

令和 5 年 6 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：2018～2022

課題番号：18H03009

研究課題名(和文) 上皮系細胞から上皮間葉転換(EMT)誘導を応用した歯胚形成

研究課題名(英文) The tooth germ is formed utilizing induction of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) from epithelium

研究代表者

齋藤 幹 (Saito, Kan)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：40380852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯は上皮と間葉系細胞との相互関係により形成される。しかし、上皮細胞から間葉細胞を誘導する上皮間葉転換(EMT)を応用すれば、上皮系の単一細胞で器官の発生が可能となる。我々は以前の研究で、Sox21欠損マウスがEMTを誘導する事を発見した。そこで、本研究では、硬組織形成におけるEMTのメカニズムを解析する。

まず、Sox21陽性細胞を探索したところ、T、B細胞で発現していた。そこで、Sox21の発現を抑制したリンパ球とマクロファージを共培養したところ、破骨細胞分化が促進された。この事から、Sox21の欠損がEMTを起こす反面、破骨細胞分化を促進し、骨形成不全様症状を引き起こすことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではSox21を欠損させることにより、骨形成が抑制された。そのため、Sox21が骨粗鬆症の改善に貢献する可能性がある。また、Sox21はヒト13番染色体に位置する。13q欠失症候群のうち、Sox21が存在する13q32部が欠損すると重篤化する事が知られており、知的能力障害、成長遅延や癌化リスクの上昇が報告されている。そのため、本研究結果は13q欠失症候群における病態解明にも寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Teeth are formed by the interrelationship between epithelial and mesenchymal cells. However, if epithelial-mesenchymal transition (EMT) which induces mesenchymal cells from epithelial cells is used, organ will generate from single epithelial cell. In our previous study, we found that Sox21 KO mice induce EMT. Therefore, in this study, we analyze the mechanism of EMT in hard tissue formation.

At first, Sox21 was expressed in T and B cells.

Therefore, when macrophages and lymphocytes with suppressed expression of Sox21 were co-cultured, osteoclast differentiation was enhanced. This indicates that while Sox21 deficiency causes EMT, it also promotes osteoclast differentiation and causes osteogenesis imperfecta-like symptoms.

研究分野：小児歯科

キーワード：硬組織形成 EMT

1. 研究開始当初の背景

毛や汗腺、歯等の器官の発生課程やその関連分子は似通っている。神経堤由来の上皮は上皮間葉転換(EMT)により、間葉系へと変化する。この上皮と神経堤由来の間葉細胞の相互作用により、外胚葉器官が形成される。そのため、外胚葉性器官の再生には、上皮系細胞と間葉系細胞を規則的に配置し、分化誘導する必要がある。しかし、エナメル芽細胞と間葉系細胞の規則正しい配列は困難である。我々は以前に iPS 細胞からエナメル芽細胞を誘導することに成功したが、歯の完全再生はまだ難しいのが現状である。

我々は以前の研究で、上皮系細胞であるエナメル芽細胞で Sox21 が発現する事を発見した。13q 欠失症候群では、13 番染色体長腕の一部が欠損する疾患で、症状は欠損部位と長さにより異なる。Sox21 が位置している 13q31.3 から 13q 33.1 の非常に狭い範囲が欠損している患者では、歯に異常が見られた¹⁾。そのため、歯の形成に Sox21 が重要であると仮定し、歯の分化過程における Sox21 の役割について検討した。その結果、エナメル質が形成されないことが判明した³⁾。以前は、上皮系細胞と間葉系細胞は明確に分けられていたが、近年では EMT が提唱され、上皮と間葉の境界が曖昧となっている。ウィリアムズ症候群、歌舞伎症候群やディジョージ症候群などではエナメル質形成不全だけではなく、特徴的な顔貌、心疾患なども見られる。これは、神経堤由来の未分化上皮から発生分化するため、神経堤由来外胚葉の分化異常により、心臓、頭部の骨や歯にも異常が出現することになる。このことから、上皮由来のエナメル質と間葉由来の骨を結びつける経路が必ず存在すると考えられる。

2. 研究の目的

歯の分化に関する研究は様々な所で行われており、細菌では歯原性上皮系細胞と歯原性間葉系細胞を混ぜたアグリゲーション法を用いることによって、歯が形成されることが報告されたが²⁾、現状ではまだまだ困難である。そこで、上皮系細胞から間葉系細胞を誘導する上皮間葉転換(EMT)を応用し、上皮間葉相互作用を起こせば、上皮系の単一細胞で外胚葉器官の分化が可能となる。そのため、上皮からの外胚葉器官形成の研究が注目されているが、硬組織における EMT 研究はほとんど行われていない。我々は以前の研究で、Sox21 欠損マウスの上皮細胞では E カドヘリンの減少と N カドヘリン、ビメンチンの増加が見られたことから、EMT 誘導のモデルマウスとして有用である事が判明した³⁾。そこで、本研究では、硬組織形成における EMT のメカニズムを解析する。

3. 研究の方法

- (1) Sox21 欠損マウスを用いて、体重測定、透明骨格標本、マイクロ CT から、Sox21 欠損における骨格型への影響を検討した。
- (2) 骨代謝に関連する細胞のうち、Sox21 を発現する細胞を qPCR 法にて特定し、骨形成過程における Sox21 陽性細胞を検討した。
- (3) 野生型と Sox21 欠損マウスの骨髄細胞をマイクロアレイを行い、GO 解析とパスウェイ解析から、Sox21 が骨代謝に与える影響を検討する。
- (4) リンパ球における Sox21 の発現を抑制し、マクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞と共培養することにより破骨細胞分化の誘導能を検討した。

4. 研究成果

- (1) 出生直後の野生型と Sox21 欠損マウスでは身長、体重共に有意な差は見られなかった。その後、徐々に身長と体重の差は広がり、4 週間後に Sox21KO マウスでは身長と体重が約 30% 減少していた。そこで、生後 2 日目のマウスを用いて透明骨格標本作製し、硬骨と軟骨の形成を評価した。その結果、野生型と比べて Sox21 欠損マウスでは頭蓋骨部の硬骨の菲薄化と、眼窩部と耳小骨部の石灰化が遅れ、軟骨が残存していたことから、膜性骨化と軟骨内骨化の遅延が示唆された。更に大腿骨の骨梁を測定したところ、Sox21KO マウスでは骨梁数が有意に低下しており、Sox21 欠損により骨粗鬆症に類似した表現系が見られた。そこで、生後 4 週齢のマウス的大腿骨を用いてマイクロ CT にて骨形態を解析した。その結果、Sox21 欠損マウスでは骨量、骨表面積が減少していた。その一方で骨梁厚さには変化がなかったが、骨量数が減少したことから、骨量間隙と骨量空隙の増加が見られた。このことから、Sox21 欠損は骨粗鬆症様の骨形態を示す事が判明した。
- (2) 骨粗鬆症には骨芽細胞抑制による低回転型と、破骨細胞活性化による高回転型がある。そこで、Sox21 を発現する細胞を検討した。マウス頭蓋冠由来骨芽細胞と脾臓由来マクロファージでは若干の発現を認めたが、骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞とマクロファージの細胞株である RAW264.7 細胞では発現が見られなかった。その一方で骨髄細胞では Sox21 が発現しており、末梢血では強い発現を認めた。そこで、マグネットビーズを用いて末梢血を分離したところ、T 細胞と B 細胞で Sox21 が発現しており、NK 細胞や樹状細胞では発現していない事が判明した。そこで、Sox21 が骨髄細胞で発現していたことから、直接的影響を評価す

るために野生型と Sox21 欠損マウスの骨髄細胞から破骨細胞前駆細胞を抽出し破骨細胞分化誘導培養し、TRAP 染色を行って破骨細胞分化誘導能を評価した。その結果、単核 TRAP 陽性細胞、多核 TRAP 陽性細胞の数に大きな変化は見られなかった。このことから、骨髄や血液に含まれるマクロファージ以外の細胞を介して、間接的に破骨細胞分化が調整されていると考えられた。

- (3) Sox21 が骨髄細胞で発現していたことから、骨髄細胞を用いたマイクロアレイの結果から、GO 解析とパスウェイ解析を行った。その結果、刺激反応、防御反応、免疫反応などが抑制され、免疫不全傾向を示した。
- (4) マウス末梢血から回収したリンパ球に対して Sox21 又は免疫不全関連分子の発現を抑制し、マクロファージの細胞株である RAW264.7 細胞と共培養したところ、破骨細胞分化誘導が促進した。

Sox21 はヒト 13 番染色体に存在する。13q 欠失症候群は第 13 番染色体の長腕の一部が欠損する疾患であり、患者により欠損する部位が異なり、症状も欠損部位に依存して変化する。その内、13q32 を欠損した場合は重篤化する事が知られており、知的能力障害、成長遅延、精神疾患などが重症化し、がん化や白血病のリスクが増加する事が報告されている。Sox21 がこの 13q32 に位置することから、Sox21 欠損が成長遅延の一因である可能性が考えられる。また、Sox21 欠損マウスでは骨粗鬆症様症状も引き起こすことから、13q 欠失症候群の病態解明の糸口になる可能性がある。更に、13q32 の欠失はがん化や白血病リスクが増加することから、Sox21 欠損による EMT がその一因である可能性も考えられる。

引用文献

- 1) Maria Kirchhoff, Anne-Marie Bisgaard, Radka Stoeva, Boyan Dimitrov, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Jean-Pierre Fryns, Hanne Rose, Liliana Grozdanova, Ivan Ivanov, Kathelijn Keymolen, Christina Fagerberg, Lisbeth Tranebjaerg, Flemming Skovby, Margarita Stefanova. Phenotype and 244k array-CGH characterization of chromosome 13q deletions: an update of the phenotypic map of 13q21.1-qter. *Am J Med Genet A*. 2009 May;149A(5):894-905. doi: 10.1002/ajmg.a.32814.
- 2) Masaki J Honda, Yuka Shinmura, Yoshinori Shinohara. Enamel tissue engineering using subcultured enamel organ epithelial cells in combination with dental pulp cells. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):261-7. doi: 10.1159/000151743.
- 3) Kan Saito, Frederic Michon, Aya Yamada, Hiroyuki Inuzuka, Satoko Yamaguchi, Emiko Fukumoto, Keigo Yoshizaki, Takashi Nakamura, Makiko Arakaki, Yuta Chiba, Masaki Ishikawa, Hideyuki Okano, Irma Thesleff, Satoshi Fukumoto. Sox21 Regulates Anapc10 Expression and Determines the Fate of Ectodermal Organ. *iScience*. 2020 Jul 24;23(7):101329. doi: 10.1016/j.isci.2020.101329.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 13件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Al Thamin S, Chiba Y, Yoshizaki K, Tian T, Jia L, Wang X, Saito K, Li J, Yamada A, Fukumoto S.	4. 巻 236(11)
2. 論文標題 Transcriptional regulation of the basic helix-loop-helix factor AmeloD during tooth development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of cellular physiology	6. 最初と最後の頁 7533-7543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30389	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Yamada A, Yoshizaki K, Ishikawa M, Saito K, Chiba Y, Fukumoto E, Hoshikawa S, Chiba M, Nakamura T, Iwamoto T, Fukumoto S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Connexin 43-mediated gap junction communication regulates ameloblast differentiation via ERK1/2 phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 748574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2021.748574	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 -
1. 著者名 Chiba Y, Yoshizaki K, Tian T, Miyazaki K, Martin D, Genomics and Computational Biology Core, Saito K, Yamada A, Fukumoto S	4. 巻 -
2. 論文標題 Integration of single-cell RNA- and CAGE-seq reveals tooth-enriched genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00220345211049785	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Jia L, Chiba Y, Saito K, Yoshizaki K, Tian T, Han X, Mizuta K, Chiba M, Wang X, Al Thamin S, Yamada A, Fukumoto S.	4. 巻 237(2)
2. 論文標題 The tooth-specific basic-helix-loop-helix factor AmeloD promotes differentiation of ameloblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of cellular physiology	6. 最初と最後の頁 1597-1606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30639	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Iwata K, Kawarabayashi K, Yoshizaki K, Tian T, Saito K, Sugimoto A, Kurogoushi R, Yamada A, Yamamoto A, Kudo Y, Ishimaru N, Fukumoto S, Iwamoto T.	4. 巻 237(3)
2. 論文標題 von Willebrand factor D and EGF domains regulates ameloblast differentiation and enamel formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of cellular physiology	6. 最初と最後の頁 1964-1979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30667	査読の有無 有
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 Saito K, Michon F, Yamada A, Inuzuka H, Yamaguchi S, Fukumoto E, Yoshizaki K, Nakamura T, Arakaki M, Chiba Y, Ishikawa M, Okano H, Thesleff I, Fukumoto S.	4. 巻 23(7)
2. 論文標題 Sox21 regulates Anapc10 expression and determines the fate of ectodermal organ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iSCIENCE	6. 最初と最後の頁 101329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101329	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 Chiba Y, Saito K, Martin D, Boger E, Rhodes C, Yoshizaki K, Nakamura T, Yamada A, Morell JM, Yamada Y, Fukumoto S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Single-cell RNA-sequencing from mouse incisor reveals dental epithelial cell-type specific genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00841	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 Hoshikawa S, Shimizu K, Watahiki A, Chiba M, Saito K, Wei W, Fukumoto S, Inuzuka H.	4. 巻 34(11)
2. 論文標題 Phosphorylation-Dependent Osterix Degradation Negatively Regulates Osteoblast Differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 14930-14945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001340R	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Chiba Y, Yoshizaki K, Saito K, Ikeuchi T, Iwamoto T, Rhodes C, Nakamura T, de Vega S, Morell JR, Boger E, Martin D, Hino R, Inuzuka H, Bleck KE. C, Yamada A, Yamada Y, Fukumoto S.	4. 巻 295(45)
2. 論文標題 G-protein coupled receptor Gpr115 (Adgrf4) is required for enamel mineralization mediated by ameloblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15328-15341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014281	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Hino R, Yamada A, Chiba Y, Yoshizaki K, Fukumoto E, Iwamoto T, Maruya Y, Otsu K, Harada H, Saito K, Fukumoto S.	4. 巻 30(3)
2. 論文標題 Melnick-Needles syndrome tooth development filamin root formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 208-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pdj.2020.09.003	査読の有無 有
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 Wang W, Chiba Y, Jia L, Yoshizaki K, Saito K, Yamada A, Qin M, Fukumoto S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression Patterns of Claudin Family Members During Tooth Development and the Role of Claudin-10 (Clcn10) in Cytodifferentiation of Stratum Intermedium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 595593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.595593	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 Saito K, Chiba Y, Yamada A, Fukumoto S.	4. 巻 30(3)
2. 論文標題 Identification and function analysis of ameloblast differentiation-related molecules using mouse incisors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 219-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pdj.2020.08.001	査読の有無 有
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 Chiba Yuta, He Bing, Yoshizaki Keigo, Rhodes Craig, Ishijima Muneaki, Bleck Christopher K. E., Stempinski Erin, Chu Emily Y., Nakamura Takashi, Iwamoto Tsutomu, de Vega Susana, Saito Kan, Fukumoto Satoshi, Yamada Yoshihiko	4. 巻 294
2. 論文標題 The transcription factor AmeloD stimulates epithelial cell motility essential for tooth morphology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3406 ~ 3418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005298	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ishikawa M, Williams G, Forcinito P, Ishikawa M, Petrie JR, Saito K, Fukumoto S, Yamada Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Pannexin 3 ER Ca ²⁺ channel gating is regulated by phosphorylation at the Serine 68 residue in osteoblast differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 18759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55371-9.	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 Nakamura T, Iwamoto T, Nakamura MH, Shindo Y, Saito K, Yamada A, Yamada Y, Fukumoto S, Nakamura T.	4. 巻 -
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 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 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 Xue, Yoshizaki Keigo, Miyazaki Kanako, Arai Chieko, Funada Keita, Yuta Tomomi, Tian Tian, Chiba Yuta, Saito Kan, Iwamoto Tsutomu, Yamada Aya, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi	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 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chiba Yuta, He Bing, Yoshizaki Keigo, Rhodes Craig, Ishijima Muneaki, Bleck Christopher K. E., Stempinski Erin, Chu Emily Y., Nakamura Takashi, Iwamoto Tsutomu, de Vega Susana, Saito Kan, Fukumoto Satoshi, Yamada Yoshihiko	4. 巻 294
2. 論文標題 The transcription factor AmeloD stimulates epithelial cell motility essential for tooth morphology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3406 ~ 3418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005298	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 賈 玲玲、千葉雄太、吉崎恵悟、齋藤 幹、福本 敏
2. 発表標題 転写因子AmeloDが制御する新規エナメル質形成分子機序の解明
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉雄太、齋藤 幹、日野綾子、新垣真紀子、小山田優、丸谷由里子、山田 亜矢、福本 敏
2. 発表標題 シングルセルRNAシーケンスを用いた歯の発生に関わる全細胞の網羅的遺伝子解析
3. 学会等名 日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

歯をつくる細胞から毛髪細胞へ変化させる分子を同定
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/07/press20200728-03-Sox.html>
 歯の石灰化を制御する新規の受容体を同定
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/11/press20201106-01-enamel.html>

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	福本 敏 (Fukumoto Satoshi) (30264253)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関