

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15813

研究課題名(和文) 歯根膜間葉細胞から歯の再生のためのエナメル上皮細胞が作れるか？

研究課題名(英文) Approach of production of dental epithelial cells from periodontal ligament mesenchymal cells for tooth regeneration

研究代表者

原田 英光 (Harada, Hidemitsu)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：70271210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜に紛れ込んでいるEMT細胞を再度上皮化することでエナメル上皮幹細胞として歯の再生に利用できないかを検討した。HERSからのEMT細胞に対してEMTの抑制あるいはMETを誘導するために、Rhoシグナルの活性化を考えた。そこでRhoアクチベーターの利用、Rhoを活性化するセマフォリンシグナル、LPAシグナルの効果を検討した。その結果、これらの因子はどれも効果的にEMTを阻害して、かつMETを誘導することが期待できた。しかしながら、これらの細胞を使ったとしても歯胚の再生に応用するには十分な細胞数を確保できないという問題点が残された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to produce dental epithelial stem cells from mesenchymal cells in periodontal ligament by mesenchymal-epithelial transition (MET) and to utilize the epithelial cells for tooth regeneration. In order to obtain their cells, we tried to inhibit the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and induce epithelial cells from EMT cells. As a result, Rho activator, Semaphorin4A and 4D, LPA (lysophospholipid) activate Rho signal and inhibited the EMT, and further induced MET and hyper-epithelium. But, it was difficult to obtain enough cell number of dental epithelial cells, it remains as further problem.

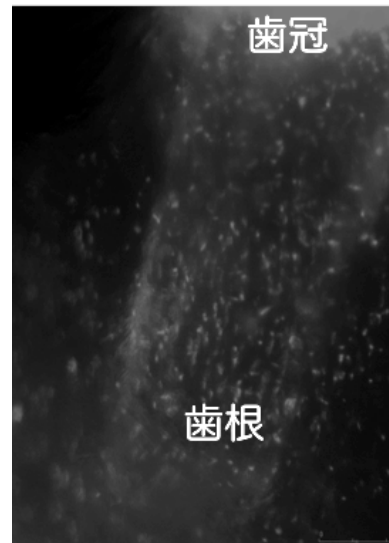
研究分野：再生歯学

キーワード：ヘルトピッチ上皮鞘 上皮間葉転換 歯の再生 間葉上皮転換 セマフォリン

1. 研究開始当初の背景

歯の再生は、胎生期歯胚の上皮細胞と間葉細胞を再凝集させて歯胚を構築する手法が主体である。しかし、ヒトの歯を考えた場合、再生に利用する幹細胞をどこから採取するかが課題である。多くの歯の再生研究者は、ヒトの歯の再生を考えて、エナメル上皮細胞をマラッセの残存上皮や外エナメル上皮、毛の幹細胞などから作製することを試みているが、細胞数の問題などでその成功率は極めて低い。そのため、細胞ソースをどこに求めるかが大きな課題となっている。従来の器官再生は、上皮は上皮から、間葉細胞は間葉から採取するのが固定した概念であった。近年、EMTならびにMETの分子メカニズムが明らかになってきており、このメカニズムを逆に応用すれば上皮細胞も間葉組織から採取することが可能になると考えた。我々は、遺伝的細胞系譜追跡法と透明化標本の技術によって、HERS細胞がEMTによって歯根膜内に紛れこんだ後もその細胞を追跡でき、さらに深部共焦点画像化を行うと非破壊的に且つ3次元で視覚化できることや細胞動態のタイムラプス観察が可能となったことで、今までにない視点でHERS細胞を捉えることができるようになった。その結果から、想像よりも多くのEMT細胞が歯根膜に存在することやHERSやマラッセ残存上皮がEMT/METの可塑性をもった柔軟な細胞であることが推測された。これらの予備研究から、この転換を制御する技術は歯の再生に有用な上皮細胞を歯根膜から採取することを可能にさせると考えた。間葉細胞から上皮細胞を生み出すという奇抜な発想ではあるが、これが成功すれば、歯に限らず様々な組織を探索することによって、従来の発想にない細胞供給源の多様性を示すことになると考えた。我々は、CK14を発現した細胞が赤色蛍光 (Tomato) を発現するCK14cre/Rosa26RtdTomatoマウスを作製して歯の発生過程を観察したところ、歯根膜内に

マラッセ残存上皮の数以上にTomato陽性細胞が存在することに気づいた。



生後23日のマウス下顎第1大臼歯歯根。数多くのTomato陽性細胞が歯根膜に見られる。

そこで歯根膜に紛れ込んでいるEMT細胞を再度上皮化(MET)して、エナメル上皮幹細胞として歯の再生に利用できないかを検討することとした。

2. 研究の目的

歯髄や歯根膜などに紛れ込んでいるEMT細胞を再度上皮化することでエナメル上皮幹細胞として歯の再生に利用できないかを検討することを目的に、マウスの歯根膜に存在するEMT細胞に対してMETを誘導する技術の開発、METを誘導した細胞を用いてエナメル上皮細胞へ分化誘導する技術の開発、MET誘導細胞あるいはMET細胞から分化誘導されたエナメル上皮細胞と歯乳頭細胞とのリコンビナント歯胚を作製して歯の再生が可能かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Rho activator を用いた Rho の活性化と上皮化に関する研究
HERS01a(ヘルトビッチ上皮細胞株)を用いて Rho の活性化が上皮細胞化および上皮組織化に及ぼす影響について検討した。

Rho シグナルの活性が低下すると上皮細胞は EMT を起こして遊走を始める。そこで、それとは反対に Rho activator を培養細胞に添加することで上皮細胞としての特性の維持と細胞の高度な上皮化誘導を狙う。そこで HERS01a 細胞に Rho activator を添加して、上皮マーカーの発現上昇やアクチンフィラメントの構築、細胞シートのスクラッチアッセイ法で上皮シートの形成能を評価する。

(2) Rho シグナルを活性化する因子の探索。すでにエナメル芽細胞ではセマホリン 4D によって Rho を活性化することを報告した。そこで歯根発生過程でのセマフォリンとその受容体の発現について、免疫組織学的方法と in situ hybridization 法で検索した。

(3) Sema4D を用いたエナメル上皮ならびに HERS 細胞の Rho の活性化誘導と上皮組織化。培養細胞に Sema4D を添加後の活性化型 RhoA-GTP を ELISA 法と免疫組織学的方法で検出する。

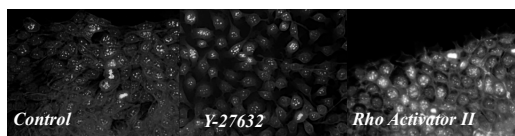
(4) 新規 Rho 活性化因子としての LPA (lysophospholipid) の機能の探索。LPA による Rho の活性化を活性化型 RhoA-GTP の形成で検討する。また LPA の受容体の発現を免疫組織学的に調べる。

(5) EMT 細胞の採取と MET 誘導、歯胚上皮細胞凝集塊の作製。

4. 研究成果

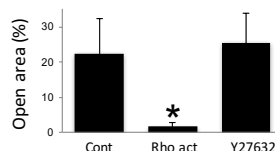
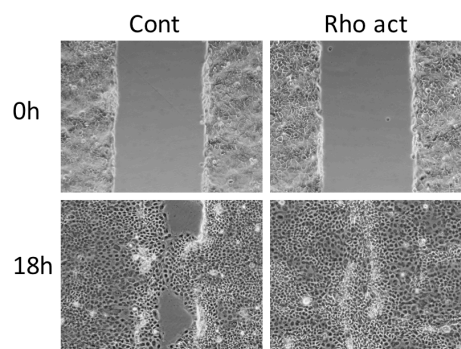
(1) Rho activator を用いた Rho の活性化と上皮化に関する研究。

HERS01a 細胞をラプテックチャンバーにまいたあと、Rho activator を添加してアクチンフィラメントを免疫組織学的に検出した結果、アクチンの発現上昇とフィラメントの高度な構築、上皮細胞間のタイトな結合が誘導された。



Rho activator を添加した群はファロイジンの染色性の向上と細胞間の強度な結合が観察された。

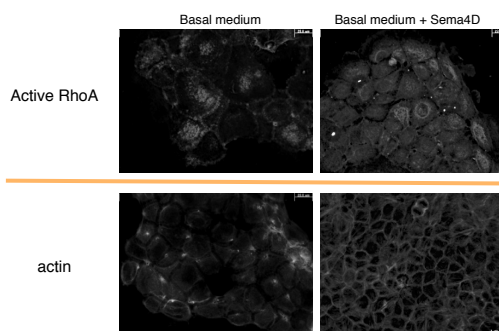
さらに HERS01a 細胞をラプテックチャンバーにまいてコンフルエントにした後、中央に約 2 mm のスクラッチを作製してその修復能を検討した。その結果、Rho activator を添加した群が明らかに組織修復と上皮化を認めた。



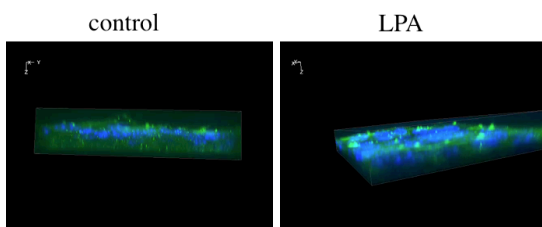
(2) Rho シグナルを活性化する因子の探索。Rho 関連の遺伝子群で歯根に発現する因子の探索を行った。その結果、Semaphorin4A ならびにその受容体である PlexinB1, Plexin B2 が HERS に発現することを認めた。

(3) Sema4D を用いたエナメル上皮ならびに HERS 細胞の Rho の活性化誘導と上皮組織化。

Sema4D による Rho シグナルの活性化について ELISA 法にて検討した結果、約 12 分で活性化 RhoA-GTP が誘導された。さらに免疫組織学的にも活性化 RhoA-GTP の誘導を確認した。さらにファロイジン染色にて、アクチンの発現増加とネットワークの形成、高度な上皮シートの形成が認められた。



(4) 新規 Rho の活性化因子としての LPA(lysophospholipid)の機能の探索。Rho を活性化して上皮の維持や上皮化を誘導する因子として LPA を発見した。LPA の受容体 LPA6 について免疫組織学的に検索した結果、成熟期エナメル芽細胞から退縮エナメル上皮、HERS にその発現を認めた。そこでエナメル上皮細胞に LPA を添加して培養したところ、活性型 RhoA-GTP の形成を細胞上面に誘導した。この結果から LPA もまた上皮化を誘導する因子になり得ることが明らかとなった。LPA の合成・分泌を担う細胞の探索については今後の研究課題である。



LPAの添加は、活性型RhoA-GTPの形成と細胞上面への誘導を認めた。

(5) EMT 細胞を採取する目的で、HERS に由来するマラッセ上皮遺残と EMT 細胞の追跡に用いる赤色蛍光 Tomato を発現する CK14cre/Rosa26RtdTomato マウスを作製し、その後サイトケラチン(CK)14 発現細胞を2重免疫染色法によって検出した。しかし、歯根成長期(生後10日から14日頃)では Tomato 陽性細胞の約20%に EMT 細胞(サイトケラチン陰性かつ Tomato 陽性)を検出できたが、生後21日以降(歯根がほぼ完成)では2%以下しか存在しなかった。これは歯根形成とともに EMT によって移動した HERS 細胞は再び間葉上皮転換(MET)を起こして上皮化している。この結果は歯根が完成した歯根膜腔には EMT による HERS 由来の間葉細胞がほとんど存在しないことを示した。

考察

歯髄や歯根膜などに紛れ込んでいる EMT 細胞を再度上皮化することでエナメル上皮幹細胞として歯の再生に利用できないかを検

討することを目的に研究を行った。HERS やマラッセ上皮は本来幹細胞的な性質があることはすでいくつかの論文で報告があるので、マウスの歯根膜における HERS からの EMT 細胞に対して EMT を抑制あるいは MET を誘導することが効果的である。そのため、EMT を誘導する TGF- β の活性を下げることで、Rho シグナルを活性化することが考えられた。そこで Rho のアクチベーターを利用することで、Rho を活性化するセマフォリンシグナル、LPA シグナルの効果を検討した。その結果、これらの因子はどれも効果的に EMT を阻害して、かつ MET を誘導することが期待できた。しかしながら、これらの細胞を使ったとしても歯胚の再生に応用するには十分な細胞数を確保できないという問題点が残された。

●主要な研究成果のまとめ

- ① Rho の活性化が EMT を抑制するあるいは MET を誘導する可能性があること。
- ② HERS においてはセマフォリン4Dに加えて、セマフォリン4Aが Rho シグナルを活性化していること。
- ③ LPA という新たな Rho の活性化分子を発見したこと。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- 1) Kikuchi K, Masuda T, Fujiwara N, Kuji A, Miura H, Jung H-S, Harada H, Otsu K. Craniofacial Bone Regeneration using iPS Cell-Derived Neural Crest Like Cells. *J Hard Tissue Biol.* 27(1) 1-10 (2018)
- 2) Itaya S, Oka K, Ogata K, Tamura S, Kira-Tatsuoka M, Fujiwara N, Otsu K, Tsuruga E, Ozaki M, Harada H. Hertwig's epithelial root sheath cells contribute to formation of periodontal ligament through epithelial-mesenchymal transition by TGF- β . *Biomed. Res* 38(1):61-69. (2017)
- 3) Ida-Yonemochi H, Otsu K, Ohshima H,

Harada H. The glycogen metabolism via Akt signaling is important for the secretion of enamel matrix in tooth development. Mech Dev. (2016) 139 8-30 doi:10.1016/j.mod.2016.01.002.

- 4) Otsu K, Ida-Yonemochi H, Fujiwara N, Harada H. The Semaphorin 4D-RhoA-Akt Signal Cascade Regulates Enamel Matrix Secretion in Coordination with Cell Polarization During Ameloblast Differentiation. J Bone Miner Res. (2016) 24. doi: 10.1002/jbmr.2876.
- 5) Otsu K, Harada H. Rho GTPases in ameloblast differentiation. Japanese Dental Science Review. 52(2), 32-40, (2016) doi: 10.1016/j.jdsr.2015.09.001

[学会発表] (計 14 件)

- 1) Harada H, Otsu K, Fujiwara N. Dynamics of dental epithelial cells using contact inhibition of locomotion via EMT during tooth root development. 18th International Congress of Developmental Biology, Singapore 18-22 June 2017
- 2) 大津圭史, 藤原尚樹, 原田英光. 歯根-歯周組織形成を司るヘルトヴィッヒ上皮鞘のダイナミクスと分子制御メカニズム 第 59 回歯科基礎医学会学術大会シンポジウム 形態形成 9 月 18 日 松本 (2017)
- 3) 藤原尚樹, 大津圭史, 原田英光. Hertwig 上皮鞘から遊走する細胞動態の解析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 9 月 18 日 松本 (2017)
- 4) 原田英光 歯と歯周組織再生に向けた培養技術 高分子学会第 66 回医用高分子研究会 東京(首都大東京秋葉原サテライトキャンパス) 2016 年 3 月 14 日
- 5) Otsu K, Ida-Yonemochi H, Fujiwara N, Harada H. Sema4D-RhoA signaling ensures

ameloblast differentiation with a multifunctional regulatory mechanism. Tripartite Conference on Tooth and Bone; Development & Regeneration. Yantai, China, 6/2-5, 2016

- 6) Harada H. Contact inhibition of locomotion via EMT by TGF-Rho signal leads to genesis of Epithelial cell rests of Malassez from Hertwig's epithelial root sheath. 15th Annual Meeting of the Korean Basic Dental Science Society Association. Seoul Korea 11/25 2016
- 7) Harada H. Contact inhibition of locomotion via EMT by TGF-Rho signal leads to genesis of Epithelial cell rests of Malassez from Hertwig's epithelial root sheath. International symposium 2016 in Osaka Univ. Osaka, Japan 12/ 12 2016

[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

原田 英光 (HARADA, Hidemitsu)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：40326690

(2) 研究分担者

藤原 尚樹 (Fujiwara, Naoki)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号：20190100

大津 圭史 (OTSU, Keishi)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：60509066

西谷 直之 (NISHIYA, Naoyuki)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：10286867