

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390460

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Function and regulation of gap junction on oral epithelium organogenesis

研究代表者

山田 亜矢 (Yamada, Aya)

東北大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40295085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔組織に由来する発生器官である唾液腺の発生過程におけるコネクシン43の発生制御メカニズムの解明を目的として研究を行った。その結果、唾液腺の発生過程においてコネクシン43は、発生の初期段階から腺房の上皮細胞特異的に発現し、その遺伝子欠損マウスでは唾液腺の形成が阻害されることを見いだした。さらに、唾液腺器官培養におけるコネクシン43の機能阻害ペプチドを用いた解析からも同様の結果が得られた。

以上の結果から、細胞間結合分子(コネクシン43)が唾液腺の腺房発生において重要な分子であり、細胞同士がギャップ結合を介して緊密に接していることが、唾液腺組織の分化に必須であることが解った。

研究成果の概要(英文)：Connexin 43 is one of the gap junction protein. To understand the role of connexin 43 (Cx43) in salivary gland development, first we examined the expression of Cx43 by immunostaining using their specific antibody. Cx43 expressed terminal bud epithelium of salivary gland, but not in mesenchymal tissue. In Cx43 knockout mice, branching morphogenesis of submandibular gland was dramatically inhibited. In presence of inhibitory peptide for Cx43 function, branching morphogenesis of salivary gland organ culture was also inhibited as similar to Cx43 knockout mice. From our results, Cx43 is necessary for salivary gland development and terminal bud branching. Further, gap junctional communication is important for the determination of cell fate. These information is useful for understanding the molecular mechanism of salivary gland development and regeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 細胞間結合 ギャップ結合 コネクシン43

### 1. 研究開始当初の背景

現在においても、歯科の2大疾患である齲蝕と歯周病の撲滅を目指す中、歯科保健活動の充実や、フッ化物の応用などにより、小児の齲蝕は年々減少傾向にある。しかしながら、既に齲蝕を有している、あるいは歯周病に罹患しているものは未だに多く、今後も歯の喪失に対する対応が重要であることは否めない。また、口腔乾燥やドライアイなどの腺組織に起因する疾患も、近年その対象者が増加傾向にあり、早急な対応が必要と言える。

近年の再生医学的なアプローチにより、胎児期の歯胚由来細胞を用いることで、人工的な歯の再生に成功したとの報告もあり、また永久歯との交換で脱落した乳歯の内部に残る歯髓細胞から、歯髓幹細胞を取り出し、神経や骨芽細胞などへ分化させることが可能となってきた。この中で、日本小児歯科学会では、「乳歯を用いた再生医療技術開発」をメインテーマとし、国民に新たな歯科医療の提供を目指して活動を進めている。つまり、ほとんどすべての大学において、乳歯由来幹細胞の培養技術を確立し、今後の再生歯科医学的な治療法への応用に備えようというものである。また、歯髓細胞からiPS細胞などの万能細胞の作成など、様々な応用が期待されている。このようなプロジェクトが進行しているなかで、次の段階として必要なのは、如何にこれら組織幹細胞を、再生医療に効率的に利用できるかという、技術開発が急務であると考えた。

そこで我々は、未分化な細胞を人為的に分化誘導する手段として細胞間結合、特にギャップ結合(ジャンクション)に着目した。ギャップ結合は、コネクシン蛋白がコネクソンという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し、分子量1000以下の小さな分子や電気的な刺激を、隣接する細胞へ伝達するシステムである。これまで細胞分化誘導は、増殖因子や細胞外マトリックスなどを応用した研究が主体であり、我々も歯の上皮細胞分化における神経成長因子NT-4の作用(*J Biol Chem* 2008)、エナメル基質の作用(*J Cell Biol* 2004, *J Biol Chem* 2005, *J Biol Chem* 2009)、唾液腺形成に関わるPDGFの役割を明らかにしてきた(*J Biol Chem* 2008)。これら増殖因子シグナルは、細胞間結合の有無により、その効率が大きく変化し、ギャップ結合が存在しない状況下では、如何に分化誘導を行なっても、細胞は全く分化しないことを見いだしていた。

またこれらシグナル伝達に伴う器官形成異常が、眼歯指異形成症に代表されるギャップジャンクション病の発症原因の1つであることを発見していた。

そこで我々は、ギャップ結合の口腔器官発生における役割を明らかにすることで、これらの異常により生じるギャップジャンクション病の発症メカニズムを明らかにするとともに、人為的なギャップ結合の発現や機能

制御を行うことで、より効率的な組織細胞分化や器官形成法への応用、さらには疾患治療に応用する為の基礎的なデータ集積を行なうことを目的とした。

### 2. 研究の目的

口腔上皮に由来して発生する「歯および唾液腺」の発生・再生研究の中で、増殖因子や細胞外マトリックスの重要性が明らかとなり、これら分子を用いた口腔上皮細胞の分化誘導法の開発が試みられていた。我々は、個々の細胞分化において、増殖因子などの外部からの刺激が、細胞間結合(細胞間コミュニケーション)の有無により、大きく変化することを見いだしていた。そこで本研究では、増殖因子や細胞外マトリックスに次ぐ、第3の細胞分化要因として細胞間結合に着目し、細胞間結合による口腔上皮由来細胞の分化誘導・器官形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) マウス歯および唾液腺胚組織の発生及び、培養細胞、器官培養分化段階におけるmRNAの抽出

マウスの発生段階において、胎生13.5、14.5、16.5、出生後1、3、7日の歯および唾液腺胚サンプルより、mRNAを抽出。培養細胞は、歯原性の上皮系細胞としてSF2細胞、唾液腺上皮細胞株としてHSY細胞を用いた。

我々の研究室では、株化したラット由来の歯原性上皮細胞株SF2細胞を用い、*in vitro*でエナメル上皮に分化誘導するシステムを開発した。この方法では、上皮の周辺はp75分子陽性の増殖細胞が配列し、中央部分には歯原性上皮細胞においては、エナメル芽細胞の分化マーカーであるアメロプラスチンやアメロジェニン陽性の細胞が出現する。おそらくこのことは、細胞間結合の豊富な中央の細胞が、エナメル芽細胞に分化することを示唆する結果である。そこで、エナメル芽細胞分化に重要である神経成長因子の1つであるNT-4を添加し、SF2細胞をアメロプラスチン陽性細胞に分化させる為に48時間培養し、その後mRNAを抽出した。唾液腺上皮細胞においては、増殖因子の1つであるFGF7あるいはFGF10を添加し、唾液腺の終末腺房に分化させる為に72時間培養後、mRNAを抽出した。

(2) cDNAマイクロアレイによる解析

歯および唾液腺胚発生段階および歯原性細胞株、唾液腺上皮細胞株の分化段階におけるギャップジャンクションの発現について、アフィメトリックス社cDNAマイクロアレイを用いて解析を行った。

(3) ギャップジャンクション分子の歯胚組織内の局在、また歯原性培養細胞における発現の検討

各種抗体を用いた免疫染色および、分子特異的なプローブを用いた*in situ*

hybridization 法にて検討を行った。

(4) ギャップジャンクション病モデルマウスの歯および唾液腺の表現系の解析

コネキシン 43 欠損マウスについて唾液腺の発生について検討した。また、コネキシン 43 欠損マウス由来唾液腺器官培養にて唾液腺の形成過程の解析を行った。

(5) ギャップジャンクション遺伝子に対する siRNA および microRNA の同定

特定の遺伝子発現の抑制には、アンチセンスオリゴを用いた方法、siRNA を利用する方法、さらには mRNA の polyA tail 付近に結合し、細胞内での遺伝子発現を負に制御する microRNA などを用いた方法が有効であることが知られている。

そこで、既に歯および唾液腺に発現するコネキシン 43 に対する siRNA についてデータベースを応用し設計を行った。

(6) コネクソン阻害ペプチドの設計および合成

ギャップジャンクション分子は、6 分子が円形に配列し、中央に空洞をもったコネクソンを形成する。この 6 量体形成阻害は、直接特異的なギャップ結合の機能抑制につながる。我々はこれまで、コネキシン 43 およびパネキシン 3 に対する機能阻害を示すペプチドライブラリーを作製し、ギャップジャンクションの機能を抑制するペプチドスクリーニングを行ってきた。その中で、蛋白の N 末端領域から数えて第一番目の細胞外領域に相同性のあるペプチドが、隣接する分子同士の結合を阻害し、ギャップ結合を介した細胞間の物質輸送を阻害する可能性を見いだした。

そこでより効果的で、かつ最小単位のペプチドの同定を行い、スモールペプチドを用いたギャップ結合機能制御法の開発を行った。(7) siRNA、microRNA およびコネクソン阻害ペプチドの細胞増殖及び分化への影響評価

細胞培養系に、siRNA、microRNA、合成ペプチドを添加し評価した。

(8) 唾液腺分岐形成過程における増殖因子へのギャップジャンクション機能の解析

FGF や PDGF 添加による器官培養の唾液腺分岐形成におけるギャップジャンクション機能阻害薬である Oleamide を添加し、ギャップジャンクション機能が増殖因子における分岐形成促進に関与しているかどうかを解析した。また、FGF7 や FGF10 が唾液腺上皮細胞に発現する FGF 受容体を介して、上皮細胞の増殖促進作用を有することから、FGF 誘導性の上皮細胞における FGF 受容体、ERK などのリン酸化について、ギャップジャンクション機能の有無による差異の検討を行った。

(9) コネキシン 43 による FGF10 や BMP 分子群のシグナル伝達機構についての解析

歯原性上皮細胞 SF2 および唾液腺上皮細胞株 HSY 細胞を用いて、コネキシン 43 の

microRNA および機能阻害ペプチドを用いた機能阻害を行ない、ギャップ結合分子が制御していると考えられる、細胞—細胞間のカルシウムや IP<sub>3</sub> の細胞間輸送、小胞体膜での IP<sub>3</sub> 受容体を介したカルシウムの放出、さらにはこれらの複合的な現象である細胞内カルシウムの上昇において、コネキシン 43 の有無による変化を検討した。さらに、これら細胞内カルシウムの変化が、増殖因子シグナル (ERK1/2、Smad 等のリン酸化制御) や、エナメル芽細胞、唾液腺上皮細胞の分化誘導における役割についても検討を行なった。

#### 4. 研究成果

唾液腺の発生段階におけるギャップジャンクション分子コネキシン 43 の発現を免疫組織学的に検討した結果、唾液腺胚生の初期段階から発現を認め、上皮細胞に局限した発現を示した。分岐形成が行なわれる発生後期においては、導管での発現は認められず、腺房細胞での発現を認めた。この時期においても唾液腺間葉組織での発現は認められなかった。

次にコネキシン 43 の機能阻害ペプチドを作製する目的で、これまで報告されているコネキシン 43 の立体構造解析のデータを参考に、6 量体形成に関わる領域に対するペプチドを作製した。本ペプチドは添加することで、コネクソン形成を阻害し、コネキシン 43 の機能阻害を起こすことを明らかにした。そこで、野生型マウス由来唾液腺器官培養に、コネキシン 43 の機能阻害ペプチドを添加したところ、遺伝子欠損マウスと同様の結果が得られた。

また、コネキシン 43 欠損マウスにおける唾液腺発生について検討した結果、遺伝子欠損マウスにおいては、唾液腺自体は形成されるものの、野生型と比較して 40% 程度唾液腺重量が低下していた。さらに、欠損マウス由来唾液腺器官培養においては、FGF-10 による分岐形成促進も認められないことがわかった。

そこで、細胞間結合阻害薬 (Oleamide) を用いて、増殖因子の発現やシグナル伝達に及ぼす影響を検討した。その結果、阻害剤処理によって、間葉系組織における FGFs の発現や PDGF 刺激による ERK のリン酸化には影響を及ぼさなかったが、FGF-10 刺激による上皮細胞内での ERK のリン酸化の阻害を認めた。

以上の結果から、上皮におけるコネキシン 43 が、間葉からの FGF-10 シグナル伝達を直接制御し、唾液腺の分岐形成を促進していることがわかり、唾液腺の分岐形成過程において、唾液腺上皮の細胞間結合が、間葉からの増殖因子刺激の受容に必須であることが明らかとなった。

#### 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 13 件)

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., Scientific Reports., 査読有, vol.6, 2016, 23670

DOI:10.1038/srep23670.

Miyazaki K., Toshizaki 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, 査読有, Vol.11, 2016, e0152206

DOI:10.1371/journal.pone.0152206.

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., The Journal of Biological Chemistry, 査読有, 291(2), Jan 8, 2016, 904-912

DOI:10.1074/jbc.M115.674663

Saito K., Fukumoto E., Yamada A., Yuasa K., Yoshizaki K., Iwamoto T., Saito M., Nakamura T., Fukumoto S., Interaction between fibronectin and  $\alpha$ 1 integrin is essential for tooth development., PLoS One, 査読有, Apr, 2015

DOI: 10.1371/journal.pone.0121667.

Fukumoto S., Nakamura T., Yamada A., Arakaki M., Saito K., Xu J., Fukumoto E., Yamada Y., New insights into the functions of enamel matrices in calcified tissues., Journal Dental Science Review (review), 査読有, 50(2), May, 2014, 47-54  
DOI:org/10.1016/j.jdsr.2014.01.001

Otsu K., Kishigami R., Okikawa-Sasaki A., Fukumoto S., Yamada A., Fujiwara N., Ishizeki K., Harada H., Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells., Stem Cells and Development, 査読有, 21(7), May1, 2012, 1156~1164

〔学会発表〕(計 38 件)

Sugawara Y., Yamada A., Fukumoto S., Cross-talk between PDGF-BB and BMP-2 is important for the stemness of dental pulp stem cells, 25<sup>th</sup> Congress of the International Association of Paediatric Dentistry (IAPD),

2015 年 7 月 4 日, Glasgow(Scotland)  
Yamada A., Nakamura T., Arakaki M., Sugawara Y., Saito K., Fukumoto S., Induced artificial bone marrow cells from dental pulp cells of primary tooth using a natural compound, 25<sup>th</sup> Congress of the International Association of Paediatric Dentistry (IAPD), 2015 年 7 月 2 日, Glasgow (Scotland)

山田亜矢, 菊入 崇, 中村卓史, 新垣真紀子, 齋藤 幹, 福本 敏, 白血病治療を目指したヒト乳歯歯髄細胞から人工骨髄誘導法の開発 (Artificial bone marrow formation from dental pulp of primary tooth to treat for leukemia), 第 53 回日本小児歯科学会大会, 2015 年 5 月 22 日, 広島

齋藤 幹, 山田亜矢, 新垣真紀子, 二木正晴, 中村卓史, 福本 敏, 歯の萌出時期と嚢胞形成に関わるインテグリン beta1 の分子機構について (The molecular mechanism of integrins beta1 concerning a tooth-eruption period and a cyst formation), 第 53 回日本小児歯科学会大会, 2015 年 5 月 21 日, 広島

Futagi M., Saito K., Nakamura T., Yamada A., Fukumoto S., Mst1/2 regulate dental epithelium proliferation and ameloblast differentiation, 92<sup>nd</sup> International Association for Dental Research, 2014 年 6 月 26 日, Cape Town (South Africa)  
Nakamura T., Naruse M., Ikeuchi T., Komori T., Yamada A., Iwamoto M., Fukumoto S., Novel Compounds Mimic Hedgehog Activity and Promote Osteoblast Differentiation in C3H10T1/2 Cells and Osteoblastic Cells from Runx2-Deficient Mice, ASBMR, 2013 年 10 月 4~7 日, Baltimore (USA)

Ono M., Iwamoto T., Arakaki M., Sugawara Y., Yamada A., Saito K., Nakamura T., Fukumoto S., NGF induces cell proliferation in dental epithelial cells via p75., IADR, 2013 年 8 月 22 日, Bangkok (Thailand)

及川知子, 二木正晴, 山田亜矢, 新垣真紀子, 宮本綾子, 齋藤 幹, 中村卓史, 福本 敏, ラミン分子を利用した歯原性上皮細胞の増殖—分化制御, 第 51 回日本小児歯科学会大会, 2013 年 5 月 23 日, 岐阜

齋藤 幹, 山田亜矢, 中村卓史, 福本 敏, 新規エナメル芽細胞マーカー Sox21 における歯胚分化に対する影響, 第 51 回日本小児歯科学会大会, 2013 年 5 月 23 日, 岐阜

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, 2013 年 5 月 23 日, 岐阜  
二木かおり, 山田亜矢, 新垣真紀子, 岩本 勉, 中村卓史, 福本 敏, 乳歯歯髄を用いた再生医療における課題について, 第 31 回日本小児歯科学会中部地方会, 2012 年 11 月 25 日, 金沢  
Iwamoto T., Ishikawa M., Yoshizaki K., Yamada A., Nakamura T., Yamada Y., Fukumoto S., Pannexin 3, a gap junction protein, regulates odontoblast differentiation., The 90<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2012 年 6 月, Iguacu Falls (Brazil)  
Yamada A., Fukumoto S., Connexin43 regulates TGF- $\beta$ -induced ERK1/2 signaling in amelogenesis associated with oculodentodigital dysplasia., 8<sup>th</sup> BIENNIAL CONFERENCE, PEDIATRIC DENTISTRY ASSOCIATION OF ASIA, 2012 年 5 月 26 日, Bali (Indonesia)  
宮本綾子, 山田亜矢, 岩本 勉, 中村卓史, 福本 敏, フィラミン-A による歯根形成メカニズムの解明, 第 50 回日本小児歯科学会, 2012 年 5 月 12 日, 東京  
只木麻友, 山田亜矢, 宮本綾子, 丸谷由里子, 福本 敏, 新しい生物活性化領域スクリーニングとしてのエナメル基質天然変成領域の同定, 第 50 回日本小児歯科学会, 2012 年 5 月 12 日, 東京  
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トランスパニン CD9 の発現とその役割, 第 50 回日本小児歯科学会, 2012 年 5 月 12 日, 東京

〔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〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 亜矢 ( YAMADA, AYA )  
東北大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 40295085

(2) 研究分担者

中村 卓史 ( NAKAMURA, TAKASHI )  
東北大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 90585324

齋藤 正寛 ( SAITO, MASAHIRO )  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 40215562

阪井 丘芳 ( SAKAI, TAKAYOSHI )  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 90379082

岩本 勉 ( IWAMOTO, TSUTOMU )  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号: 90346916

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: