

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11453

研究課題名(和文)非筋型ミオシンIIが歯の幹細胞ニッチの形成とエナメル芽細胞の移動に果たす役割

研究課題名(英文)The role of non-muscle myosin II for the niche formation of dental epithelial stem cells and the movement of ameloblasts

研究代表者

山中 淳之(Yamanaka, Atsushi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：80343367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯の形態形成過程における、細胞の挙動に関しては不明な点が多い。本研究の目的は、歯の発生初期における非筋ミオシンIIの働きを介した歯胚上皮の細胞の挙動を明らかにすることである。そこで、マウスの切歯歯胚におけるミオシンIIの局在を調べたところ、初期シグナリングセンターやエナメル結節周辺の歯胚上皮で強い収縮力を発揮していることが分かった。また、上皮特異的にミオシンIIの機能を阻害すると、歯胚上皮の間葉中への陥入やその後の形態形成が進行しないことが分かった。さらに、歯胚上皮の基底層、基底上層の分化や、細胞分裂の基底層への局在にミオシンIIの働きが必要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の形成不全の要因の一つは、遺伝子の変異による歯胚の形態形成初期の異常もしくは停止である。しかし、原因となる遺伝子により、歯胚を構成する細胞がどのような挙動を示し、歯の形態形成が進行するのかはほとんど分かっていない。本研究は、非筋ミオシンIIがもたらす歯胚上皮の収縮や再配置を介した歯の形態形成の制御機構を明らかにした。今後、さらに非筋ミオシンIIの機能亢進を制御する上流のシグナルが明らかになれば、歯の形成不全のメカニズム解明への大きな一歩となる。

研究成果の概要(英文)：Little is known about cell behaviors during tooth morphogenesis. The present study answers the cell behaviors of dental epithelium mediated by the non-muscle myosin II activity during early tooth development. We studied localization of non-muscle myosin II in the mouse incisor tooth germs, and found that they were concentrated around early signaling center and enamel knot, suggesting intense cellular strains near these structures within the dental epithelium. Loss-of-function of myosin II from epithelial cells resulted in the failure of dental epithelial invagination and later morphogenesis. Moreover, we revealed that myosin II activity was necessary for differentiation of basal and suprabasal layers, and for the localization of cell proliferation in the basal layer.

研究分野：口腔組織学・発生学

キーワード：歯の発生 上皮 形態形成 ミオシン 器官培養 コンディショナルKO

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の発生を制御する様々な遺伝子が同定され、その役割が明らかにされてきた。特に、FGF, BMP, Wnt, Shh などのシグナリングが、歯の形成開始やその後の形態形成を制御していることが明らかになってきた (Jernvall & Thesleff, 2012; Yu & Klein, 2020)。しかし、歯の形態形成過程における、細胞の挙動 (cell behavior) に関しては不明な点が多い。例えば、歯胚上皮の肥厚開始や間葉中への陥入における細胞の挙動、蕾状期から帽状期へ形態形成における細胞の挙動などはほとんど分かっていない。

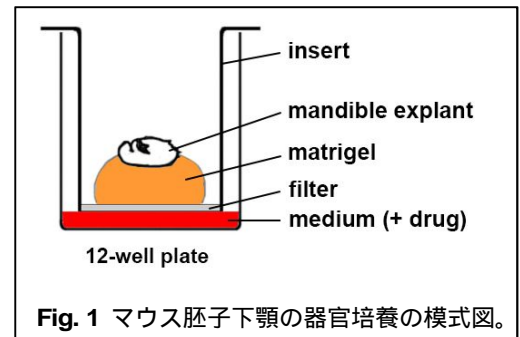
2. 研究の目的

そこで、本研究では、歯胚上皮の収縮や再配置といった細胞の挙動にとって重要な働きをしていると考えられる非筋ミオシン II (non-muscle myosin II) に着目した。非筋ミオシン II は、アクチンフィラメントに結合するモータータンパク質であり、双極性の重合体を形成し、アクチン細胞骨格を収縮させる。上皮細胞では、アクチン細胞骨格は細胞間接着分子であるカドヘリンと結合しているため、ミオシン II が機能すると上皮組織に張力が発生する (Vicente-Manzanares et al., 2009)。本研究の目的は、歯の発生初期における非筋ミオシン II の働きを介した歯胚上皮の細胞の挙動を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) マトリゲルを使ったマウス切歯歯胚の器官培養実験

胎生 11.5 日齢 (E11.5)、あるいは 12.5 日齢 (E12.5) のマウスの下顎前方部を無菌化で切り出し、人工基底膜マトリクスであるマトリゲルの上に置き (Fig. 1)、37 °C の CO₂ インキュベーター内で器官培養を行った。この際、培地にミオシン II の阻害剤である Blebbistatin を添加し、形態形成の変化を観察した。



(2) ミオシン II 重鎖をコードする遺伝子の歯胚上皮特異的なノックアウト

Keratin 14 発現細胞でタモキシフェン誘導型の CreER 遺伝子組換え酵素が発現する K14-CreER マウスと、2つのミオシン II 重鎖 (IIA および IIB) をコードする遺伝子 *Myh9* および *Myh10* のエクソンを loxP 配列で挟んだ *Myh9^{fl/fl}* マウスと *Myh10^{fl/fl}* マウスを交配させた。妊娠雌にタモキシフェンを腹腔内注射し、口腔上皮および歯胚上皮特異的にミオシン II 重鎖遺伝子を欠損させた胚子を収穫した。

(3) BrdU の取り込み

培養した下顎では、収穫の 1 時間前に培地に濃度 0.1mg/ml の BrdU を添加した。1 時間後に培養した下顎を Hank's 液で洗浄後、4%PFA にて固定した。胚子では、妊娠雌の体重 1g に対して 0.1mg の濃度になるように BrdU を腹腔内注射し、1 時間後に胚子を収穫し、同様に固定した。

(4) 蛍光免疫染色と *in situ* hybridization

培養した下顎前方部あるいは胚子の頭部をパラフィン包埋し、厚さ 7µm の矢状断組織切片を作製した。切歯の歯胚を含む切片に対し、蛍光免疫染色や *in situ* hybridization を行い、タンパクや mRNA の局在を調べた。

4. 研究成果

(1) マウス切歯の発生過程における非筋ミオシンの局在

マウスの切歯の歯胚は、E11.5 に歯胚上皮の肥厚、間葉中への陥入が開始し、E12.5 には蕾状期初期、E13.5 には蕾状期後期から帽状期への移行期、E14.5 には鐘状期初期に達した (Fig. 2A-A'')。肥厚開始期や蕾状期初期には歯胚上皮内に初期シグナリングセンターがあり、*Shh* などを強く発現するが、それ自身は BrdU 陰性の細胞増殖をしない細胞集団であった (Fig. 2A, A', B, B')。蕾状期後期には陥入した歯胚上皮の舌側に BrdU 陰性のエナメル結節が形成され、*Shh* が強く発現した (Fig. 2A'', B'')。

ミオシン II の 2 つの重鎖 IIA と IIB は、歯胚上皮の陥入が進行すると内部の基底上層に強く発現するようになったが、基底層においては発現が弱かった (Fig. 2C-C'', D-D'')。間葉においては、IIA は血管周囲に局限して発現する一方で、IIB は間葉の細胞に一樣に強く発現した (Fig. 2C-C'', D-D'')。ミオシンの軽鎖がリン酸化すると、ミオシン分子が活発にアクチンフィラメントを引き寄せ、細胞内で張力が発生していることを示す。リン酸化軽鎖は、歯胚上皮においては、蕾状期初期には初期シグナリングセンター周囲に、蕾状期後期にはエナメル結節周囲に比較的強い局在が見られた (Fig. 2E', E'')。間葉においては、血管周囲だけでなく間葉全体に強い発現が見られた。

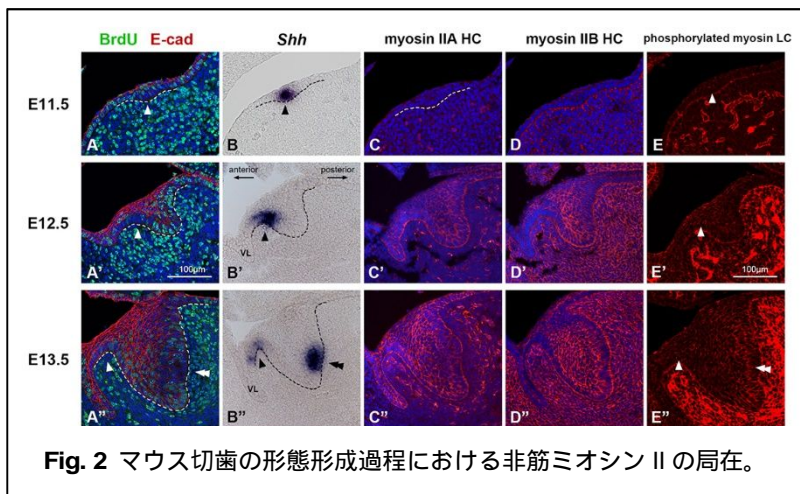


Fig. 2 マウス切歯の形態形成過程における非筋ミオシン II の局在。

リン酸化軽鎖は、歯胚上皮においては、蕾状期初期には初期シグナリングセンター周囲に、蕾状期後期にはエナメル結節周囲に比較的強い局在が見られた (Fig. 2E', E'')。間葉においては、血管周囲だけでなく間葉全体に強い発現が見られた。

(2) 切歯歯胚の器官培養を利用したミオシン II 阻害剤 Blebbistatin が歯胚の形態形成に与える影響

我々は次に、歯の形態形成過程における非筋ミオシン II の役割を調べるために、ミオシン II の機能阻害剤である(-)-Blebbistatin を添加した歯胚の器官培養実験を行った。蕾状期初期にあたる E12.5 の切歯歯胚を 1 日から 3 日培養した。コントロール群では、歯胚上皮の間葉中へ陥入および形態形成が進行し、培養 3 日目には蕾状期後期から帽状期への移行期に達した (Fig. 3A-C)。歯胚上皮の舌側には、BrdU 陰性かつ *Shh* 陽性のエナメル結節を観察できた (Fig. 3A-C, A'-C')。つまり、この器官培養系は発生の進行は *in vivo* の歯胚と比較して遅いながらも、形態形成は *in vivo* を再現していることが分かる。一方で、50 μ M の Blebbistatin を添加した実験群では、上皮の陥入が進行せず、エナメル結節に相当する構造が口腔上皮近くの非常に浅い位置に形成された (Fig. 3D-F, D'-F')。これらの結果は、蕾状期初期の歯胚上皮が間葉中へ陥入と形態形成を続け、帽状期へと移行するため

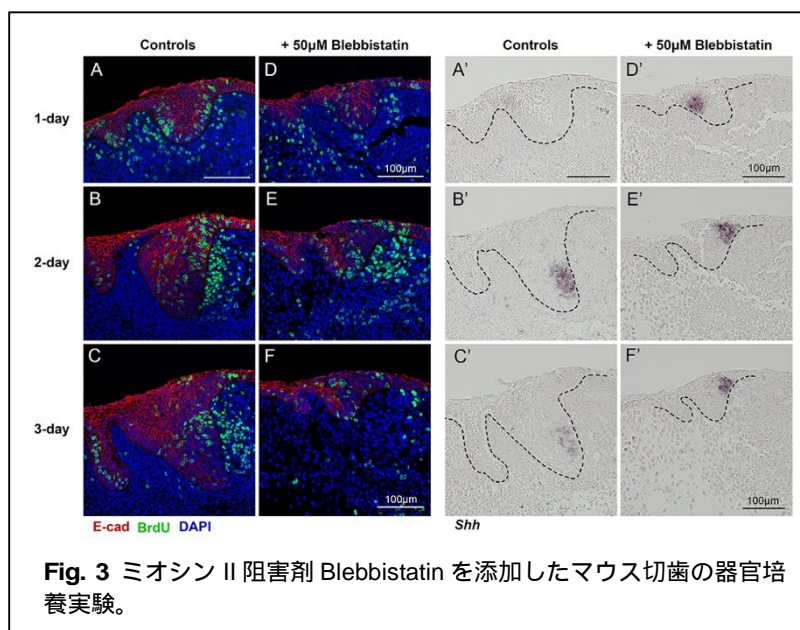
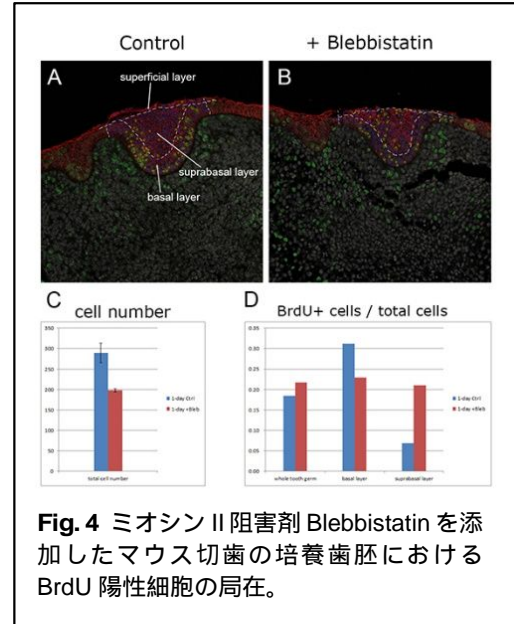


Fig. 3 ミオシン II 阻害剤 Blebbistatin を添加したマウス切歯の器官培養実験。

には、非筋ミオシンの役割が必要であることを示している。

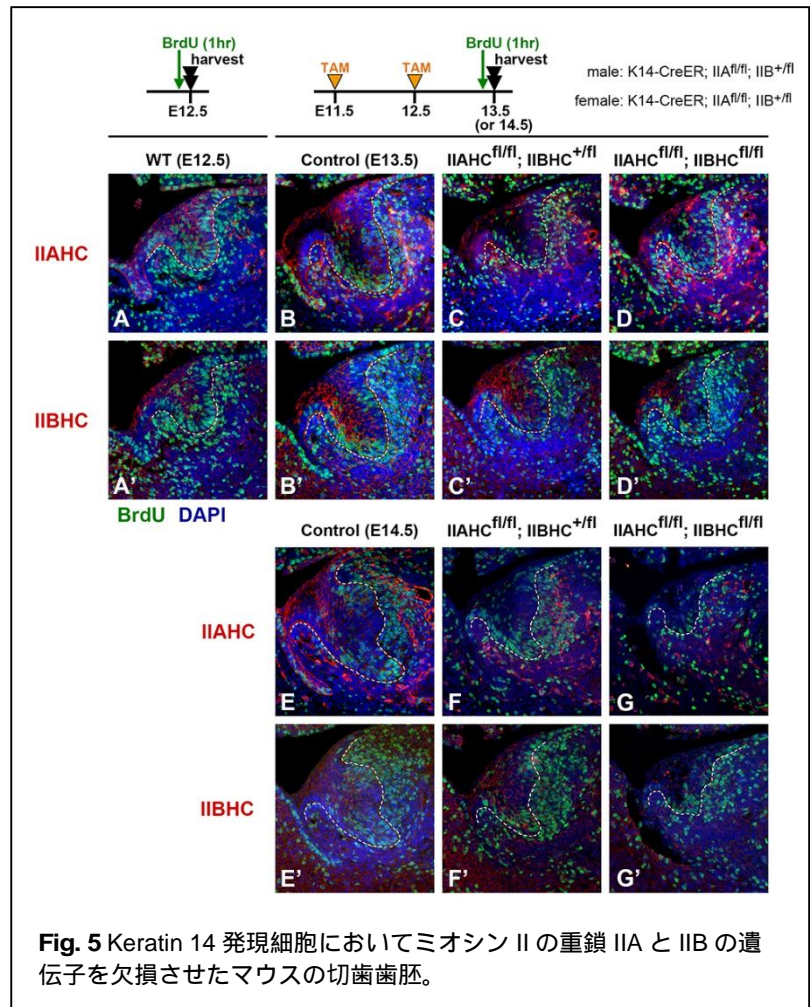
一方で、細胞増殖中であることを示す BrdU 陽性の細胞は、Blebbistatin 添加群でも歯胚上皮に多く存在することから、歯胚上皮の陥入が起こらなかった原因は細胞増殖の減少ではないと考えられた。そこで、1日培養の歯胚で BrdU 陽性細胞の歯胚上皮内での局在を調べた (Fig. 4)。歯胚上皮を基底層 (basal layer)、基底上層 (suprabasal layer)、表層 (superficial layer) に区分し (Fig. 4A, B)、BrdU 陽性細胞の数の割合を定量化した。歯胚全体では、BrdU 陽性細胞の割合に差はなかったが、コントロール群では、基底層に BrdU 陽性細胞が集中して存在しているのに対して、Blebbistatin 添加群では歯胚上皮に一様に分散して存在した (Fig. 4D)。



(3) 上皮特異的なミオシン II 遺伝子欠損が歯胚の形態形成に与える影響

ミオシン II 阻害剤添加の器官培養実験から、ミオシン II の機能阻害が起こると歯胚上皮の陥入や形態形成が進行しないことが分かったが、リン酸化ミオシンは上皮と間葉の両方に発現していることから (Fig. 2E', E''), 歯胚上皮と間葉のどちらのミオシン II の働きが重要なのかは分からない。そこで、上皮特異的にミオシン II 遺伝子を欠損させたマウスの切歯歯胚を調べた (Fig. 5)。

妊娠マウスに、E11.5 と E12.5 の 2 回タモキシフェンを腹腔内注射し K14 発現細胞にて遺伝子欠損を起こした。遺伝子組換えが起こらなかったコントロール群では野生型と同じ表現型を示した (Fig. 5B, B', E, E')。IIA 重鎖だけを欠損させた群では、歯胚上皮の陥入が小さく (Fig. 5C, C')、帽状期へと形態形成は進むが、エナメル結節が浅い位置に形成された (Fig. 5F, F')。さらに、IIA と IIB の二つの重鎖



を欠損させると、歯胚上皮の陥入がほとんど起こらず (Fig. 5D, D')、その後も形態形成が進まなかった (Fig. 5G, G')。この表現型はミオシン阻害剤を添加して培養した歯胚上皮の形態と類似していた。これらの結果は、蕾状期初期以降の歯胚上皮の陥入および帽状期への形態形成には歯胚上皮におけるミオシン II の働きが必要であることを示している。

(4) 結論

以上の結果をまとめると次のようになる。 歯胚の形態形成過程で、ミオシン II は活発に機能しているが、特に歯胚上皮では、初期シグナリングセンターやエナメル結節周辺で強い収縮力を発揮している。 上皮におけるミオシン II の働きは、歯胚上皮の陥入や蕾状期から帽状期への形態形成に必要である。 ミオシン II の働きは歯胚上皮の基底層、基底上層の分化、特に細胞分裂が基底層に局在するのに必要である。

上皮組織において、細胞内のアクチンフィラメントは E-カドヘリンと結合しているので、ミオシン II によるアクチンフィラメントの張力は組織の収縮力を発生させる。リン酸化ミオシン軽鎖がシグナリングセンター周囲の細胞に強く発現していることは、シグナリングセンターを中心に歯胚上皮が収縮していることを示している。基底上層におけるこの収縮が歯胚上皮の陥入や、シグナリングセンターを中心とした上皮の陥凹した形態形成に必要なのだろう。Shh シグナルが歯胚上皮の陥入や形態形成に必要であることが示されており (Li et al., 2016)、シグナリングセンターから分泌される Shh は、ミオシン II の機能亢進を引き起こす候補の一つであると考えられる。

歯胚上皮の陥入や形態形成は、細胞増殖に依存しないことが示されている (Yamada et al., 2019)。我々の結果はこのことに矛盾しない。なぜなら、ミオシン II の機能阻害をすると、歯胚上皮の細胞増殖は変化しないが、陥入や形態形成が進行しないからである。一方で、我々は、ミオシン II の働きが、基底層と基底上層の分化、さらには、細胞分裂が基底層に局在することに必要であることを明らかにした。インテグリンはマウス切歯の TA 細胞 (transit-amplifying cells) の増殖を制御していることが示されている (Hu et al., 2017)。ミオシン II はインテグリンの働きを介して基底層の細胞増殖を制御しているのかもしれない。基底層に細胞分裂が局在することが歯胚上皮が間葉中へ陥入するために必要なのか、あるいは両者は独立した過程なのか、は今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中淳之, 岩井治樹, 倉本恵梨子, Ashis Dhar, 後藤哲哉
2. 発表標題 歯胚上皮の陥入および形態形成過程における非筋ミオシンIIの役割
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中淳之, 岩井治樹, 倉本恵梨子, Ashis Dhar, 後藤哲哉
2. 発表標題 非筋ミオシンIIによる上皮細胞内張力は歯胚上皮の陥入、形態形成に必要である
3. 学会等名 第74回日本解剖学会九州支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中淳之, 岩井治樹, 倉本恵梨子, Ashis Dhar, 後藤哲哉
2. 発表標題 非筋ミオシンIIによる上皮細胞内張力は歯胚上皮の陥入、形態形成に必要である
3. 学会等名 第124回日本解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中淳之, Jimmy Hu, 後藤哲哉, Ophir Klein
2. 発表標題 マウス切歯の形態形成における非筋ミオシンIIの役割
3. 学会等名 第58回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山中淳之, Jimmy Hu, 後藤哲哉, Ophir Klein
2. 発表標題 マウス切歯の形態形成における非筋ミオシンIIの役割
3. 学会等名 日本解剖学会 第72回九州支部学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中富 満城 (Nakatomi Mitsushiro) (10571771)	九州歯科大学・歯学部・講師 (27102)	
研究協力者	クライン オフィア (Klein Ophir)	カリフォルニア大学サンフランシスコ校	
研究協力者	フー ジミー (Hu Jimmy)	カリフォルニア大学ロサンゼルス校	