

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670886

研究課題名(和文) 神経管近傍頭部神経堤細胞に着目した“歯を作る細胞”の探索

研究課題名(英文) Identification for "tooth genes" in neural crest derived mesenchymal cells

研究代表者

吉崎 恵悟 (Yoshizaki, Keigo)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10507982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯は上皮-間葉相互作用によって形成される器官であり、その発生において神経堤由来間葉細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。今回の研究で、歯原性間葉細胞に特異的に発現する2つの遺伝子を同定した。これらの遺伝子は歯の発生初期である胎生13日齢(E13)からE16に強く発現し、歯の発生が進むにつれて発現量が減弱することが判明した。さらに、これらの遺伝子を歯原性間葉細胞株に遺伝子導入しE14歯胚の上皮細胞と相互作用させたところ、上皮の間葉細胞への陥入が認められた。以上の結果から、これらの遺伝子は歯の形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tooth morphogenesis is initiated by epithelial-mesenchymal interaction, and the neural crest-derived mesenchymal cells play an important role in tooth development. In this study, we identified two genes, which were specifically expressed in mesenchymal cells in tooth development. These genes were strongly expressed in E13-E16 tooth germ, which is the morphogenesis stage of tooth development, and the expression level was declined in the differentiation stage. Furthermore, we identified that dental mesenchymal cells transfected with identified genes were critical for epithelial-mesenchymal interaction. These results suggest that the identified genes may play important roles in tooth morphogenesis.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯 再生医学 細胞分化 間葉細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯は上皮-間葉相互作用によって形成される器官であり、その発生において頭部神経堤細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。近年、歯の組織工学的研究がなされ、胎生 14 日齢 (E14) の歯の細胞を用いて歯胚の再構築が可能であることが示された。これはある程度分化の方向を決めることができれば当初難しいとされていた歯胚形成は可能であることを示している。しかしながら歯の再生の臨床応用を考えると、その細胞源を胎仔の歯胚から持ってくることは不可能である。そこで細胞源としていわゆる“歯を作る細胞”の探索が必要である。

## 2. 研究の目的

神経管形成に伴い、神経管が閉塞すると同時に神経堤細胞が遊走する。これらの細胞が歯胚形成位置まで遊走し、上皮-間葉相互作用を通じて器官を形成する。つまり、遊走神経堤細胞は将来形成される器官が運命づけられていると考えられる。そこで本研究では、神経堤由来間葉系幹細胞に特異的に発現する遺伝子を検索することで、将来の歯の再生法における細胞源を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) E8.5 のマウス胚から第一鰓弓を含む神経管を摘出し、器官培養法を用いて培養を行った。その際、神経管近傍部位に DiI を注入し、2 日間培養することで細胞追跡を行った。

(2) E14 マウス歯胚を摘出し、実体顕微鏡下にて歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞に分離した。歯原性間葉細胞と周囲の間葉細胞の total mRNA を抽出し、マイクロアレイ法を用いて網羅的検索を行った。

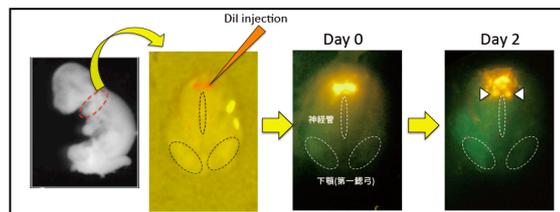
(3) マイクロアレイ法により検索した遺伝

子の歯の発生における発現パターンを RT-qPCR 法を用いて検討した。さらに歯原性間葉細胞に候補遺伝子を遺伝子導入し、E14 マウス歯胚より摘出した歯原性上皮細胞と相互作用させることで、上皮-間葉相互作用の有無を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 器官培養法を用いた神経管近傍の神経堤細胞の細胞追跡

神経管近傍の神経堤細胞の下顎への遊走を確認するため、第一鰓弓を含む神経管の器官培養を行った。神経管近傍に DiI を注入し、蛍光顕微鏡にて観察すると、細胞群が第一鰓弓へと遊走している様子が観察された(図)。



これら細胞群を取り出し、細胞培養を試みたが、細胞数が少ないこと、培養皿への生着が難しいことからマイクロアレイ法を用いた網羅的解析を行えるだけの細胞を得ることができなかった。そこで、比較的豊富に細胞を採取できる歯原性間葉細胞を用いて、歯の形成に重要な遺伝子のスクリーニングを行うこととした。

(2) 歯原性間葉細胞に着目した歯の発生に関わる遺伝子の網羅的検索

E14 マウス臼歯歯胚の陥入上皮直下にある歯原性間葉細胞を取り除き器官培養を行うと歯胚形成が抑制された。そこで、歯原性間葉細胞と周囲の間葉細胞とをマイクロアレイ法にて比較し、歯胚形成に重要な遺伝子のスクリーニングを試みた。歯原性間葉細胞に強く発現する遺伝子群を、バイオインフォマティクス解析による絞り込みを行い、13 個の遺伝子を同定した。

### (3) 候補遺伝子の機能解析

上記で得られた 13 個の候補遺伝子をもちいてさらなるスクリーニングを行った。E14 歯胚を上皮と間葉に分け、RT-qPCR 法を用いて、間葉に発現する遺伝子を検索したところ、4 つの遺伝子が歯の間葉細胞に強く発現することが判明した。さらに候補遺伝子の歯の発生における発現パターンを解明するため、E14 から P3 までの歯胚を摘出し、RT-qPCR 法にて確認した。4 つの候補遺伝子はすべて歯の形態形成期である E13-E16 に強く発現し、発生が進むにつれて、発現量が減弱していくことが判明した。

以上の結果から 4 つの候補遺伝子は歯の形態形成期の歯原性間葉細胞に強く発現し、歯の形態形成に重要な役割を担っている可能性が示された。そこで、上皮-間葉相互作用に与える影響を確認するために、それぞれの遺伝子の発現ベクターを作製し、検討を行った。4 つの候補遺伝子を歯原性間葉細胞株にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入した。細胞を播種後、E14 歯胚より摘出した上皮を間葉細胞上に乗せ、上皮-間葉相互作用を検討した。7 日間培養後、上皮細胞を Keratin 14 で、間葉細胞を Vimentin で 2 重染色したところ、2 つの遺伝子において、上皮細胞の間葉細胞への陥入が認められた。これらの細胞を 3 次元培養系に移行し、7 日間培養したところ、エナメル芽細胞分化マーカーである Ameloblastin の発現が上昇した。

以上の結果から、歯の発生に重要と考えられる 2 つの候補遺伝子の同定に成功した。今後はこれらの遺伝子を用いて歯の再生法への応用を検討する予定である。

### 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 7 件)

① Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Saito K, Yamada A, Han X, Funada K, Fukumoto E, Haruyama N, Iwamoto T, Takahashi I, Fukumoto S  
Nephronectin plays critical roles in Sox2 expression and proliferation in dental epithelial stem cells via EGF-like repeat domains  
Sci Rep. 2017 Mar 27;7:45181. doi: 10.1038/srep45181

② 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.  
Sci Rep. 2016 Mar 31;6:23670

③ Miyazaki K, Yoshizaki 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. 2016 Mar 24;11(3): e0152206.

④ 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.  
J Biol Chem. 2016 Jan 8;291(2):904-12. doi: 10.1074/jbc.M115.674663. Epub 2015 Nov 12.

⑤ Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Yuasa K, Yoshizaki K, Iwamoto T, Saito M, Nakamura T, Fukumoto S.  
Interaction between Fibronectin and  $\beta 1$  Integrin Is Essential for Tooth Development.  
PLoS One. 10(4): e0121667, 2015

⑥ Umeda M, Terao F, Miyazaki K, Yoshizaki K, Takahashi I.  
MicroRNA-200a Regulates the Development of Mandibular Condylar Cartilage.  
J Dent Res. 2015 Jun;94(6):795-802.

⑦ Yoshizaki K, Hu L, Nguyen T, Sakai K, He B, Fong C, Yamada Y, Bikle DD, Oda Y.  
Ablation of coactivator Med1 switches the cell fate of dental epithelia to that generating hair.  
PLoS One. 9(6): e99991, 2014

[学会発表] (計 14 件)

① Chiba Y, Sakai K, Ikeuchi T, Yoshizaki K, Mahboubi D, He B, Yamada Y

Epiprofin and T-box1 Regulate Ameloblast Lineage Development

The IADR/AADR/CADR 95th General Session and Exhibition, San Francisco, CA, USA · March 22-25, 2017

② Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Han X, Funada K, Haruyama N, Fukumoto S, Takahashi I PKP1 regulates ameloblast differentiation via the cell adhesion.

The IADR/AADR/CADR 95th General Session and Exhibition, San Francisco, CA, USA, March 22-25, 2017

③ 古川 雄亮、春山 直人、二階堂 まりこ、中西 正光、笠 法子、大洞 將嗣、呉本 晃一、吉崎 恵悟、高橋 一郎 Stim1 はマウスのエナメル質の石灰化およびエナメル芽細胞成熟期にみられる周期性を制御する 第12回九州矯正歯科学会学術大会 宮崎 2017年3月18-19日

④ 古川 雄亮、春山 直人、二階堂 まりこ、中西 正光、笠 法子、大洞 將嗣、呉本 晃一、吉崎 恵悟、高橋 一郎 ストア作動性 Ca<sup>2+</sup>流入異常による外胚葉異形成症におけるエナメル質形成不全症の発症メカニズム 第75回日本矯正歯科学会 徳島 2016年11月7-9日

⑤ 酒井 陽、吉崎 恵悟、千葉 雄太、池内 友子、山本 朗仁、日比 英晴、山田 吉彦 歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への分化における Epiprofin と T-box1 の役割 The role of epiprofin and T-box1 in enamel epithelial development 第58回歯科基礎医学会学術大会・総会 2016年8月24-26日 北海道札幌市 札幌コンベンションセンター

⑥ 新井 智映子、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、韓 雪、鮎田 啓太、福本 敏、高橋 一郎 基底膜分子 Nephronectin は EGF like repeat domain を介して歯原性上皮幹細胞の細胞増殖を制御する

A basement membrane protein Nephronectin regulates the proliferation of dental epithelial stem cell through its EGF like repeat domain

第58回歯科基礎医学会学術大会・総会 2016年8月24-26日 北海道札幌市 札幌コンベンションセンター

⑦ Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Han X, Funada K, Takahashi I

Nephronectin, a basement membrane protein, plays critical roles for differentiation and proliferation of dental epithelial stem cells during tooth development.

Kyudai Oral Bioscience 2016, February 27, 2016, Fukuoka, Japan

⑧ Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Xue H, Funada K, Takahashi I

Plakophilin-1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development and ameloblast differentiation.

International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Disease, December 10-11, 2015, Yumikura Hall Osaka University Yumikura Hall Osaka University, Japan

⑨ 新井 智映子、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、韓 雪、鮎田 啓太、高橋 一郎

歯の発生における基底膜分子 Nephronectin の役割 The role of basement membrane protein Nephronectin in tooth development

第74回日本矯正歯科学会 2015年11月18-20日 福岡県福岡市 福岡国際会議場・マリンメッセ

⑩ 宮崎 佳奈子、吉崎 恵悟、新井 智映子、韓 雪、鮎田 啓太、高橋 一郎

外胚葉異形成症原因遺伝子 Plakophilin 1 は歯の発生において Wnt シグナル調節因子として作用する Plakophilin 1 associated with ectodermal dysplasia acts as a Wnt signaling regulator in tooth development

第74回日本矯正歯科学会 2015年11月18-20日 福岡県福岡市 福岡国際会議場・マリンメッセ

⑪ 新井 智映子、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、韓 雪、鮎田 啓太、高橋 一郎

基底膜分子 Nephronectin は歯原性上皮幹細胞の分化および細胞増殖に関する A basement membrane protein Nephronectin is involved in dental epithelial stem cell differentiation and proliferation.

第57回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015年9月11-13日 新潟県新潟市 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター)

⑫ 宮崎 佳奈子、吉崎 恵悟、新井 智映子、韓 雪、鮎田 啓太、高橋 一郎

Plakophilin-1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development and ameloblast differentiation

第57回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015年9月11-13日 新潟県新潟市 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター)

⑬ 宮崎 佳奈子、吉崎 恵悟、新井 智映子、張 麗麗、韓 雪、春山 直人、高橋 一郎

歯の発生における外胚葉異形成症原因遺伝子 Plakophilin 1 (Pkp1)の役割 第73回日本矯正歯科学会 千葉市 2014年10月20-22日

⑭ 宮崎 佳奈子、吉崎 恵悟、新井智映子、張 麗麗、韓 雪、春山 直人、高橋 一郎

歯原性上皮細胞における  $Ca^{2+}$  を介した細胞接着メカニズム及び分化に及ぼす影響について  
第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡市 2014 年 9 月 25 - 27 日

〔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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉崎 恵悟 (YOSHIZAKI Keigo)

九州大学・歯学研究科 (研究院)・助教

研究者番号 : 10507982

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

### (4) 研究協力者

( )