Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities.

PLoS One. 2017; 12(5): e0177557. doi: 10.1371/journal.pone.0177557.

⑤ 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. 2017; 7:45181. doi: 10.1038/srep45181

⑥ Suzuki A, Nakano M, Yoshizaki K, Yasunaga A, Haruyama N, Takahashi I.

A Longitudinal Study of the Presence of Dental Anomalies in the Primary and Permanent Dentitions of Cleft Lip and/or Palate Patients.

Cleft Palate Craniofac J. 2017; 54(3):309-320. doi: 10.1597/15-186.

⑦ 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. 2016; 6:23670. doi: 10.1038/srep23670.

⑧ 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. 2016; 11(3): e0152206. doi:

10.1371/journal.pone.0152206.

⑨ 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. 2016; 291(2):904-12. doi: 10.1074/jbc.M115.674663.

⑩ Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Yuasa K, Yoshizaki K, Iwamoto T, Saito M, Nakamura T, Fukumoto S.

Interaction between Fibronectin and  $\beta$ 1 Integrin Is Essential for Tooth Development.

PLoS One. 2015; 10(4): e0121667 doi: 10.1371/journal.pone.0121667.

⑪ Umeda M, Terao F, Miyazaki K, Yoshizaki K, Takahashi I.

MicroRNA-200a Regulates the Development of Mandibular Condylar Cartilage.

J Dent Res. 2015; 94(6):795-802. doi: 10.1177/0022034515577411.

[学会発表] (計20件)

① 吉崎 恵悟

歯原性上皮細胞の運命決定に関わる制御因子の同定とトランスクリプトーム解析を用いた歯の運命決定因子の探索

第 3 回口腔医科学フロンティア研究会 口演  
徳島 2018 年 3 月 5 日—6 日

② Funada K, Yoshizaki K, Han X, Miyazaki K,  
Arai C, Yuta T, Takahashi I

The roles of miR875-5p as a specific marker  
during early tooth development

Kyudai Oral Bioscience 2018 (KOB2018) 口  
演 福岡 February 11th (Sun) - 12th (Mon)  
2018

③ Yoshizaki K

CAGE analysis for the cell fate determination  
during epithelial-mesenchymal interactions in  
tissue morphogenesis. USJI seminar 2017,  
Exchange activities of young researchers in  
biomedical research field between US-Japan in  
NIDCR/NIH, NIDCR, NIH, Bethesda, USA, Sep,  
12, 2017

④ Han X, Yoshizaki K, Arai C, Miyazaki K,  
Funada K, Yuta T, Takahashi I

The role of Nkx2-3 homeobox transcription  
factor in tooth development

第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 ポスタ  
ー発表 札幌 2017 年 10 月 18-20 日

⑤ 吉崎 恵悟, 鮎田 啓太, 宮崎 佳奈子,  
新井 智映子, 韓 雪, 湯田 智美, 高橋 一  
郎.

歯に特異的に発現する miR875-5p の同定と発  
現パターン解析

第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 ポスタ  
ー発表 札幌 2017 年 10 月 18-20 日

⑥ 鮎田 啓太, 吉崎 恵悟, 宮崎 佳奈子,  
韓 雪, 新井 智映子, 湯田 智美, 高橋 一  
郎.

密着接合因子 ZO-1 による歯原性上皮細胞の  
増殖および分化に与える影響

第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 ポスタ  
ー発表 札幌 2017 年 10 月 18-20 日

⑦ 湯田 智美, 吉崎 恵悟, 新井 智映子,  
宮崎 佳奈子, 韓 雪, 鮎田 啓太, 野口 健  
志, 高橋 一郎

基底膜分子 Nephronectin は RGD 領域を介し  
てエナメル芽細胞の分化制御に関与する

第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 ポスタ  
ー発表 札幌 2017 年 10 月 18-20 日

⑧ Yoshizaki K

Comprehensive analysis for the functions of  
genes during epithelial-mesenchymal interactions  
in tissue morphogenesis

Special lecture, 「口腔から健康長寿を支える  
プロジェクト推進に向けた研究拠点構築プ  
ログラム」「頭脳循環を加速する戦略的国際  
研究ネットワーク推進プログラム」2nd  
Symposium, Fukuoka, Japan, Feb, 28, 2016

⑨ Chiba Y, Sakai K, Ikeuchi T, Yoshizaki K,  
Mahboubi D, He B, Yamada Y

Epiprofin and T-box1 Regulate Ameloblast  
Lineage Development

The IADR/AADR/CADR 95th General Session  
and Exhibition, San Francisco, CA, USA ·  
March 22-25, 2017

⑩ Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Han X,  
Funada K, Haruyama N, Fukumoto S, Takahashi I  
PKP1 regulates ameloblast differentiation via the  
cell adhesion.

The IADR/AADR/CADR 95th General Session  
and Exhibition, San Francisco, CA, USA, March  
22-25, 2017

⑪ 古川 雄亮, 春山 直人, 二階堂 まりこ,  
中西 正光, 笠 法子, 大洞 將嗣, 呉本 晃一,  
吉崎 恵悟, 高橋 一郎 Stim1 はマウスのエ  
ナメル質の石灰化およびエナメル芽細胞成  
熟期にみられる周期性を制御する 第 12 回  
九州矯正歯科学会学術大会 宮崎 2017 年 3  
月 18-19 日

⑫ 古川 雄亮, 春山 直人, 二階堂 まりこ,  
中西 正光, 笠 法子, 大洞 將嗣, 呉本 晃一  
吉崎 恵悟, 高橋 一郎 ストア作動性 Ca<sup>2+</sup>  
流入異常による外胚葉異形成症におけるエ  
ナメル質形成不全症の発症メカニズム 第  
75 回日本矯正歯科学会 徳島 2016 年 11 月  
7-9 日

⑬ 酒井 陽, 吉崎 恵悟, 千葉 雄太, 池内 友  
子, 山本 朗仁, 日比 英晴, 山田 吉彦  
歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への分化  
における Epiprofin と T-box1 の役割

The role of epiprofin and T-box1 in enamel  
epithelial development

第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2016  
年 8 月 24-26 日 北海道札幌市 札幌コンベン  
ションセンター

⑭ 新井 智映子, 吉崎 恵悟, 宮崎 佳奈子,  
韓 雪, 鮎田 啓太, 福本 敏, 高橋 一郎  
基底膜分子 Nephronectin は EGF like repeat  
domain を介して歯原性上皮幹細胞の細胞増  
殖を制御する

A basement membrane protein Nephronectin  
regulates the proliferation of dental epithelial  
stem cell through its EGF like repeat domain

第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2016  
年 8 月 24-26 日 北海道札幌市 札幌コンベン  
ションセンター

⑮ Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Han X,  
Funada K, Takahashi I

Nephronectin, a basement membrane protein,  
plays critical roles for differentiation and  
proliferation of dental epithelial stem cells during

tooth development.

Kyudai Oral Bioscience 2016, February 27, 2016, Fukuoka, Japan

⑯ Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Xue H, Funada K, Takahashi I

Plakophilin-1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development and ameloblast differentiation.

International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Disease, December 10-11, 2015, Yumikura Hall Osaka University Yumikura Hall Osaka University, Japan

⑰ 新井 智映子、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、韓 雪、鮫田 啓太、高橋 一郎  
歯の発生における基底膜分子 Nephronectin の役割 The role of basement membrane protein Nephronectin in tooth development  
第 74 回日本矯正歯科学会 2015 年 11 月 18-20 日 福岡県福岡市 福岡国際会議場・マリンメッセ

⑱ 宮崎 佳奈子、吉崎 恵悟、新井 智映子、韓 雪、鮫田 啓太、高橋 一郎  
外胚葉異形成症原因遺伝子 Plakophilin 1 は歯の発生において Wnt シグナル調節因子として作用する Plakophilin 1 associated with ectodermal dysplasia acts as a Wnt signaling regulator in tooth development  
第 74 回日本矯正歯科学会 2015 年 11 月 18-20 日 福岡県福岡市 福岡国際会議場・マリンメッセ

⑲ 新井 智映子、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、韓 雪、鮫田 啓太、高橋 一郎  
基底膜分子 Nephronectin は歯原性上皮幹細胞の分化および細胞増殖に關与する A basement membrane protein Nephronectin is involved in dental epithelial stem cell differentiation and proliferation.  
第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015 年 9 月 11-13 日 新潟県新潟市 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター)

⑳ 宮崎 佳奈子、吉崎 恵悟、新井 智映子、韓 雪、鮫田 啓太、高橋 一郎  
Plakophilin-1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development and ameloblast differentiation  
第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015 年 9 月 11-13 日 新潟県新潟市 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター)

[図書] (計 0 件)

[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]  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉崎 恵悟 (YOSHIZAKI Keigo)  
九州大学・歯学研究科 (研究院)・助教  
研究者番号：10507982

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

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

宮崎 佳奈子 (MIYAZAKI Kanako)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：30778840

新井 智映子 (ARAI Chieko)  
九州大学・大学病院・研究員  
研究者番号：60802288