

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05548

研究課題名(和文) 増殖因子 細胞間結合分子クロストークによる歯原性上皮・間葉細胞の分化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of growth factor - intercellular communication during dental epithelial and mesenchymal cell differentiation.

研究代表者

山田 亜矢 (YAMADA, AYA)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：40295085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間結合は、細胞同士の情報伝達や、上皮のバリア機能の維持などに重要であると考えられている。我々は細胞間結合の中でもギャップ結合に着目し、歯の発生過程において高い発現を示すコネキシン43の役割について検討した。

コネキシン43は、細胞間でカルシウムやIP3などの小分子の輸送に関与している。コネキシン43が欠損することで、この細胞外からのカルシウム輸送が低下し、TGF-beta1などの増殖因子のシグナル伝達制御の抑制を生じること、また細胞内のカルシウムレベルを厳密に調整することで、細胞内のシグナル伝達の強弱を決定しているという新たな知見を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯や唾液腺の器官形成において細胞間結合の役割を解明する事で、これまでその発症原因が不明であった眼歯指異形成症の病態解明に大きく貢献することができた。また細胞間結合は人為的調整が可能であることから、歯および唾液腺の器官再生技術の開発において、器官形成の促進化技術に応用可能な知見となる。これらは口腔組織のみならず肺、腎臓、肝臓等の全身の臓器形成にも応用可能な技術であり、さらにiPS細胞からは関連細胞の誘導や人工歯胚の形成にも成功している。また細胞内のカルシウムレベルの新たな調整機構解明は、ほぼ全ての細胞内シグナル伝達機構に関与しており、すべての生物学の基盤となる知見として役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Intercellular junctions are thought to be important for signal transduction between cells and maintaining the barrier function of the epithelium. We focused on gap junctions among intercellular junctions, and examined the role of connexin 43, which is highly expressed during tooth development.

Connexin 43 is involved in the transport of small molecules such as calcium and IP3 between cells. In the deficiency of Connexin43, extracellular calcium transport is reduced, because of reduction of growth factors signaling such as TGF-beta1. And it is strictly regulating intracellular calcium levels. We have found new findings that determine the level of intracellular signal transduction via gap junction.

研究分野：小児歯科学

キーワード：再生医療 細胞間結合 増殖因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医学的な研究の発展から、胎児組織を用いた歯や唾液腺の再生が、小型動物であるマウス等を用いて行われるようになってきた。しかしこれら技術をヒトに応用するためには、胎児組織を用いるという観点から倫理的な問題を生じる。従って iPS 細胞や組織幹細胞を用いた手法へと転換が行われ、歯の再生においてはこれら細胞からエナメル質を形成するエナメル芽細胞、さらには象牙質を形成する象牙芽細胞が人工的に誘導可能となり、これら 2 種類の細胞を組み合わせることで、iPS 細胞由来の人工歯の形成にも成功した。これらの分化誘導過程において、細胞密度が極めて重要であり、このことは細胞間結合が、口腔組織の発生や再生に極めて重要であることを示唆する。

細胞間結合には、タイトジャンクション、アドヘレントジャンクション、ギャップジャンクション、デスモソームの 4 種類の結合様式が存在する。この中で我々はギャップジャンクションに着目し研究を進めてきた。ギャップ結合はコネキシン蛋白がコネクソンと呼ばれる 6 量体を形成し、細胞間をチャンネルで結合した構造を有する。このチャンネル内は分子量 1,000 以下の小さな分子や電気的な刺激を伝達することが可能である。これまで細胞分化に関する研究は、増殖因子や細胞外マトリックスなどを応用したものが主体であった。これら細胞増殖因子シグナルは、その受容体への結合と、下流分子の活性化によって引き起こされるが、これら増殖因子刺激が、細胞間結合の有無により変化することを見出した。またギャップジャンクション分子の一つであるコネキシン 43 (Cx43) 等の遺伝子異常は、ギャップジャンクション病 (変異性紅斑角皮症、粘膜上皮異形成症、魚鱗癬-難聴症候群、眼歯指異形成症など) の原因となることが知られている。これら疾患は、歯の数の異常やエナメル質形成不全を呈することから、ギャップジャンクションが歯の発生に極めて重要な役割を演じていることが示唆された。そこで、歯の形成をモデルとして増殖因子刺激によるギャップジャンクションの役割について検討することで、効率的な再生歯の誘導技術につながると考えるに至った。

2. 研究の目的

再生医療の実現化のためには、その基本概念として、幹細胞、増殖因子、足場 (スキャッフオールド) の 3 つの要素が重要であると考えられている。本研究ではこれらに加え、細胞間結合と増殖因子シグナルのクロストークに着目し、これらをうまく組み合わせることで、より効率的な器官再生技術の開発に繋げようと考えた。

我々の研究グループでは、オーラルゲノムプロジェクトにて、歯に特異的に発現する遺伝子群の包括的なスクリーニングを行い、歯の発生段階においてギャップ結合分子の中でも Cx43 やパネキシン 3 (Panx3) が高い発現を示すことを見出した。またこれら遺伝子の欠損マウスの解析から、Cx43 欠損マウスにおいては、エナメル芽細胞の細胞極性の低下、エナメル基質の一つであるアメロプラスチンの顕著な発現低下が認められた。また Panx3 欠損マウスにおいては、骨や軟骨の形成異常を認め、歯においては象牙質形成不全が観察された。しかしながらこれまで、ギャップジャンクション分子と増殖因子とのクロストークを解析した報告はない。そこで我々は、歯の形成に関わるエナメル芽細胞や象牙芽細胞の分化過程におけるギャップジャンクション分子の役割と、それぞれの細胞分化に必要な増殖因子刺激において、Cx43 や Panx3 がどのように関わっているか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 包括的な遺伝子スクリーニングによるギャップジャンクション分子の発現様式の解析

これまで cDNA マイクロアレーを用いて歯および唾液腺等の口腔組織における遺伝子発現パターンを明らかにしてきた。しかしながらこれら解析は従来型のマイクロアレーであり、遺伝子発現の検出頻度は最新の手法と比較して低い。そこで一遺伝子あたり 23 のプローブを用いた新たなマイクロアレーを用いて、より正確な遺伝子発現パターンの決定を行う。さらに mRNA を次世代シーケンサーでダイレクトに読み込む RNA Sequence、遺伝子の転写開始点の翻訳状況を検討する CAGE 法、また一つ一つの細胞内での遺伝子発現を網羅的に解析する Single RNA sequence 法を用いて、歯の発生段階における遺伝子発現の詳細なデータベースを構築する。これらのデータから、歯に発現する細胞間結合分子を明らかにする。

(2) 歯関連細胞における分化誘導刺激でのギャップジャンクション分子の機能解析

歯胚を構成するエナメル芽細胞の誘導には、NT-4、TGF-beta1、BMP2、象牙芽細胞の分化誘導には BMP2、PDGF などの増殖因子が重要である。これら増殖因子等の刺激において、どのようにギャップジャンクション分子が関与するかについて、ギャップジャンクションの機能阻害剤である Oleamide、Cx43 や Panx3 に対する siRNA 等を用いて、機能阻害や分子発現抑制を行い、増殖因子刺激下での Smad、ERK などのリン酸化状況について検討を行う。

(3) ギャップジャンクション分子による細胞内カルシウムレベルの制御機構解明

ギャップジャンクションは細胞間においてカルシウムイオンの輸送に関与しているとともに、IP3 などのセカンドメッセンジャーの透過にも関わる。IP3 はさらに小胞体に結合し、小胞体からのカルシウムイオンの放出に関与する。そこでギャップジャンクションによって制御される細胞内カルシウムレベルが、増殖因子刺激による細胞内の情報伝達系に及ぼす影響をカルシウ

μイメージングを用いて解析を行う。

4. 研究成果

(1) 包括的な遺伝子スクリーニングによるギャップジャンクション分子の発現様式

包括的な遺伝子スクリーニングから、これまでのマイクロアレーのデータと同様に、Cx43 および Panx3 の発現が確認された。さらに Cx45 が歯胚の上皮細胞に発現していることが確認できた。Single cell RNA sequence の結果から、Cx43 は内エナメル上皮と分化したエナメル芽細胞、さらには分化した象牙芽細胞に発現が確認できた。一方、Panx3 は分化前の前象牙芽細胞にのみ発現を認め、エナメル上皮にはその発現を認めなかった。

またギャップジャンクション分子とは異なるが、CAGE 法を用いた解析においては、mRNA のみならず small RNA の発現も検出可能であった、特に miR875 に関しては歯の発生の初期段階において発現が確認でき、神経堤由来細胞の陥入歯胚上皮周囲への集積に関わっているという新たな知見を得た。

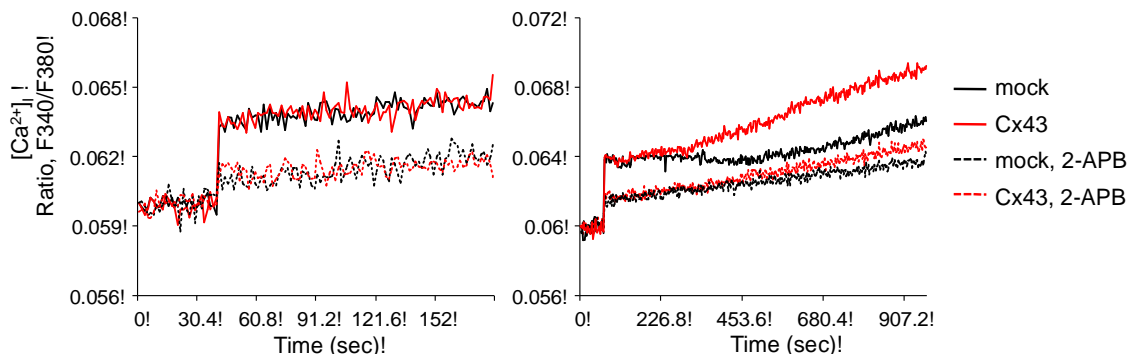
(2) 歯関連細胞における分化誘導刺激でのギャップジャンクション分子の機能解析

歯原性上皮細胞株である SF2 細胞を用いて NT-4、TGF-beta1、BMP2 を添加し、エナメル芽細胞に分化誘導させた際に、ギャップジャンクション阻害剤を併用して、その分化誘導効率の検討を行った。NT-4、TGF-beta1、BMP2 のいずれの刺激においても、ギャップジャンクション阻害剤である Oleamide の添加により、エナメル芽細胞分化の指標であるアメロプラスチンの発現低下が認められた。これは培養細胞の細胞密度により変化し、細胞同士が密な状況下で特にその誘導効率が低下することが明らかとなった。一方、歯原性間葉細胞であるマウス初代培養歯髄細胞に、BMP2、PDGF を添加し、象牙芽細胞分化の指標である Dspp の発現を検討した結果、Oleamide の添加により、Dspp の発現低下が認められた。このことから増殖因子刺激においては、いずれの増殖因子においても、ギャップ結合の有無が極めてその細胞分化誘導に重要であることが示唆された。Oleamide と同様の結果は、Cx43 や Panx3 の機能阻害ペプチドにおいても認められた。

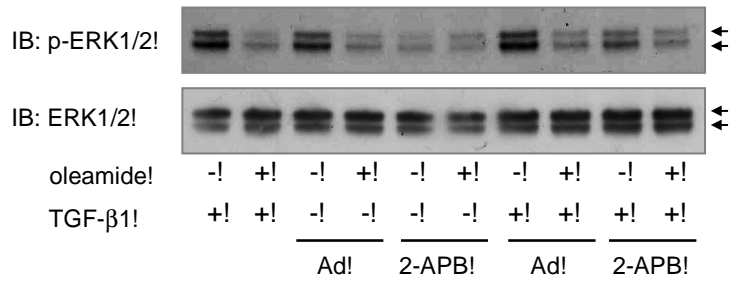
次にこれら増殖因子刺激による細胞内シグナル分子のリン酸化をウエスタンブロット法にて解析した結果、ギャップジャンクション阻害剤の有無にかかわらず、Smad や Akt のリン酸化には大きな変化は認められなかったが、ERK1/2 のリン酸化レベルは Oleamide の添加により著しく低下した。これまで歯原性上皮細胞株においては TGF-beta1 が、唾液腺上皮においては FGF10 が、Oleamide の添加により ERK1/2 のリン酸化阻害を生じることを見出していたが、今回その他の増殖因子全てにおいても同様の結果が確認された。

(3) ギャップジャンクション分子による細胞内カルシウムレベルの制御

歯原性上皮細胞株である SF2 細胞を用いて TGF-beta1 で刺激を行った際の細胞内カルシウムレベルについてカルシウムインジケータを用いて継時的定量解析を行った。



歯原性上皮細胞株 SF2 細胞に Cx43 を過剰発現させた細胞を作成し、小胞体からのカルシウム放出の阻害剤である 2-APB を用いて検討を行った。Cx43 を過剰発現させた細胞においては、コントロール細胞と比較して短時間におけるカルシウムレベルの上昇に関して、遺伝子導入の差による影響は認められなかった（上図：左）。このことは小胞体からのカルシウム放出に Cx43 はほとんど関与していないことが明らかとなった。一方で長時間観察したデータにおいては、徐々に上昇するカルシウムレベルが、Cx43 の過剰発現で促進されることから、Cx43 はギャップ結合を介して細胞内のカルシウムレベル上昇に関与していた。



次にOleamideと2-APBを添加した条件下で、ERK1/2のリン酸化を検討した結果、Oleamide存在下で、TGF-beta1誘導性のERK1/2のリン酸化が低下すること、2-APB存在下においても一部ERK1/2のリン酸化が低下することが判明した。一方で小胞体からカルシウムを放出するAdenophostin-A (Ad)の存在下ではTGF-beta1刺激によるERK1/2のリン酸化は若干亢進するが、この影響はOleamideによりキャンセルされた。

以上の結果から、ギャップジャンクションによる細胞内カルシウムレベルが、増殖因子刺激によるERK1/2の活性化に重要であることが示唆された。

以上の結果より、エナメル上皮の細胞分化においては、Cx43によるギャップ結合は必須であり、細胞間結合を密にすることで、効率よく細胞分化を誘導できることがわかった。これらの知見は歯の再生技術の開発に大きく貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakamura T, Iwamoto T, Nakamura HM, Shindo Y, Saito K, Yamada A, Yamada Y, Fukumoto S, Nakamura T.	4. 巻 17(8)
2. 論文標題 Regulation of miR-1-Mediated Connexin 43 Expression and Cell Proliferation in Dental Epithelial Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.3389/fcell.2020.00156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Han X, Yoshizaki K, Miyazaki K, Arai C, Funada K, Yuta T, Tian T, Chiba Y, Saito K, Iwamoto T, Yamada A, Takahashi I, Fukumoto S	4. 巻 293
2. 論文標題 The transcription factor NKX2-3 mediates p21 expression and ectodysplasin-A signaling in the enamel knot for cusp formation in tooth development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14572-14584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.003373.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukushima H., Shimizu K., Watahiki A., Hoshikawa S., Kosho T., Oba D., Sakano S., Arakaki M., Yamada A., Nagashima K., Okabe K., Fukumoto S., Jimi E., Bigas A., Nakayama KI., Nakayama K., Aoki Y., Wei W., Inuzuka H.	4. 巻 68
2. 論文標題 NOTCH2 Hajdu-Cheney Mutations Escape SCFFBW7-Dependent Proteolysis to Promote Osteoporosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Cell.	6. 最初と最後の頁 645-658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2017.10.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Saito K, Yamada A, Xue H, Funada K, Fukumoto E, Haruyama N, Iwamoto T, Takahashi I, Fukumoto S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Nephronectin plays critical roles in Sox2 expression and proliferation in dental epithelial stem cells via EGF-like repeat domains.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 45181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep45181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimizu K., Fukushima H., Ogura K., Lien EC., Nihira NT., Zang J., North BJ., Guo A., Nagashima K., Nakagawa T., Hishikawa S., Watahiki A., Okabe K., Yamada A., Toker A., Asara JM., Fukumoto S., Nakayama K., Nakayama KI., Inuzuka H., Wei W.	4. 巻 10
2. 論文標題 The SCF -TRCP E3 ubiquitin ligase complex targets Lipin1 for ubiquitination and degradation to promote hepatic lipogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 pii:eaah4117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1126/scisignal.aah4117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagashima K., Fukushima H., Shimizu K., Yamada A., Hidaka M., Hasumi H., Ikebe T., Fukumoto S., Okabe K., Inuzuka H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Nutrient-induced FNIP degradation by SCF -TRCP regulates FLCN complex localization and promotes renal cancer progression.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 9947-9960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.10.18632/oncotarget.14221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shahad al Thamin, 千葉雄太, 吉崎恵悟, Ling Ling Jia, 山田亜矢, 齋藤幹, 福本敏
2. 発表標題 内エナメル上皮の新規マーカーAmel oDの転写制御機構解明
3. 学会等名 第57回日本小児歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田亜矢
2. 発表標題 口腔上皮器官形成における細胞間結合の機能とその制御
3. 学会等名 第55回日本小児歯科学会大会 (学術賞受賞講演) (招待講演)
4. 発表年 2017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
研究分担者	犬塚 博之 (Inuzuka Hiroyuki) (20335863)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	福本 敏 (Fukumoto Satoshi) (30264253)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	阪井 丘芳 (Sakai Takayoshi) (90379082)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	保住 建太郎 (Hozumi Kentaro) (10453804)	東京薬科大学・薬学部・講師 (32659)	平成28～29年度まで 研究機関の異動により、当該研究の継続が困難に なったため。
研究分担者	石河 真幸 (Ishikawa Masaki) (60432936)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	平成28～29年度まで 解析終了のため。
研究分担者	福島 秀文 (Fukushima Hidefumi) (70412624)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	平成28～29年度まで 退職し、応募資格喪失のため。