

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293421

研究課題名(和文) 幹細胞の分化制御機構の解明の基盤研究 ～NF-kBからの解析～

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of NF-kB in regulating stem cells

研究代表者

大峽 淳 (Ohazama, Atsushi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40266169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：NF-kBは、免疫、炎症、細胞増殖、アポトーシスなど多種多様な生理現象に関わるシグナル伝達経路である。NF-kBが歯の発生に関与していることが明らかになっているが、NF-kBの歯の幹細胞における役割は未解明のままである。本研究結果からcanonical NF-kBが胎生期マウス下顎前歯部のWntシグナルとアポトーシスの制御に関わること、canonical NF-kBの上昇により過剰歯の形成が引き起こることなどが明らかとなった。さらにNF-kBは、生後のcervical loopの幹細胞の恒常性の維持にも重要であることが示唆され、そのメカニズムは胎生期歯胚上皮での機能とは異なることが示された。

研究成果の概要(英文)：Nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling plays critical roles in many physiological and pathological processes, including regulating organogenesis. It has been shown that NF- κ B signaling regulate tooth development from initiation to the late stage. The roles of NF- κ B signaling in regulating dental stem cells, however, are not fully understood. Our results using mice overexpressing IKK β , an essential component of the NF- κ B pathway, under keratin 5 promoter suggested that over-activation of NF- κ B signaling lead to supernumerary incisors by abnormal Wnt signaling activity and apoptosis in embryonic lower incisor tooth epithelium. Excess NF- κ B activity thus induces an ectopic odontogenesis program that is usually suppressed under physiological conditions. NF- κ B signaling is also found to control homeostasis of stem cell in the cervical loop, which is regulated by different molecular mechanisms from those in embryonic tooth germ.

研究分野：発生生物学

キーワード：歯の発生 幹細胞 NF-kB

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の開発により、患者自身の細胞から作製した幹細胞による歯の再生への応用の可能性が高まっている。しかし、歯の再生の一つの鍵となる幹細胞の歯胚細胞への分化誘導が明らかとなっておらず、歯の再生療法の道のりは遠いと言わざるを得ないのが現状である。歯を含む組織の再生は発生過程の再演と言われ、再生療法における幹細胞の歯胚細胞への分化誘導法の確立には、それらの発生中に認められる分化誘導の詳細な分子メカニズムの理解が必要である。しかしながら、発生中の歯胚細胞への分化誘導メカニズムは不明のままである。一方、マウスを含む齧歯類の前歯は、他の哺乳類の歯と違い、生涯萌出し続ける常生歯のため、その内部に幹細胞ニッチ(cervical loop)を有する。ニッチ内の幹細胞の歯形成細胞への連続的かつ恒久的な分化誘導により、歯の永続的な形成(萌出)が可能となっている。そのため、常に幹細胞の分化誘導が起きているマウス前歯には、幹細胞から各分化段階の歯形成細胞が認められるため、幹細胞の分子誘導メカニズム解明に、最適の実験モデルと言える。さらに、その幹細胞ニッチの発生過程における分子制御メカニズムも幹細胞研究には必須である。しかしながら、これまで Fgf に代表されるさまざまなシグナルのマウス前歯の幹細胞における役割が検討されているものの、その制御メカニズムの全容は未だ明らかとなっていない。

NF- κ B は、TNF をはじめとする各種リガンドや外的刺激により、活性化される転写を司る非常に大きく、複雑なシグナル伝達経路であり、免疫、炎症、細胞増殖、アポトーシス、腫瘍など多種多様な生理現象に関わる事が知られている。その多彩な機能は、古典経路と非古典経路が存在する事や、多種にわたる関連分子が関与する事で、なされている。歯の先天異常を引き起こす外胚葉異形成症が NF- κ B の異常によって引き起こること (Ohazama et al., Dev Cell, 2004)、歯における NF- κ B 活性が Traf6 を介して行われること (Ohazama et al., Dev Dyn, 2004) などから、NF- κ B の歯の発生への関与が明らかとなっている。他の Traf も歯胚に発現しており、NF- κ B の機能は、Traf の数だけ多様と推察されている (Ohazama et al., Gene Expr Pattern, 2003)。さらに、歯の石灰化過程において、NF- κ B 活性が RANK/RANKL を介すること (Ohazama et al., J Dent Res, 2004) も報告されてきた。また、インターロイキン関連分子である Irf6 が、歯の発生において NF- κ B と強く関連する可能性も見いだされている (Blackburn et al., Dev Biol 2012)。このように、NF- κ B が歯の発生初期から後期までの様々なステージで、様々な分子が関与することで多様に制御していることが容易に想像される。しかし、NF- κ B の歯の幹細胞

における役割は未解明のままである。

2. 研究の目的

NF- κ B 関連遺伝子改変マウスの形態的、分子的解析を通して、歯の幹細胞における NF- κ B シグナルの機能を解析する。

3. 研究の方法

NF- κ B には、canonical と non-canonical の 2 つの pathway が存在する。canonical NF- κ B pathway の機能には、I κ B が必須の分子となる。そこで、canonical NF- κ B の歯の幹細胞における機能を知るために、canonical NF- κ B の低下させた I κ B の欠損マウス ($C^{I\kappa B}$ N マウス) を作成し、解析した。一方、欠損マウスの解析だけで Canonical NF- κ B の機能を完全に把握することは難しい。そこで、canonical NF- κ B の活性に不可欠な I κ k が上皮で過剰発現するマウス (I κ k -K5 マウス) を作成し、解析した。non-canonical NF- κ B pathway には NIK が必須の分子となる。そこで、Non-canonical NF- κ B の機能を検索するために、NIK の欠損したマウス (NIK 欠損マウス) を作成し、検索した。NF- κ B シグナルの活性の検出は、NF- κ B の活性を LacZ 染色で確認できるマウス [(I κ)3xconalacZ マウス] を、上記のマウスと交配させ、compound マウスを作成することで、可能にした。また、幹細胞関連分子である Sox2 の改変マウスを作成し、上記のマウスと比較検討を行った。

4. 研究成果

canonical NF- κ B が上皮で過剰発現している I κ k -K5 マウスの下顎前歯部に、過剰歯が認められた (Figure 1)。この過剰歯は、

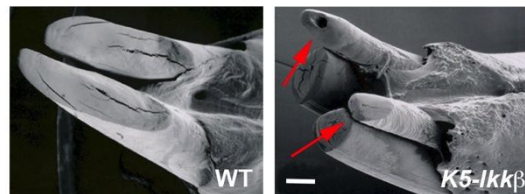


Fig.1; 過剰歯 (矢印 in B)

生後 1 ヶ月で認められた。一方で、canonical NF- κ B pathway の機能が低下した $C^{I\kappa B}$ N マウスには、そのような過剰歯は認められなかった。また、non-canonical NF- κ B の低下した NIK 欠損マウスにも、下顎前歯部に過剰歯は認められなかった。胎生前歯歯胚上皮の 3D 解析により、過剰歯が、前歯歯胚の舌側から、胎生期に発生していることが明らかとなった (Figure 2)。Osr2 欠損マウスには、臼歯の舌側過剰歯が報告されている (Zhang et

al., Science 323; 1232-1234, 2009)。この *Osr2* 欠損マウスは、全ての歯が欠損する *Msx1* 欠損マウスと交配した際、*Msx1* 欠損マウスの歯の欠損をレスキューすることが報告され

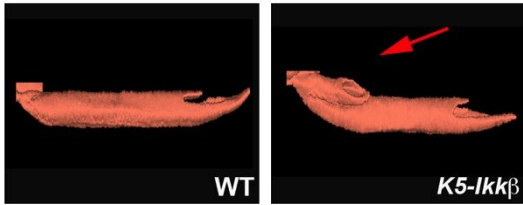


Fig. 2; 下顎前歯歯胚

ている。そこで、歯種は違うものの、同じ舌側に過剰歯を持つ *Ikk*-*K5* マウスに引き起こった過剰な NF- κ B シグナルで、*Osr2* 欠損によ

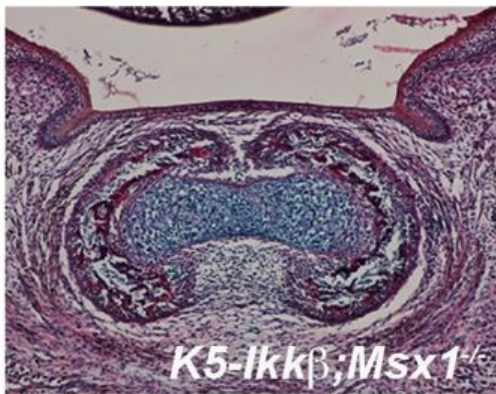


Fig.3; 下顎前歯部

って生じた分子変化が同様に引き起こるかを検索するために、*Ikk*-*K5* マウスと *Msx1* 欠損マウスを交配させ、*Ikk*-*K5* と *Msx1* 欠損のコンパウンドマウス (*Ikk*-*K5*; *Msx1*^{-/-} マウス) を作成した。しかし、*Ikk*-*K5*; *Msx1*^{-/-} マウスに、歯胚は認められず、*Msx1* 欠損マウスと同じ表現形であった (Figure 3)。これらより、舌側過剰歯の形成メカニズムは、*Osr2* と

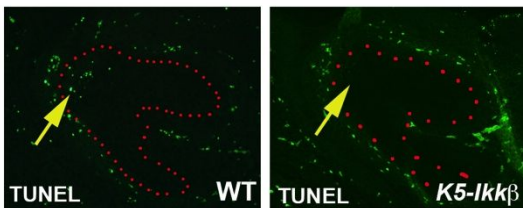


Fig.4; アポトーシス

NF- κ B で違うことが示唆された。

胎生前歯歯胚上皮の舌側には、アポトーシスが通常認められるが、*Ikk*-*K5* マウスでは

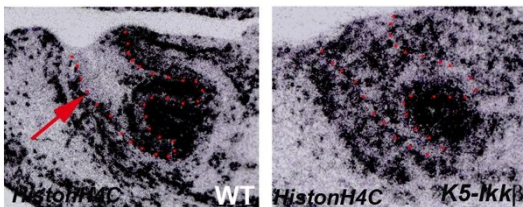


Fig. 5; 細胞増殖

消失していた (Figure 4)。その消失してい

た部位での細胞増殖の上昇が確認できた

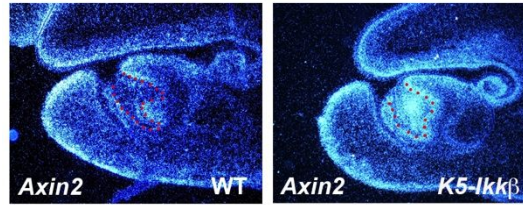


Fig. 6; Wntシグナル

(Figure 5)。同部位において Wnt シグナルのマーカ分子である Axin2 が異所性に発現していた (Figure 6)。

Ikk-*K5* マウスの前歯にエナメル形成は認めるのに対し、*Ikk*-*K5* マウスの前歯部過剰歯にエナメルの形成は認められなかった (Figure 7)。Amelogenin の形成も、*Ikk*-*K5* マウスの前歯部過剰歯には、観察さ

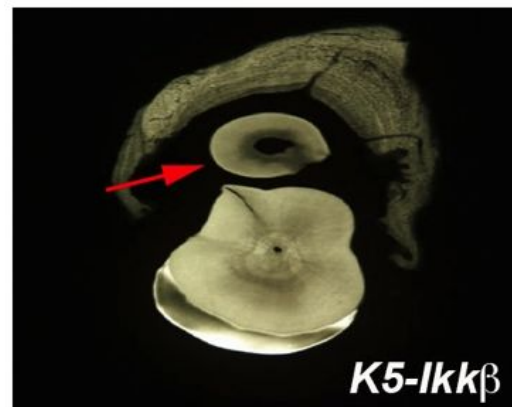


Fig.7; エナメル欠損 (矢印)

れなかった。*Ikk*-*K5* マウスの前歯部過剰歯の cervical loop (幹細胞ニッチ) は異常に薄い形態であった (Figure 8)。*Ikk*-*K5* マウスの前歯部過剰歯の萌出能を、確認するために、*Ikk*-*K5* マウスの前歯と過剰歯を歯肉縁付近でカットして、経過観察を行った。その結果、*Ikk*-*K5* マウスの前歯、過剰歯、共に正常のスピードでの萌出を認めた (Figure 9)。このように過剰歯の Cervical loop に形態的・機能的異常はあるものの、萌出能は有していた。また、エナメル形成能と萌出能は、

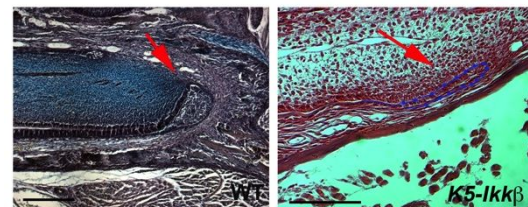


Fig. 8; cervical loop

異なるメカニズムであることが示された。

前歯部の過剰歯は、Wnt シグナルのインヒビターである *Wise* の欠損マウスでも認められ、胎生期の歯胚の舌側からの発生で生じることが知られている (Ohazama et al., Plos One 3, e4092)。Wnt シグナルの上昇、前歯部歯胚上皮内のアポトーシスの消失、過剰歯の

エナメル欠損が、Wise 欠損マウスでも認められた。以上の結果より、前歯舌側に認められた過剰歯は、胎生期歯胚の Wnt のシグナル上昇により、引き起こることが明らかとなった。

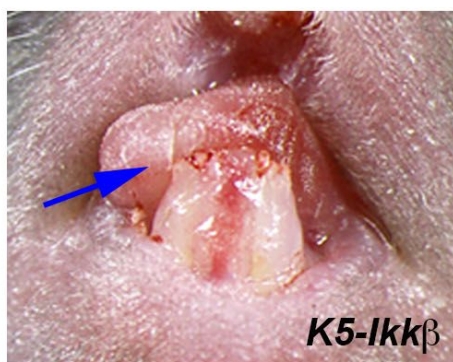


Fig. 9; 下顎前歯切断実験

(左：切断前)

(中：切断直後)

(右：切断後)

一方、6ヶ月齢の *Ikk*^{-K5} マウスの cervical loop 付近に、舌側過剰歯とは形態の異なる多数の過剰歯を認めた。さらに、複数の cervical loop 様構造と Sox2 の著しい上昇を確認した。これらは、若い *Ikk*^{-K5} マウスや胎生中の *Ikk*^{-K5} マウスには認められず、前述の胎生期の歯胚から形成される下顎前歯部の過剰歯の形成メカニズムとは別の分子機構により発生したものであることが示唆された。

Sox2 の著しい上昇が、多数の過剰歯と複数の cervical loop 様構造の原因なのかを検

索するために、Sox2 が上皮に過剰発現するマウスを作成し検索したが、*Ikk*^{-K5} マウスに認められるような多数の過剰歯と複数の cervical loop 様構造は観察されなかった。Sox2 の上昇は、cervical loop の上昇によるものと、推察された。

以上のことより、NF-κB が胎生期の歯胚上皮、ならびに生後の cervical loop 内の幹細胞の恒常性の維持に重要であ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 2件)

1. Blackburn J, Kawasaki K, Porntaveetus T, Kawasaki M, Otsuka-Tanaka Y, Miake Y, Ota MS, Watanabe M, Hishinuma M, Nomoto T, Oommen S, Ghafoor S, Harada F, Nozawa-Inoue K, Maeda T, Peterková R, Lesot H, Inoue J, Akiyama T, Schmidt-Ullrich R, Liu B, Hu Y, Page A, Ramirez A, Sharpe PT, Ohazama A, Excess NF-κB induces ectopic odontogenesis in embryonic incisor epithelium, *J Dent Res* 94, 121-128, 2015 (査読有り)

2. Kawasaki K, Kawasaki M, Watanabe M, Eldrus E, Nagai T, Oommen S, Maeda T, Hagiwara N, Que J, Sharpe PT, Ohazama A. Expression of Sox genes in tooth development. *Int J Dev Biol*, 59:471-478, 2015 (査読有り)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

大峽 淳 (OHAZAMA, Atsushi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号： 40266169

(2) 研究分担者

前田 健康 (MAEDA, Takeyasu)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号： 40183941

河野 芳郎 (KAWANO, Yoshiro)
朝日大学・歯学部・講師
研究者番号： 60303129

井上 佳世子(野澤 佳世子) (NOZAWA-INOUE, Kayoko)
新潟大学・歯学部・特任准教授
研究者番号： 90303130

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()