

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06341

研究課題名(和文) 転写因子C/EBP とRunx2に関する歯の再生技術開発へ向けた基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on technology development of tooth regeneration with regard to transcription factor Cebpb and Runx2

研究代表者

齋藤 和幸 (Saito, Kazuyuki)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：40419297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：成獣のCebpb遺伝子欠損マウス切歯はアメロジェニン陽性の上皮真珠やエナメル質、象牙質の異所性増生、唇側のCervical loopにおけるSox2陽性細胞の減少を認めた。C/EBP はSox2の上流として機能しており、ステムネスを制御していると考えられた。また、歯髄中にセメント質様硬組織を認め、エナメル芽細胞の極性の乱れ、エナメル芽細胞層のエナメル基質の出現が生じ、Cebpbノックダウンのエナメル上皮幹細胞株において、上皮間葉転換を認めた。Runx2ノックダウンのエナメル上皮幹細胞株でも同様であった。マウス切歯においてCebpbとRunx2は過剰歯の形成に重要な役割を果たしていた。

研究成果の概要(英文)：Adult Cebpb KO mice incisors present amelogenin-positive epithelium pearls, enamel and dentin allopathic hyperplasia, fewer Sox2-positive cells in labial cervical loop epitheliums, and reduced Sox2 expression in enamel epithelial stem cells. Thus, Cebpb acts upstream of Sox2 to regulate stemness. Here, Cebpb KO mice demonstrated cementum-like hard tissue in dental pulp, loss of polarity by ameloblasts, enamel matrix in ameloblastic layer, and increased expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in a Cebpb knockdown mouse enamel epithelial stem cell line. Runx2 knockdown in the cell line presented a similar expression pattern. Therefore, the EMT enabled disengaged odontogenic epithelial stem cells to develop supernumerary teeth. Cebpb and Runx2 acted synergistically and played an important role in the formation of supernumerary teeth in adult incisors

研究分野：歯学

キーワード：C/EBP Runx2 エナメル上皮幹細胞 エナメル質 上皮間葉転換 Sox2 過剰歯 象牙質

1. 研究開始当初の背景

マウスの切歯は常生歯であり、根尖部が存在せず、歯髓腔が広がったような形態になっており、形成端という。その形成端の唇側の膨隆部(唇側 Cervical loop) に組織幹細胞を有し、エナメル上皮幹細胞が存在する(Harada H et al. Arch Histol Cytol 2004)。我々は、転写因子 *Cebpb* と *Runx2* の出生後の DKO マウス(129sv/C57BL6)を用いて、エナメル上皮幹細胞、歯髓幹細胞の解析を行っている。我々は、*CebpbKO* マウスにおいて、切歯周囲に複数の過剰歯様硬組織を認めたことを報告した(Huang B, et al. Oral Disease 2012)。*Cebpb KO* のアダルトマウス(129sv)では、 μ CTにて切歯の形成端に不透過性病変を認め、エナメル質と象牙質の増生を認めた(13 匹中 4 匹(図 1)、DKO 第二世代マウス *Cebpb KORunx2 WT* では 8 匹中 5 匹)、出生後 3 ヶ月の *CebpbKORunx2Het* では形成端に歯胚の形成(12 匹中 4 匹)を認めた(表 1)。

Cebpb 改変マウス(129sv)において KO は WT に比べて、唇側 Cervical loop の組織幹細胞のエナメル上皮幹細胞マーカー *Sox2* (Emma Jurri. Dev Cell 2012) (Emma Juuri. Development 2013) の陽性細胞数が有意に減少していた(図 2A,B)。唇側 Cervical loop より作成したマウスエナメル上皮幹細胞株 mHAT9 (Keishi Otsu, Journal of Cellular Physiology, 2010)、ラットエナメル上皮幹細胞株 RHAT7 (Shintaro Kawano, Connective Tissue Research, 2002)において、*Fgfr2*、*Cbfb*、*Bmi1*、*Sox2*、*Cebpb*、*Runx2*、*Notch1*、*Jagged1* の発現を RT-PCR 法にて確認している。*Cebpb KO* では、常生歯の体性幹細胞を維持するシステムが完全に破綻しているマウスがみられ、*Cebpb* はエナメル上皮幹細胞、歯髓幹細胞の維持に関わっていると考えられる。胎生 15 日目の DKO 第二世代マウスの上顎切歯歯胚では *Runx2 Het* と KO では、budding (出芽) が生じ、*Cebpb* の Het、KO も重なると相加的にその頻度、大きさが増していた(図 2C)。

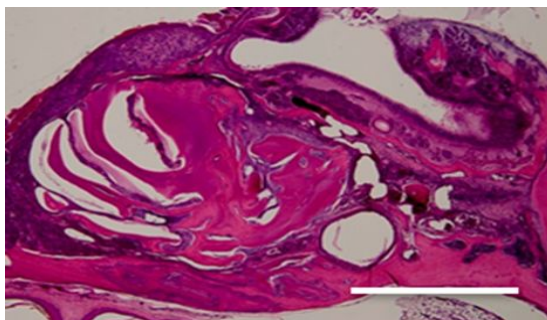


図 1 *Cebpb KO* マウス(129sv)出生後 1 歳 7 ヶ月。上顎切歯の形成端よりエナメル質・象牙質の増生が認められる。スケールバーは 1mm。スケールバーは 100 μ m。

	WTWT	<i>Runx2Het</i>	<i>CebpbKO</i>	<i>CebpbKO Runx2Het</i>
浸透率	0/4 (%)	0/9 (%)	5/8 (62.5%)	4/12 (33%)
位置				
上顎	0(0%)	0(0%)	5(100%)	4(100%)
下顎	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
片側	0(0%)	0(0%)	1(20%)	4(100%)
両側	0(0%)	0(0%)	4(80%)	0(0%)
特徴				
短	0(0%)	0(0%)	3(60%)	0(0%)
過剰歯	0(0%)	0(0%)	2(40%)	4(100%)

表 1 出生 3 か月 *Cebpb/Runx2* DKO 第二世代マウス(129sv/C57BL6)の変形切歯の表現型

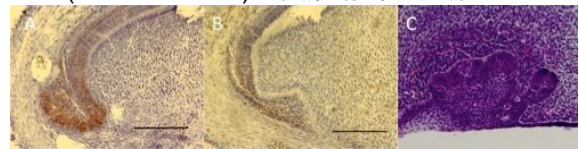


図 2 A,B: *CebpbKO*(129sv)アダルトマウスの上顎切歯組織幹細胞膨隆部のエナメル上皮幹細胞(*Sox2* 陽性細胞)の数の変化。*Sox2* 免疫染色画像(A: WT, B: KO)。歯全体に大きな変異を生じていない *CebpbKO* マウスにもエナメル上皮幹細胞の数の減少という表現型が生じていた。スケールバーは 100 μ m。C: *CebpbHetRunx2KO*(第二世代 129sv/C57BL6) 胎生 15 日目 上顎切歯歯胚に連続して口蓋側に budding が認められた。*Runx2KO* 単独より大きい傾向にある。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトにおいて、乳歯、永久歯に続く後継の第三歯堤や歯の発生過程で現れる外エナメル上皮といった生体内のエナメル上皮幹細胞を標的として、転写因子 *Cebpb*、*Runx2* の発現量を調節し、歯の継続的な発生を促す歯の再生技術の開発を目指している。

3. 研究の方法

転写因子 *Cebpb* と *Runx2* の DKO マウスの切歯の解析と並行して、マウス切歯の組織幹細胞膨隆部由来のエナメル上皮細胞株 mHAT9 を用いて、miRNA とレトロウイルスベクターあるいは siRNA とリポフェクションを用いて、*Cebpb*、*Runx2* の過剰発現、ノックダウンによる遺伝子発現変化の解析を行い、過剰歯形成に関わる分子機序の解明を図る。

4. 研究成果

成獣の *Cebpb*KO マウスの切歯はアメロジェニン陽性の上皮真珠やエナメル質、象牙質の異所性増生(表 1、図 1、3)、唇側の Cervical loop における *Sox2* 陽性細胞の減少を認めた(図 1、2)。 *Cebpb* は *Sox2* の上流として機能しており、ステムネスを制御していると考えられた。また、歯髄中にセメント質様硬組織(図 3)を認め、エナメル芽細胞の極性の乱れ、エナメル芽細胞層のエナメル基質の出現が生じていた(図 4)。

出生後 3 ヶ月の DKO マウス第二世代マウスにおいて、WTWT に比べ *Cebpb*KO の遺伝子型のマウスはセメント質の辺縁が不正であり、増殖している表現型を認めた。ヘルトピヒ上皮鞘がセメント芽細胞に分化転換した細胞が、歯髄内のエナメル芽細胞からセメント芽細胞へと分化したのと同様に分化が亢進しているのではないかと考えられた(図 5)。

胎生 15 日目の DKO 第二世代マウスの上顎切歯歯胚の budding の表現型において、 *Cebpb*KO*Runx2*Het は、 *Cebpb*WT*Runx2*Het と比較して、出現する浸透率が高く、細胞数も増加していた(表 2、図 6)。

Cebpb ノックダウンのエナメル上皮幹細胞株において、上皮間葉転換が生じていると想定される mRNA の遺伝子発現の変化を認めた(図 7、8)。 *Runx2* ノックダウンのエナメル上皮幹細胞株でも同様であった(図 7、8)。また、それらのノックダウンにより、スモールロイシンリッチプロテオグリカンの *Biglycan* と *Decorin* は相加的に遺伝子発現量が上昇していた(図 9、10)。マウス切歯において *Cebpb* と *Runx2* は上皮間葉転換を抑制しており、その発現量の低下は、過剰歯の形成に重要な役割を果たしていると考えられた(表 1、図 3、8)。

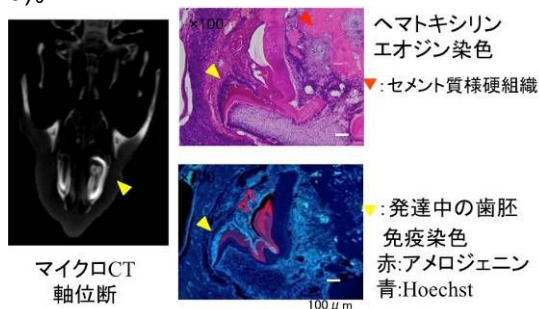


図 3 出生後 3 か月第二世代 *Cebpb*KO*Runx2*Het マウスの切歯形成端の過剰歯形成: *Cebpb*KO*Runx2*Het(129sv/C57BL6) 出生後 3 か月。上顎切歯の形成端よりエナメル芽細胞、象牙芽細胞を認める発生中の歯胚を認めた。スケールバーは 100 μ m。

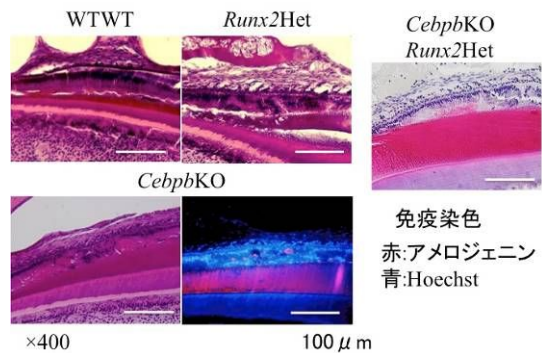


図 4 出生後 3 か月の *Cebpb*/*Runx2*DKO 第二世代マウス(129sv/C57BL6)のエナメル芽細胞。 *Runx2*Het ではエナメル芽細胞が極性を失い、 *Cebpb*KO ではエナメル芽細胞が極性を失い、エナメル芽細胞層にアメロジェニン陽性エナメル基質タンパクの小塊を認めた。スケールバーは 100 μ m。

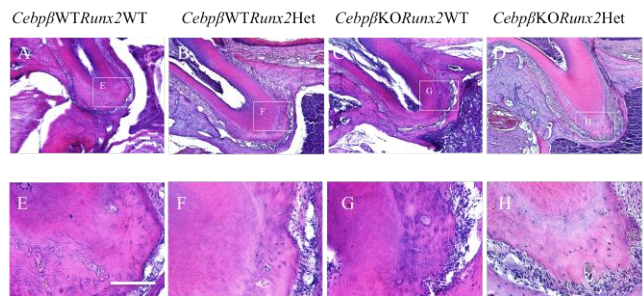


図 5 出生後 3 か月の *Cebpb*/*Runx2*DKO 第二世代マウス(129sv/C57BL6)の大白歯(M1)のセメント質の表現型。E、F、G、HはA、B、C、Dの一部の拡大像である。WTWT に比べ *Cebpb*KO の遺伝子型のマウスはセメント質の辺縁が不正であり、増殖していた。スケールバーは 100 μ m。

遺伝子型	budding の浸透率
<i>Cebpb</i> WT <i>Runx2</i> WT	0/7(0%)
<i>Cebpb</i> KO <i>Runx2</i> WT	0/3(0%)
<i>Cebpb</i> WT <i>Runx2</i> Het	13/17(76%)
<i>Cebpb</i> KO <i>Runx2</i> Het	5/5(100%)

表 2 胎生 15 日目 *Cebpb*/*Runx2*DKO 第二世代マウス胎仔(129sv/C57BL6)の上顎切歯歯胚の budding の各遺伝子型別の浸透率。

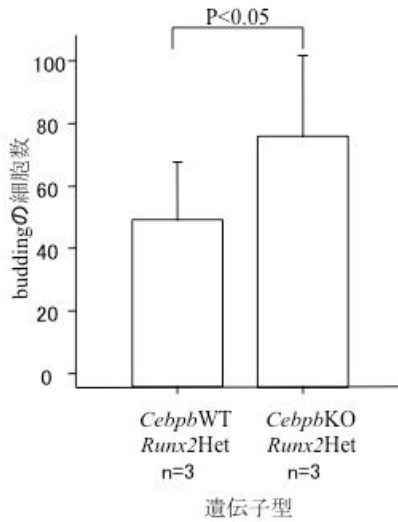


図6 胎生15日目 *Cebpb/Runx2*DKO 第二世代マウス胎仔(129sv/C57BL6)の上顎切歯歯胚の budding の遺伝子型別の細胞数の比較。マンホイットニー-U 検定を用いた。

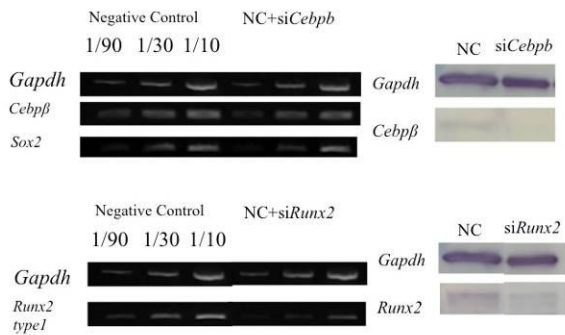


図7 siRNAによるmHAT9d細胞株の *Cebpb* と *Runx2* mRNA の発現量低下におけるRT-PCR とウエスタンブロッティングの結果。段階希釈法の倍率を示した。NCはNegative Controlの略。

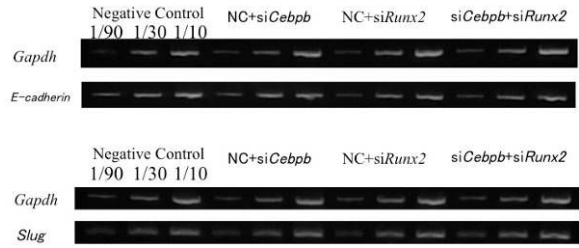


図8 siRNAによるmHAT9d細胞株の *Cebpb* と *Runx2* mRNA の発現量低下における上皮間葉転換関連遺伝子のRT-PCRの結果

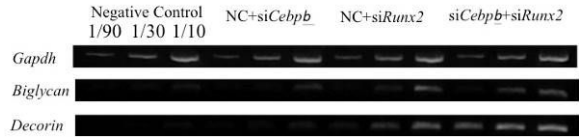


図9 siRNAによるmHAT9d細胞株の *Cebpb* と *Runx2* mRNA の発現量低下における *Decorin* と *Biglycan* のRT-PCRの結果

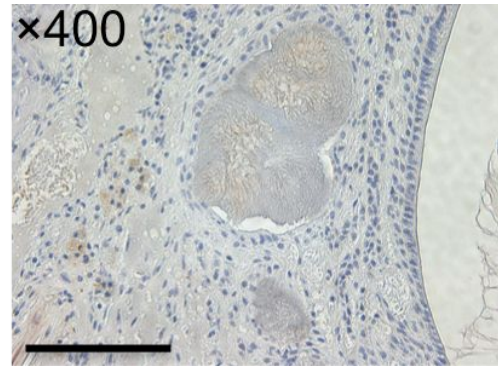


図10 出生後3ヶ月の *Cebpb*KO *Runx2*Het マウス(129sv/C57BL6)の切歯形成端周囲の *Decorin* の免疫染色(対比染色はヘマトキシリン。)形成端付近のエナメル基質タンパクの小塊の周囲に細胞外基質に *Decorin* の増生を認めた。スケールバーは100 μ m。

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)
マウス切歯体性幹細胞を用いた歯の再生モデル 第 16 回日本再生医療学会 仙台市 2017.3.7-9

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 和幸 (SAITO KAZUYUKI)
京都大学・大学院医学研究科感覚運動系外科学講座口腔外科学分野・特定研究員
研究者番号：40419297

(2)研究分担者

高橋 克 (KATSU Takahashi)
京都大学・大学院医学研究科感覚運動系外科学講座口腔外科学分野・准教授
研究者番号：90314202

喜早ほのか (HONOKA Kiso)
京都大学・大学院医学研究科感覚運動系外科学講座口腔外科学分野・キャリア支援医
研究者番号：50748598

別所 和久 (KAZUHISA Bessho)
京都大学・大学院医学研究科感覚運動系外科学講座口腔外科学分野・教授

研究者番号：90229138

(3)連携研究者

菅井 学 (MANABU Sugai)
福井大学医学部医学科生命情報医科学講座分子遺伝学領域・教授
研究者番号：90303891

原田 英光 (HIDEMITU Harada)
岩手医科大学解剖学講座 発生生物・再生医学分野・教授
研究者番号：70271210

浅原 正和 (MASAKAZU Asahara)
愛知学院大学教養部・生物学教室・専任講師
研究者番号：20709399

(4)研究協力者

小守 壽文 (TOSHIHISA Komori)
長崎大学大学院医歯薬総合研究科医療科学専攻生命医科学講座脂肪生物学分野・教授
研究者番号：00252677

審良 静男 (AKIRA Shizuo)
大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫学研究室拠点長・教授
研究者番号：50192919

清水 章 (AKIRA Shimizu)
京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター開発企画部・教授
研究者番号：00256942

永田 昌毅 (MASAKI Nagata)
新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面口腔外科学分野・准教授
研究者番号：10242439