

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11616

研究課題名(和文)メカノセンサーを基盤とした歯の発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of tooth development based on mechanosensor

研究代表者

和田 裕子(Wada, Hiroko)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70380706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯と歯周組織は咀嚼や咬合圧の受容器として機能することから、メカノセンサーであるPiezo1が、歯の発生過程において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。本研究は、歯胚発生過程におけるPiezo1の発現様式と機能を解析し、Piezo1が歯の形態形成にどのように関わっているか明らかにすることを目的とした。その結果、マウス歯胚発生過程の下顎第一臼歯歯胚において、Piezo1 mRNAは時期特異的な発現パターンを示した。また、Piezo1はmDE6細胞とマウス歯胚において細胞増殖に関与することが示唆された。さらに、Piezo1はマウス歯胚においてエナメル芽細胞の分化に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すべての臓器や器官は上皮間葉相互作用によって構成されており、歯の発生においても上皮間葉相互作用が極めて重要なステップであることが明らかになっている。「歯の再生医療」の実現のためには、上皮間葉相互作用を含む歯の発生メカニズムの解明が必須とされ、多数の研究室の取り組みにより多くの研究結果が報告されているが、未だ不明な点が多いのが現状である。本研究により、Piezo1が歯の形態形成に深く関わっていることを明らかにすることで、生物学的な意義だけでなく、歯の再生治療を含めた新規治療法の開発が期待され、「歯の再生医療」の実現に向けての意義が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mechanosensitive ion channel Piezo1 might play an important role during development of tooth and periodontal tissue which function as receptors of mastication and occlusal pressure. In this study, we investigated to analyze an expression pattern and function of Piezo1 during the development of mouse lower first molars to clarify how Piezo1 is associated with tooth morphogenesis. As results, we indicated that Piezo1 mRNA showed a specific expression pattern in the developing tooth germ, and that Piezo1 might be involved in proliferation of both mDE6 and mouse tooth germ and in differentiation of ameloblasts in the tooth germ.

研究分野：口腔病理学分野

キーワード：歯 発生 メカノセンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

すべての臓器や器官は上皮間葉相互作用によって構成されており、歯の発生においても上皮間葉相互作用が極めて重要なステップであることが明らかになっている。「歯の再生医療」の実現のためには、上皮間葉相互作用を含む歯の発生メカニズムの解明が必須とされ、多数の研究室の取り組みにより多くの研究結果が報告されているが、未だ不明な点が多いのが現状である。我々は、歯の発生初期において特異的に発現量の変化する遺伝子を cDNA subtraction 法を用い、これまでに報告されていなかった因子を網羅的に検出、同定し (Yamaza H et al., *Int J Dev Biol*, 2001) 歯胚発生過程における発現パターンや機能について報告してきた。

口腔は、咀嚼、嚥下および会話などの機能を果たしており、口腔内では咬合力などの物理的機械刺激などに対応できる環境でなければならない。近年、生体における「力」の役割と仕組みを解明してその応用を目指す「メカノバイオロジー」という分野が誕生し世界の潮流となっている。カルシウム透過性イオンチャンネルの Piezo は機械刺激のレセプター(メカノセンサー)として同定され、肺、膀胱、腸、また口腔では歯根膜など機械感受性を有する成熟した組織で発現しており、擦過力(ずり応力)や圧力の応答の重要な構成成分として注目されている (Coste B et al., *Science*, 2010)。また、Piezo ファミリーの Piezo1 は発生過程において血管内皮細胞の増殖や移動による応力の有無によって血管の拡大と退縮が制御され、血管形成に重要であることが報告されている (Li J et al., *Nature*, 2015)。

そこで我々は、咀嚼や咬合圧の受容器として機能する歯と歯周組織の発生過程においても、歯胚は上皮の陥入により始まり上皮細胞と間葉細胞がダイナミックに作用し合いながらその形態を成熟していくことから、メカノセンサーである Piezo1 が重要な役割を果たしている可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究は、歯胚発生過程におけるメカノセンサーPiezo1 の発現様式と機能を解析し、Piezo1 が歯の形態形成にどのように関わっているのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) マウス歯胚発生過程における Piezo1 の mRNA 発現様式

胎生 14 日齢 (E14), E15, E18, 生後 1 日齢 (P1), P3, P10, のマウス頭蓋顔面部組織を用い、in situ hybridization 法にて、下顎第 1 臼歯歯胚における Piezo1 の mRNA 発現パターンを解析した。

2) マウス歯原性上皮細胞株 mDE6 およびマウス E15 歯胚の器官培養を用いた Piezo1 のアゴニストとアンタゴニスト作用による細胞増殖能への影響

mDE6 とマウス E15 歯胚に Piezo1 アゴニストである Yoda1 および Piezo1 アンタゴニストである GsMTX4 を添加し、それぞれ細胞増殖実験を行った。

3) 器官培養法を用いた Piezo1 アゴニストとアンタゴニスト作用による歯胚形成能への影響

マウス E15 歯胚の器官培養に Piezo1 のアゴニスト Yoda1 とアンタゴニスト GsMTX4 をそれぞれ添加し、歯胚形成への影響を組織形態学におよび分子生物学的に解析を行った。

a) 歯原性因子のエナメル質分化マーカーである Amelogenin, Ameloblastin, Enamelin の発現についてリアルタイム PCR により定量解析を行った。

b) HE 染色を行い組織形態学的に解析した。

4. 研究成果

1) マウス歯胚発生過程における Piezo1 の mRNA 発現様式

マウス歯胚発生過程の下顎第1臼歯歯胚における Piezo1 の mRNA 発現様式を *in situ* hybridization 法を用いて解析した。その結果、Piezo1 は胎生期の蕾状期歯胚 (E14) で、上皮に強く発現を認め、帽状期歯胚 (E15) では上皮のサーピカルループやその周囲の間葉組織に強く発現し、鐘状期 (E18) になると内エナメル上皮および内エナメル上皮に接する歯乳頭細胞に発現を認めた。また、生後の基質形成期 (P1) や歯冠形成期 (P3) では、Piezo1 は、歯冠部のエナメル芽細胞と象牙芽細胞に発現していた。さらに、歯根形成期 (P10) になると、歯根部の象牙芽細胞に発現を認めた。

2) マウス歯原性上皮細胞株 mDE6 およびマウス E15 歯胚の器官培養を用いた Piezo1 のアゴニストとアンタゴニスト作用による細胞増殖能への影響

マウス歯原性上皮細胞株である mDE6 において、Piezo1 アゴニストである Yoda1 添加によるカルシウムイメージングを行ったところ、アゴニスト濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 流入が増加し、Piezo1 アンタゴニストである GsMTX4 添加によりその効果は減弱した。次に、Piezo1 アゴニスト Yoda1 を用いた細胞増殖実験では、Yoda1 添加群はコントロール群と比較して増殖を抑制した。一方、Piezo1 アンタゴニスト GsMTX4 を用いると、GsMTX4 添加群はコントロール群と比較して増殖を促進した。さらに、Piezo1 のアンタゴニスト GsMTX4 を添加したマウス E15 歯胚の器官培養では、Ki-67 の免疫染色を行った結果、GsMTX4 添加群では、歯胚の上皮組織および間葉組織の Ki-67 の発現がそれぞれ有意に増加した。これらの結果より、Piezo1 は mDE6 とマウス E15 歯胚において、細胞増殖に関与することが示唆された。

3) マウス E15 歯胚の器官培養法を用いた Piezo1 アゴニストとアンタゴニスト作用による歯胚形成への影響

Piezo1 アゴニストである Yoda1 およびアンタゴニストである GsMTX4 を用いた E15 歯胚の器官培養実験では、real-time PCR による定量解析にてそれぞれエナメル蛋白の発現量に影響を及ぼした。また、Piezo1 アンタゴニストである GsMTX4 を用いたマウス E15 歯胚の器官培養実験では、HE 染色による組織形態学的解析にてコントロールと比較し有意に歯胚のエナメル質形成量が減少した。これらの結果より、Piezo1 はエナメル芽細胞の分化に関わる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujii S., Tajiri, Y., Hasegawa, K., Matsumoto, S., Yoshimoto, R., Wada, H., Kishida, S., Kido, M., Yoshikawa, H., Ozeki, S., Kiyoshima, T.	4. 巻 100(2)
2. 論文標題 The TRPV4-AKT axis promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation via CaMKII activation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab Invest.	6. 最初と最後の頁 311-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-019-0357-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuiishi Y, Kato H, Yamaza H, Hirofuji Y, Sato H, Wada H, Kiyoshima T, Nonaka K.	4. 巻 495
2. 論文標題 Accelerated dentinogenesis by inhibiting the mitochondrial fission factor, dynamin related protein 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1655-1660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.026.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Misaki Abe, Hiroko Wada, Tamotsu Kiyoshima
2. 発表標題 Expression and function of Piezo1 and Piezo2 in tooth germ development
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience 2018（国際学会）
4. 発表年 2018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	清島 保 (Kiyoshima Tamotsu) (20264054)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	城戸 瑞穂 (Kido Mizuho) (60253457)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	永田 健吾 (Nagata Kengo) (90189134)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	藤井 慎介 (Fujii Shinsuke) (60452786)	九州大学・歯学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	長谷川 佳那 (Hasegawa Kana) (30793989)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関