

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22689053

研究課題名(和文)象牙芽細胞分化における細胞間結合の役割解明とその制御法の開発

研究課題名(英文)Roles of gap junction proteins in odontoblast differentiation

研究代表者

岩本 勉 (IWAMOTO, Tsutomu)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90346916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円、(間接経費) 5,520,000円

研究成果の概要(和文)：我々は歯の発生過程において、特に象牙質形成を担う象牙芽細胞の分化に関わる分子群の同定を目的とし、バイオインフォマティカル解析手法を用いて遺伝子の同定を試みている。そこで、新奇細胞細胞間結合蛋白質であるパネキシン3が歯に強く発現していることを見出した。実際、マウス歯胚におけるパネキシン3の発現をin situ hybridization法や免疫組織学的に検討を行ったところ、象牙芽細胞、特に前象牙細胞に強く発現していた。さらにパネキシン3の機能を明らかにするために、歯乳頭由来細胞株mDP細胞を用いて解析を進めたところ細胞内のATP-AMPKシグナル伝達経路を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we had performed bioinformatical analysis to find the responsible gene which regulate odontoblast differentiation. We had found that pannexin3, a new member of gap junction protein, pannexin family, was preferentially expressed in tooth cDNA library. In fact, in situ hybridization and immunostaining revealed that pannexin3 was expressed in preodontoblast layer. To analyze the function of pannexin3 in odontoblast, mDP cell, a mouse dental papilla derived cell line, was used in this study. We found that pannexin3 regulate cell proliferation and differentiation by releasing intracellular ATP and activating AMPK signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯胚発生 象牙芽細胞 細胞間結合 パネキシン3

1. 研究開始当初の背景

口腔組織を中心とした再生研究は、多くの意味合いから注目を集めている。1つは歯や唾液腺は上皮-間葉組織の相互作用により生じる器官であり、同様な発生過程を経る毛、肺、腎臓などの様々な組織発生メカニズムの理解に繋がるのみならず、これら組織の再生に直接応用できる技術となりうるからである。もう1つは再生医療に用いる幹細胞の供給源として、乳歯の中に存在する歯髄幹細胞が注目されている。歯髄中には従来より幹細胞の存在が注目されており、骨髄や臍帯血に次ぐ幹細胞の供給源として期待されている。乳歯の場合は、永久歯との交換時期に細胞を得ることができ、他の幹細胞と比較して、非侵襲的であること、また、ほぼすべてのヒトを対象とできることなど、多くのメリットを有する。また、近年注目されている iPS 細胞は、皮膚の線維芽細胞から4つの遺伝子を導入することで作成できる万能細胞として期待されているが、分化した細胞からの iPS 化は、その確率が著しく低いことが知られている。しかしながら歯髄細胞を用いた iPS 化は、他の組織細胞と比較して高率に行えることが分かり、単なる歯髄幹細胞の供給源のみならず、iPS 細胞の作成に適した細胞の供給源として重要であるといえる。また、口腔粘膜細胞中に存在する上皮系の幹細胞は角膜の再生に有効であることがわかり、口腔組織は、全身の組織再生に利用あるいは応用可能な幹細胞研究の宝庫といえよう。このような観点から、小児歯科領域あるいは矯正治療で抜歯した歯の利用は、歯科医療の領域拡大の為にブレイクスルーとなる可能性を秘めているといえる。

口腔組織の利用には、上述のさまざまな可能性を秘めているが、なぜ歯髄細胞には未分化な細胞集団が多く含まれ、それが生体内でどのように利用されているのか。歯の発生過程において、その分化に関わる細胞集団が、どのように最終形態を有する細胞(例えばエナメル芽細胞や象牙芽細胞等)へと変わっていくのか、そのメカニズムを詳細に解明し理解していくことで、歯由来細胞の分化メカニズムの理解や、これら細胞の再生医療への応用へ貢献できるものと考えられる。

従来より、我々の研究グループでは、歯の発生過程において重要な分子をスクリーニングおこなうことで、個々の細胞分化や歯の形態形成に関わる分子機能の解明を試みてきた。エナメル芽細胞に特異的に発現するエナメル基質のひとつアメロプラスチンが、エナメル芽細胞の極性決定と、分化の維持に重要であることを明らかにした(Fukumoto Set al. *J Cell Biol* 2004)。また、このアメロプラスチンの転写制御因子としてエピプロフィン/SP6 を同定し(Nakamura T et al. *J Biol Chem* 2004)、本遺伝子の欠損マウスがエナメル質を欠失した多数の歯を有するこ

とを明らかにした(Nakamura T et al. *J Biol Chem* 2008)。さらにアメロプラスチンの発現制御に関わる神経成長因子を明らかにし(Yoshizaki K et al. *J Biol Chem* 2008)、アメロプラスチンが歯原性腫瘍の原因遺伝子の可能性と、ヒトのエナメル芽細胞の増殖制御に応用可能であることを示した(Sonoda S, Iwamoto T et al. *J Biol Chem* 2009)。このように、組織特異的分子の同定が、歯の発生及び病体のメカニズムの解明に有効な手段であることが分かった。

2. 研究の目的

本研究では、従来より行ってきた歯特異的分子のスクリーニングと、その機能解析を行うことを目的とした。我々は歯胚発生に関与する各種因子の位置づけの解明をする為に歯の遺伝子ライブラリーの作成を行い、この遺伝子ライブラリー情報を基に、バイオインフォマティカル解析手法を用いた。

今回、バイオインフォマティカル解析から、我々は新奇のギャップ結合蛋白として pannexin3(Panx3)が、歯原性間葉細胞から象牙芽細胞に分化する過程において、前象牙芽細胞に特異的に発現していることを見いだした。そこで我々は、この Panx3 が、歯髄幹細胞から象牙芽細胞の分化過程を規程する分子であると予想し、本分子の象牙芽細胞分化過程における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Panx3 の歯胚における発現の検討

出生直後のマウス歯胚の凍結切片を作成し、抗 Panx3 特異抗体を用いて、免疫組織学的検討を行った。

(2) マウス歯乳頭細胞由来細胞株 mDP における機能解析

象牙芽細胞における Panx3 の機能解析をするためにマウス歯乳頭由来細胞株 mDP6 細胞を用いた。mDP細胞の分化には BMP2 を用いた。

(3) Panx3 過剰発現細胞株の作成

pEF1 プロモーターおよび V5、His タグが付与されたベクターに Panx3 CDS をサブクローニングし、Panx3 発現ベクターを作成した。遺伝子導入には、Amaxa のエレクトロポレーション法を採用した。コントロールには empty ベクターを用いた。

(4) 内因性 Panx3 の発現抑制

内因性 Panx3 の発現の抑制する為に、siRNA 法を用いた。4種類の異なる siRNA 配列を準備し、RNAi max を用いたりポフェクション法にて、細胞内へ導入し、RT-PCR 法およびウエスタンブロットティング法にて抑制効率を検討した。

(5) ATP 排出測定

細胞培養上清に排出された ATP をルシフェリン法を用いて定量を行った。

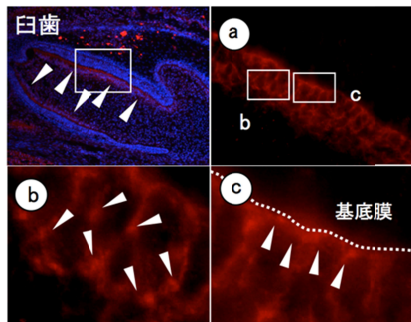
(6) 細胞内シグナル伝達経路の解析
それぞれの特異抗体を用いてウェスタンブロットング法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) Panx3 の歯胚における発現の検討

出生直後のマウス歯胚における Panx3 の発現を明らかにするために、免疫組織学的検討を行った。その結果、Panx3 は歯の間葉細胞である前象牙芽細胞に特異的に発現し、特に細胞-細胞間、および細胞-基底膜間にシグナルの強い集積を認められた

(図: 赤色が Panx3 を示し、青は核を示す)



このことは細胞-細胞間において、ギャップジャンクション蛋白としての機能を有し、さらには、細胞-細胞外基質間において、ヘミチャネルとしての役割を有していることを示唆するものであった。

(2) マウス歯乳頭細胞由来細胞株 mDP における機能解析

マウス歯乳頭由来細胞株 mDP6 細胞は、成長因子である BMP2 の存在下において、象牙芽細胞へと分化する細胞であり、本細胞における Panx3 の発現を解析したところ、もともと Panx3 はわずかに発現しており、その発現が BMP2 の存在下において培養することによって増強されることがわかった。

(3) Panx3 過剰発現細胞株の作成

mDP 細胞における Panx3 の役割を明らかにするために、Panx3 CDS の発現ベクターを準備した。その発現細胞をエレクトロポレーション法にて、mDP 細胞に遺伝子導入を行い、選択培地を用いることによって、発現安定細胞株の作成を行った。興味深いことに、Panx3 発現安定細胞株はコントロール細胞と比較し、その増殖が抑制され、同時に細胞周期制御分子である p21 が誘導されることがわかった。また、その一方で BMP2 誘導の細胞分化が促進されることも明らかとなった。

(4) 内因性 Panx3 の発現抑制

さらに mDP 細胞の増殖および分化における Panx3 の機能を明らかにするために、siRNA 法による内因性 Panx3 の発現の抑制を試みた。まず最初に内因性 Panx3 の発現を抑制する遺伝子配列を決定するために、4 種類の異なる siRNA 配列を準備した。そのうち、3 つの異なる配列において、それぞれ内因性の Panx3 の発現を抑制したため、それぞれ独立して 3 つの siRNA を実験に用いた。これら siRNAs はいずれも p21 の発現誘導を阻害した。さらに、BMP2 によって誘導される mDP 細胞の分化

も抑制された。これらの結果より、Panx3 が歯髄間葉細胞の増殖制御ならびに分化に深く関わっていることを示唆された。

(5) ATP 排出測定

これまで我々は Panx3 が軟骨細胞や骨芽細胞において、細胞内の ATP を排出することによって、細胞内のシグナル伝達経路に影響を及ぼし、その増殖と分化を制御することを明らかにしてきた。そこで、象牙芽細胞においても同様の機能が考えられた為、Panx3 を過剰発現した mDP 細胞を用いて細胞外に排出される ATP 量の測定を行った。その結果、Panx3 によって、細胞内の ATP が有意に排出されることがわかった。このことは前象牙芽細胞においても基底膜側に開口するヘミチャネルとして機能していることが示唆された。

(6) 細胞内シグナル伝達経路の解析

AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は人から酵母まで真核細胞に高度に保存されているセリン・スレオニンキナーゼの一種として、細胞内のエネルギーセンサーとして重要な役割を担っている。しかしながら、歯の発生過程におけるその役割は不明である。そこで、我々は Panx3 が細胞内の ATP を細胞外に排出することから、その結果として、AMPK が活性化するのではないかと考えた。

そこで、mDP が分化する過程における AMPK のリン酸化をウェスタンブロットング法にて検討したところ、mDP 細胞が分化する過程で、AMPK のリン酸化は促進され、Panx3 を過剰発現することによって、さらにリン酸化が活性化されることがわかった。その一方で、siRNA によって、内因性の Panx3 を阻害する方法や Panx3 機能阻害ペプチドを用いることによって、AMPK のリン酸化が阻害されることが明らかになった。

AMPK を活性化することによって、p21 の発現が誘導され、また AMPK が BMP2 によって誘導される Smad シグナル伝達経路の活性化に関わっていることも明らかとなった。

以上の結果から、前象牙芽細胞において、Panx3 は細胞内の ATP-AMPK シグナル伝達経路を活性化することによって、細胞の増殖と分化を制御していることが示唆された。

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 6 件)

Ishikawa M, Iwamoto T, Fukumoto S, Yamada Y., Pannexin 3 inhibits proliferation of osteoprogenitor cells by regulating Wnt and p21 signaling. *J Biol Chem.* 289(5): 2839-2851. 2014 査読有

DOI:10.1074/jbc.M113.523241.

Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y,

Fukumoto S. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem.* 2012 287(13):10590-10601. 査読有
doi: 10.1074/ jbc. M111.285874.

Kamasaki Y, Nakamura T, Yoshizaki K, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Maruya Y, Iwabuchi K, Furukawa K, Fujiwara T, Fukumoto S., Glycosphingolipids regulate ameloblastin expression in dental epithelial cells. *J. Dent. Res.*, 2012 Jan;91(1):78-83. 査読有
DOI: 10.1177/ 0022034511424408.

Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y., Pannexin 3 functions as an ER Ca²⁺ channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol.* 27; 193(7):1257-1274. 2011 査読有
DOI:10.10.83/jcb.201101050.

Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Ishikawa M, de Vega S, Fukumoto S, Yamada Y., Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2010; 285(24):18948-18958. 査読有
DOI: 10.1074/ jbc.M110. 127027.

Nun W, Iwamoto T, Sugawara Y, Futaki M, Yoshizaki K, Yamamoto S, Yamada A, Nakamura T, Nonaka K, and Fukumoto S., PDGFs regulate tooth germ proliferation and ameloblast differentiation., *Archives of Oral Biology*, 2010, 55(6):426-434. 査読有
DOI: 10.1016/j.archoralbio.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 岩本 勉, 歯から全身へー歯髄幹細胞の可能性ー, 第 32 回日本小児歯科学会中四国地方会, 2013.11.24 岡山大学創立五十周年記念館 (岡山県)
2. 長谷川智一、赤澤友基、帖佐直幸、吉村善隆、浅川剛吉、石崎 明、岩本 勉、ヒト乳歯歯髄細胞におけるSDF-1の発現調節機構について、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山コンベンションセンター、2013.9.22 (岡山県)
3. 岩本 勉、骨・軟骨形成過程におけるギャップ結合分子パネキシン3の機能解析、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会サテライトシンポジウム、岡山コンベンションセンター、2013.9.20 (岡山県)
4. 福本 敏、二木正晴、岩本 勉、中村卓史、山田亜矢、唾液腺発生過程におけるConnexin43-FGF10 シグナルの解析、第 51 回日本小児歯科学会大会、長良川国際会議場、2013.5.23 (長野県)

5. Iwamoto T, Ishikawa M, Yoshizaki K, Yamada A, Nakamura T, Yamada Y, Fukumoto S., Pannexin 3, a gap junction protein, regulates odontoblast differentiation. The 90th General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research (IADR). Iguacu Falls Convention Center. 2012.6.22. (イグアスフォールズ、ブラジル)
6. 岩本 勉、小野真理子、二木正晴、菅原優、山田亜矢、中村卓史、福本 敏、エナメル芽細胞分化過程におけるテトラスパニンCD9の発現とその役割、第50回日本小児歯科学会大会、東京国際フォーラム、2012.05.12 (東京都)
7. Iwamoto T, Ishikawa M, Yoshizaki K, Nakamura T, Yamada A, Yamada Y, Fukumoto S. Pannexin 3, a gap junction protein, regulates proliferation through AMPK pathway in odontoblasts, 2012 American society for Biochemistry and Molecular Biology Annual meeting, San Diego Convention Center, USA, 2012.4.25(サンディエゴ、米国)
8. 岩本 勉、象牙芽細胞分化制御機構の同定とその応用、第 49 回日本小児歯科学会大会、いわて県民情報交流センター・アイーナ、2011.11.29 (岩手県)
9. 岩本 勉、象牙芽細胞分化における細胞外マトリックス(ECM)の役割、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会、長良川国際会議場、2011.10.1 (長野県)
10. Iwamoto T, Sugawara Y, Ono M, Yamada A, Nakamura T, Fukumoto S., Pannexin 3 plays a critical role for odontoblast differentiation, American Society For Bone And Mineral Research (ASBMR) 2011 Annual Meeting, San Diego Convention Center, USA, 2011.9. 18 (サンディエゴ、米国)
11. 岩本 勉、福本 敏、歯および軟骨細胞における Pannexin 3 の役割、第 9 回口腔医学科学フロンティア学術集会、九州大学歯学部本館 1 階、2011.3.5 (福岡県)
12. Iwamoto T, Ono M, Arakaki M, Nakamura T, Yamada A, Fukumoto S., New gap junctional protein pannexin 3 regulates tooth, cartilage and bone development., Harvard-Forsyth-Tohoku Research Workshop, Belfer Case Study Room, CGIS South, Harvard University, 2011.1.7 (ボストン、米国)
13. 岩本 勉、中村卓史、吉崎恵悟、山田亜矢、福本 敏、象牙芽細胞分化におけるギャップ結合分子の発現および機能解析、第 52 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、タワーホール船堀、

2010.9.22 (千葉県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 勉 (IWAMOTO, Tsutomu)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・教授

研究者番号：90346916

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：