

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05532

研究課題名(和文) 歯の再生療法に向けた幹細胞分化制御機構の解明～毛との相同性、異同性に着目して～

研究課題名(英文) Elucidation of control mechanism on stem cell differentiation for tooth regeneration

研究代表者

前田 健康 (Maeda, Takeyasu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40183941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：NF- κ Bが過剰活性化するIkk^{-/-}K5マウスを用いた解析で、エナメル芽細胞の断裂や歯髄内における異所性の硬組織形成後、幹細胞ニッチであるcervical loopに形態変化が生じた。cervical loopは複数形成され、Sox2の上昇から幹細胞系細胞の増加であることが認められた。その後、異所性の毛髪、異所性のエナメル質形成、過剰歯が同時に引き起こされた。NF- κ Bの過剰活性化により幹細胞ニッチが増加し、各幹細胞が違う組織へと分化することが示された。一方、幹細胞ニッチの周囲細胞にNF- κ Bの上昇が認められ、幹細胞の分化と増殖が周囲の細胞により制御されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞の発見以来、幹細胞による器官再生が理論上可能な治療法として認知されるようになったが、iPS細胞を利用した再生療法に必須である幹細胞のターゲット器官形成細胞への分化方法は未解明のままである。本研究で確認されたNF- κ Bの過剰活性化による幹細胞ニッチの増加はNF- κ Bの幹細胞制御機構を示しており、再生医療研究に大きく寄与する。またNF- κ Bは、外胚葉異形成症の原因遺伝子の下流に位置するシグナルであり、本研究で認められたNF- κ Bの過剰活性化によって異常の生じた毛髪、エナメル形成、歯数いずれも外胚葉異形成症での症状と関連している。本研究成果は、先天異常研究にも大きく貢献するものとなる。

研究成果の概要(英文)：Analysis using Ikk^{-/-}K5 mice with overexpression of NF- κ B showed a rupture of ameloblasts, ectopic calcification in dental pulp and morphological changes in cervical loop, a niche of stem cells. Furthermore, we found multiple formation of cervical loop, which is due to an increase in cells of stem cell line as confirmed by an elevation of Sox2. Thereafter, ectopic hair growth and enamel formation as well as supernumerary teeth simultaneously occurred. These findings indicated that an overexpression of NF- κ B induces an increase in stem cell niche and a differentiation of individual stem cell into different tissues. In addition, an elevation of NF- κ B around stem cell niche suggests that the differentiation and proliferation of stem cells are controlled by these surrounding stem cells.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：Ikkb NF- κ B 幹細胞 エナメル質 マウス前歯

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生療法を確立するためには、幹細胞の分子レベルでの特性の把握、幹細胞のターゲット細胞への分化誘導の把握が必須であるが、未だなされていない。適切な実験モデルの選択が重要となる。マウスの前歯は生涯伸び続けるユニークな器官であり、そのために、マウス前歯には幹細胞ニッチ(cervical loop)が存在する。このマウス前歯幹細胞に関しては数多くの報告がある。しかし、幹細胞の動態を詳しく理解するためには、正常のマウスの解析ではなく、遺伝子改変などによって形態的な変化の引き起こしているマウスが必要となるものの、今までの多くの報告は前歯の形成不全程度のマウスしか報告されていない。

外胚葉異形成症は、歯、毛髪、乳腺、汗腺など外胚葉に由来する器官が形成不全を引き起こす。この外胚葉異形成症の原因遺伝子として TNF スーパーファミリーの *Eda*、*Edar* が同定された。NF- κ B は、免疫、炎症、細胞増殖、アポトーシス、腫瘍など多彩な生理現象に関わるシグナルであるが、外胚葉による器官形成においては、NF- κ B シグナルが *Eda*、*Edar* の下流に存在することが明らかとなっている。NF- κ B が歯の発生に関与することは知られているが、マウス前歯の幹細胞の制御に関わるかは明らかとなっていない。NF- κ B の活性には、Ikk complex による I κ B のリン酸化が必須となる。Ikk complex はリン酸化活性を持つ *Ikk* α と *Ikk* β 、regulatory subunit である *Ikk* γ で構成されている。外胚葉由来器官は、上皮と間葉の2つの組織から発生し、その上皮が間葉へ陥入することが形態的な最初の変化であるが、その陥入の方向の決定を *Ikk* α が行なっていることが見いだされている。しかし、NF- κ B シグナルの活性は、この *Ikk* α が欠損しても持続する。*Ikk* α の欠損によって引き起こる歯を始めとした形態変化の多くは、*Ikk* α の NF- κ B シグナル非依存的な機能、もしくは non-canonical な NF- κ B シグナルの変動によるものと考えられている。*Ikk* α の欠損マウスは出生時に致死となるため、前歯幹細胞の研究には適さない。マウス前歯における上皮性幹細胞の部位はある程度特定されているものの、間葉組織における幹細胞ニッチは同定に至っておらず、現段階では上皮をターゲットにせざるを得ない。この上皮幹細胞領域には Keratin14 と keratin5 が発現することが明らかになっている。そのためこの keratin5 や Keratin14 のプロモーターを利用して、*Ikk* α を過剰発現させることで、*Ikk* α の前歯幹細胞における機能の検索を行ったが、形態的な変化は認められなかった。一方で、もう一つのリン酸化能を有する *Ikk* β を K5 プロモーターによって過剰発現させたマウス(K5-*Ikk* β マウス)を予備的な実験として観察したところ、成獣の前歯に継時的な形態的な変化を確認した。つまり、NF- κ B シグナルがマウス前歯の幹細胞の制御に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

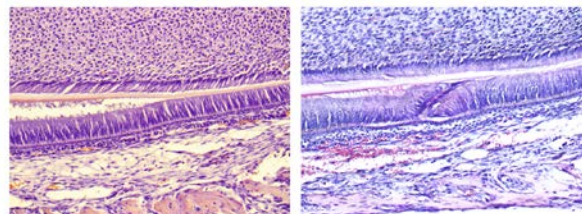
肝細胞を用いた歯の再生には肝細胞リソースの確保や形成時間の短縮が不可欠である。我々は歯の再生療法の開発には歯と相同の細胞由来でありながら、短時間で形成される毛髪の発生・再生機構の解明が有用であると考えている。本研究では歯と毛髪が同一部位に、かつ同時に形成する *Ikk* β 改変マウスを解析し、肝細胞から歯や毛髪への分岐ポイントにおける分化誘導メカニズムならびに毛包幹細胞の機能を明らかにすることを目的とし、毛包幹細胞の歯の再生療法への応用の可能性を追求する。さらに、毛包幹細胞から歯胚形成細胞への変換による歯の再生療法の開発のため、毛包幹細胞の可塑性、機能特性を明らかにする。

3. 研究の方法

確実な研究目標達成に向け、(1) *Ikk* β 改変マウスにおける歯と毛髪の一部形成の形態的・分子的解析、(2) *Ikk* β 改変マウスにおける歯と毛髪のレスキュー実験、(3) 幹細胞への応用の3点を具体的研究目標とした。各具体的研究目標の下に、① *Ikk* β 改変マウスの歯及び毛髪形成端の解析と②その遺伝子変異の検索、③ 異種間結合実験による標的分子の選定、④ *ex vivo* と *in vivo* による *Ikk* β 改変マウスのレスキュー実験、⑤ 同定分子の欠損・過剰における検証、⑥ 分岐制御分子の iPS 細胞への応用、⑦ 毛包幹細胞への応用・昇華の研究課題 (⑥、⑦は応用発展的課題) を設定した。用いる手法としては特殊な遺伝子解析マウスの形態解析から、独自に開発した器官培養法、各種の分子生物学的手法等を用いて、多方面、からの解析を行った。

4. 研究成果

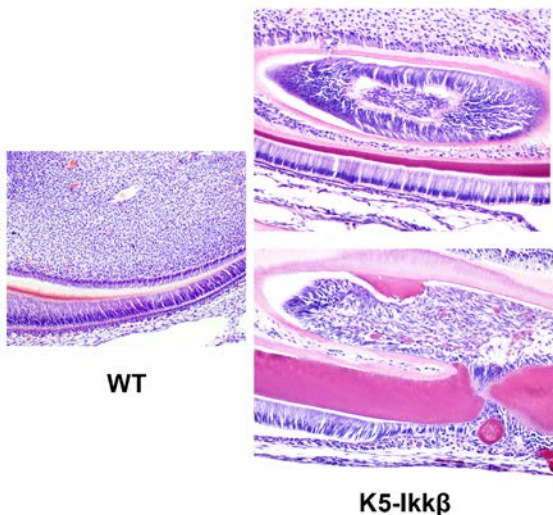
マウスの前歯幹細胞ニッチは、出生直後の胎仔には形態的に認められ、機能的にも分化した歯胚細胞を供給すると考えられている。出生直後の K5-*Ikk* β マウスの前歯幹細胞ニッチに形態的变化は認められない。一方、生後10日において、幹細胞ニッチから発生したエナメル細胞の一部に断裂が認められるようになった (図1)。1ヶ月齢になると、断裂に加え、前歯の上皮層が歯髄内に蛇行して入り込んで、カプセル状の硬組織を形成していた (図2)。この蛇



WT

K5-Ikk β

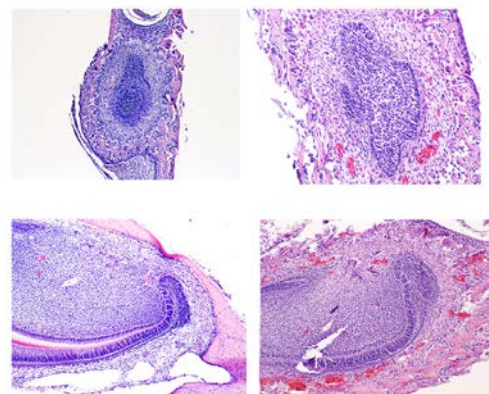
図1. エナメル芽細胞の断裂



WT

K5-Ikk β

図2. エナメル芽細胞の断裂とカプセル形成

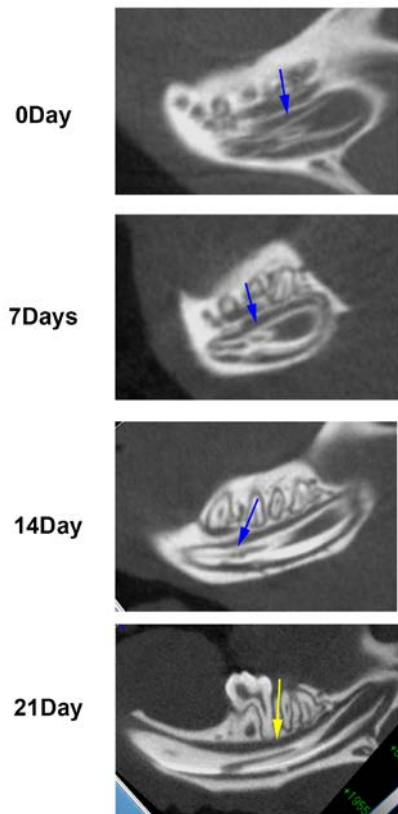


WT

K5-Ikk β

図3. cervical loopの形態異常

行した上皮沿いにも象牙質が形成されていた。この時期の cervical loop の形態にわずかな変化が認められた (図3)。マウス前歯は生え続けるが、この上皮の歯髄内への蛇行は、継時的に観察された (図4)。このことは、上皮の蛇行が、一過性のものでなく継続して引き起こっていることを示唆している。一方、この観察では、歯の萌出速度に変化がある可能性をうかがわせた。そこで、歯の形成速度を検索するために、歯肉縁で前歯を切断して観察したところ、K5-*Ikk* β マウスの前歯の萌出速度は、著しく遅いことが確認された (図5)。さらに、6ヶ月齢になると、Cervical loop の一部が分離し、Cervical loop のようなものが、複数観察された (図6)。分子的にも Cervical loop であるかを確認するために、Cervical loop に発現が認められる Sox2 の発現量を qPCR にて確認した。その結果、Cervical loop 様組織の認められた



青矢印；同一カプセル
黄矢印；新たなカプセル

図4. K5-Ikk β マウスにおけるカプセル状異常形態物の推移

K5-Ikk β マウスで、Sox2 の著しい増加が認められた (図7)。マウスの前歯は、頬側、舌側、それぞれに上皮組織はあるものの、頬側の上皮にのみエナメル芽細胞に分化し、頬側にのみエナメルが形成される。K5-Ikk β マウスの前歯では、この舌側の上皮にも NF- κ B シグナルが過剰に発現するが、K5-Ikk β マウスの前歯では、舌側の上皮は NF- κ B の過剰発現によりエナメル芽細胞に分化可能となり、エナメルが舌側にも形成されていた (図8)。さらに、K5-Ikk β マウスの前歯には、毛髪が認められたため、

毛髪も伸び続けるか検討するために毛髪を歯肉縁で切断したところ、伸び続けることが確認された。さらにその際、過剰歯の形成が同時に引き起こっており、歯胚細胞の分化に異常が生じていることが示唆された (図9)。

以上の結果から、NF- κ B シグナルが、前歯幹細胞の恒常性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

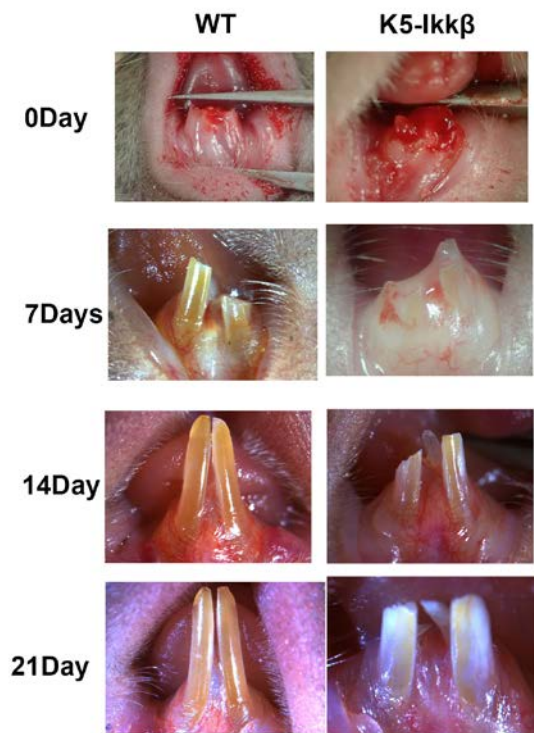


図5. 前歯の萌出速度

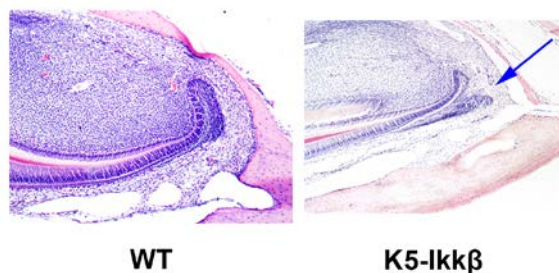


図6. cervical loop

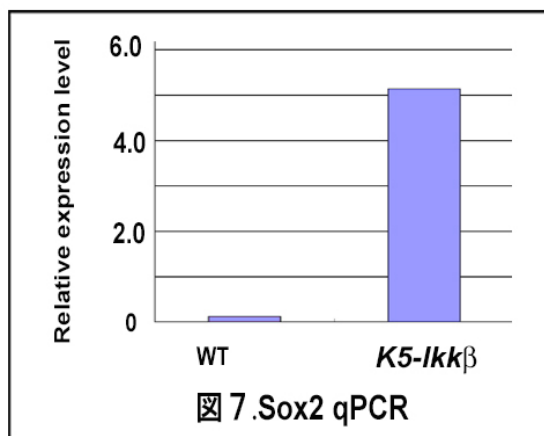


図7. Sox2 qPCR

〔雑誌論文〕（計6件）

1. Kanemaru H, Yamada Y, Ohazama A, Maeda T, Seo K. Semaphorin 3A Inhibits Nerve Regeneration During Early Stage after Inferior Alveolar Nerve Transection. *Sci Rep*. 2019; 12:9(1):4245. doi: 10.1038/s41598-018-37819-6.
2. Nishida Y, Yamada Y, Kanemaru H, Ohazama A, Maeda T, Seo K. Vascularization via activation of VEGF-VEGFR signaling is essential for peripheral nerve regeneration. *Biomed Res*. 2018;39(6):287-294. doi: 10.2220/biomedres.39.287.
3. Tamura H, Maekawa T, Domon H, Hiyoshi T, Yonezawa D, Nagai K, Ochiai A, Taniguchi M, Tabeta K, Maeda T, Terao Y. Peptides from rice endosperm protein restrain periodontal bone loss in mouse model of periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2019;98:132-139. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.11.021. Epub 2018 Nov 20.
4. Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Yokoji M, Sulijaya B, Maekawa T, Ushiki T, Mikami Y, Hayatsu M, Mizutani Y, Kishino S, Ogawa J, Arita M, Tabeta K, Maeda T, Yamazaki K. A bacterial metabolite ameliorates periodontal pathogen-induced gingival epithelial barrier disruption via GPR40 signaling. *Sci Rep*. 2018;8(1):9008. doi: 10.1038/s41598-018-27408-y.
5. Yamada Y, Ohazama A, Maeda T, Seo K. The Sonic Hedgehog signaling pathway regulates inferior alveolar nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2018;671:114-119. doi: 10.1016/j.neulet.2017.12.051. Epub 2018 Feb 8.
6. Suda D, Ohazama A, Maeda T, Kobayashi T. The effect of bone mass and architecture on mandibular condyle after mandibular distraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017;124(4):339-347. doi: 10.1016/j.oooo.2017.05.472. Epub 2017 May 25.

〔学会発表〕（計1件）

1. Yamada A, Ohazama A, Maeda T. The role of NF- κ B in tooth development. International collaborative symposium on development of human resources in practical oral health and treatment, 10th-12th February, Thailand 2019

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

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

川崎勝盛 (KAWASAKI, Katsushige)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：40529640

川崎真依子 (KAWASAKI, Maikoe)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：405845870

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

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。