

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07253

研究課題名(和文) 歯形成における細胞動態と歯上皮幹細胞の維持分化を司る制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of cell dynamics and differentiation of dental epithelial stem cells during tooth development

研究代表者

高橋 将文 (Takahashi, Masanori)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20361074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス上顎下顎形成および切歯形成におけるSIXファミリー転写因子の機能重複性を検証した。Six1/Six4二重欠損ホモ胚では上下顎原基が低形成であり、切歯は下顎のみで欠損した。Six1/Six2/Six4三重欠損ホモ胚では上顎が全く形成されなかった。また、Six1/Six4二重欠損ホモ胚の下顎切歯形成領域の組織を用いたRNAシーケンスにより、下流制御遺伝子を解析した。2915の発現変動遺伝子のうち、下顎間葉細胞で顕著に発現が減少する遺伝子としてAlx1、Masp1、舌筋前駆細胞で顕著に発現が減少する遺伝子として、Nkx2.5、Lbx1、Ckmt1を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯は、生活の質を左右する極めて重要な器官である。歯の形成は歯原基のパターン形成に始まり、上皮間葉相互作用を介した複雑な形態形成を経て完成し、一部の上皮細胞は組織幹細胞として維持される。しかしながら、顎および歯の形成における細胞動態や幹細胞の制御機構は未だ不明の点が多い。本研究で明らかにしたSIX1による下顎原基の前後極性制御、SIX1/SIX4による下顎切歯の分化制御と下流制御因子の同定、さらに、SIX1/SIX2/SIX4による上顎形成の新規制御機構は、哺乳類顔面形成の分子細胞機構の理解において学術的に意義があり、顔面形成疾患の発症機序の解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the functional redundancy of SIX transcription factors in maxillomandibular and incisor formation in mice. Six1/Six4 double-deficient embryos showed hypoplastic maxillomandibular primordia and lacked incisors only in the upper jaw. Six1/Six2/Six4 triple-deficient embryos did not form the upper jaw. We also analyzed downstream genes regulated by Six1/Six4 by RNA sequencing using tissues from the mandibular primordium of Six1/Six4 double-deficient embryos. We found that Alx1 and Masp1 were markedly downregulated in mandibular mesenchymal cells. We also found that Nkx2.5, Lbx1 and Ckmt1 were markedly downregulated in tongue muscle progenitor cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：歯の形成 切歯 Six1 Six4 Masp1 MASP3

1. 研究開始当初の背景

動物の多くの器官は、連続的な上皮間葉相互作用により形成される。すなわち、化学的および機械的シグナルを介した細胞間相互作用が、上皮の陥入、間葉細胞の凝集、およびダイナミックな組織変形を誘導することで、器官構造が完成する。器官をつくる細胞の一部は特殊化し、成体組織幹細胞として維持される。このように、上皮間葉相互作用は発生初期から成体組織の恒常性維持に至る極めて重要な過程である。しかしながら、歯の形成における細胞動態や幹細胞の制御機構は未だ不明の点が多い。

マウス下顎切歯の発生では、神経堤由来の間葉細胞と口腔上皮由来の切歯プラコードが時空間的に相互作用しながら、舌唇軸に対して非対称な構造をつくり、唇側上皮の末端ループ領域には、上皮幹細胞が生涯にわたって維持される。この幹細胞は、中間増殖細胞を生み出し、最終的にエナメル質を産生するエナメル芽細胞(アメロブラスト)へ分化する。切歯形成は一連の発生過程における上皮間葉相互作用や組織幹細胞制御の原理を探る上で有用なモデルである。これまでの研究から、歯原基のパターン形成を司る多くの遺伝子の発現様式が明らかになってきた。しかしながら、このような歯のパターン形成に続く過程において、「歯原基の上皮および間葉細胞が連続的な上皮相互作用の過程でどのように振る舞うのか？歯幹細胞の維持および分化能がどのように制御されるのか？」という学術的な問いが、残されている。

申請者は SIX ファミリー転写因子に着目し、歯の発生における SIX ファミリー転写因子の時空間的発現様式を明らかにした。特に、SIX1 は上顎下顎原基において、神経堤由来の初期歯間葉細胞に発現し、生後においては歯周組織である歯根膜細胞にも発現が維持されていた。また、申請者は、SIX1 が歯上皮幹細胞および中間増殖細胞に発現することも見出し、SIX1 がヒトおよびマウス歯根膜細胞の増殖を促進することを明らかにしてきた。申請者は、本研究を開始する前に、*Six1* 欠損ホモマウス下顎切歯では、本来唇側からのみ産生されるエナメル質が、舌側にも異所的に検出され、切歯プラコードの非対称な上皮陥入パターンが初期段階で失われていることを発見した。これらの観察から、SIX1 が切歯形成や歯上皮幹細胞の維持・分化において中心的な役割を担うことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、歯の上皮間葉相互作用における細胞動態や歯上皮幹細胞維持・分化の制御機構の解明を目的とし、SIX 転写因子ファミリーの機能解明に焦点を当てた。そのために、SIX ファミリー転写因子遺伝子欠損マウスと野生型マウスとの表現型比較により、1) SIX ファミリー転写因子による上顎下顎形成および切歯形成における機能重複の検証、2) 下顎形成および下顎切歯形成を司る SIX1/SIX4 下流因子の同定、を試みた。

3. 研究の方法

1) *Six2* 欠損ヘテロマウスと *Six1/Six4* 欠損ヘテロマウスとを交配し、*Six1/Six2/Six4* 三重欠損ホモ胚を作製した。組織学的手法により上顎下顎形成の変化が見られるかどうかを検証した。2) *Six1/Six4* 二重欠損ホモ胚および野生型胚の下顎原基切歯形成領域を切り出し、この組織を用いて RNA シークエンスによる発現変動遺伝子を解析した。*Six1/Six4* 二重欠損ホモ胚で変動の見られた遺伝子の発現変化を *in situ* hybridization により調べた。

4. 研究成果

1) SIX ファミリー転写因子による上顎下顎形成および切歯形成における機能重複の検証

Six1 欠損ホモ胚(所属研究室で作製)下顎切歯プラコードでは、初期切歯シグナリングセンターである前方領域 (initiation knot)での *Shh* の発現量が減少し、かつその発現位置が後方にシフトした。さらに *Six1* 欠損ホモ胚では、下顎前方部間葉での Wnt シグナル (*Top-gal* レポーター) 活性が亢進していた。また、切歯プラコードに接する間葉細胞では、Wnt シグナルのインヒビター *Dkk1* の発現が亢進していた。このことから、*Six1* は Wnt シグナル伝達系の正および負の制御を介して切歯の前後極性形成を司ることが示唆された。さらに、*Six1/Six4* 二重欠損ホモ胚(所属研究室で作製)では、下顎切歯プラコードが陥入せず、切歯が完全に消失したことから、SIX1 と SIX4 が下顎切歯の発生に極めて重要な因子であることが明らかとなった(これらの研究成果は *Takahashi et al., Dev. Dyn.* 2020 に発表した)。

一方、*Six1/Six4* 二重欠損ホモ胚上顎切歯プラコードは野生型と同様に陥入し、initiation knot が形成されていた。このことから、上顎原基では他の *Six* 遺伝子ファミリーが *Six1* および *Six4* の機能を補い、上顎切歯が形成されると考えられた。*SIX2* の特異抗体を作製し、*SIX2* と *SIX1*、*SIX4* との局在パターンを調べた。下顎原基の切歯形成領域における間葉細胞には *SIX2* は存在せず、上顎原基の切歯形成領域の間葉細胞においては、*SIX1* および *SIX4* と共局在していた。そこで、*Six2* が上顎切歯形成に関わるという仮説を立てた。

上顎原基間葉細胞における *SIX* ファミリーの機能重複を明確にするために、ゲノム編集により新たに *Six2* 欠損ヘテロマウスを構築し(徳島大学先端酵素学研究所共同利用支援による研究)既存の *Six1/Six4* 欠損ヘテロマウスとの交配により *Six1/Six2/Six4* 三重欠損ヘテロマウスを得た。この三重欠損ヘテロマウス同士を交配し、*Six1/Six2/Six4* 三重欠損ホモ胚を得た。胎齢 13.0 日の *Six1-/-Six4-/-Six2+/-* マウス胚では、少なくとも、上顎切歯は *Six1/Six4* 二重欠損ホモ胚と同様に形成されていたが、*Six1-/-Six4-/-Six2-/-* 胚では、上顎切歯形成領域を含む上顎領域が広く欠損していた。以上の結果から、上顎領域の形成において *Six1/Six4/Six2* は機能重複性を示し、特に *Six2* 遺伝子が *Six1/Six4* の機能を代償することを明らかにした。

2) 下顎切歯形成を司る *SIX1/SIX4* 下流因子の同定

Six1/Six4 の下流遺伝子群を網羅的に同定するために、胎齢 11.25 日の野生型胚と *Six1/Six4* 二重欠損ホモ胚下顎前方領域の組織を用いて RNA シークエンスを行った(長崎大学との共同研究)。*Six1/Six4* 二重欠損マウス胚下顎前方領域で有意に発現量が変動する遺伝子をいくつか同定し、*in situ* ハイブリダイゼーション法により顕著に発現が低下する遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、1) 切歯形成領域の間葉細胞に発現するもの、2) 舌筋前駆細胞に発現するもの、の 2 グループに主に分けられた。前者グループとして *Alx1*、*Masp1*、後者グループとして *Nkx2.5*、*Lbx1*、*Ckmt1* を同定した。*Alx1* 欠損マウスの表現型は既に報告されており、重篤な頭蓋顔面形成異常を生じる。このことから、顔面および切歯形成における役割が未解明の *Masp1* に着目した。

Masp1 遺伝子からは 3 つのアイソフォームが合成され、C 末端にセリンプロテアーゼドメインを有する MASP1 と MASP3 は自然免疫補体系を活性化する因子であることが知られていた。さらにヒト MASP3 のセリンプロテアーゼドメインにおける変異は、顔面頭蓋形成に異常が見られる 3MC 症候群の原因として知られていた。マウスにおいて *Masp1* および *Masp3* の発現を野生型胚で調べたところ、*Masp1* アイソフォームの発現は頭部顔面形成領域において検出されなかった。*Masp3* アイソフォームは、脳原基の神経上皮細胞や下顎切歯間葉領域に発現が検出された。*Six1/Six4* 二重欠損ホモ胚においては、*Masp3* の発現が消失したことから、*Six1/Six4* は *Masp3* アイソフォームの発現制御に関わることが明らかとなった。そこで、MASP3 のみを欠損する MASP3 特異的欠損マウスの頭蓋顔面形成を調べた(福島県立医科大学との共同研究)。*Masp3* 欠損ホモマウスを用いて骨軟骨染色を行い、少なくとも胎齢 18.5 日では *Masp3* 欠損ヘテロマウスに比べ、頭蓋顔面骨の低形成を示し、下顎先端の骨軟骨形成パターンが変化していた。しかしながら、下顎切歯はほぼ形成されていた。以上の結果から、*Six1/Six4* は下顎原基において *Masp1* 遺伝子がコードする *Masp3* アイソフォームの発現制御に関与すること、*Masp3* アイソフォームは間葉因子として下顎切歯形成には直接関与しないことが明らかとなった。

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 0件）

1. 著者名 Masanori Takahashi , Ryoji Fukabori , Hiroshi Kawasaki, Kazuto Kobayashi, Kiyoshi Kawakami	4. 巻 529
2. 論文標題 The distribution of Cdh20 mRNA demarcates somatotopic subregions and subpopulations of spiny projection neurons in the rat dorsolateral striatum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 3655-3675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi, M., Ikeda, K., Ohmuraya, M., Nakagawa, Y., Sakuma, T., Yamamoto, T., and Kawakami, K.	4. 巻 249
2. 論文標題 Six1 is required for signaling center formation and labial-lingual asymmetry in developing lower incisors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev. Dyn.	6. 最初と最後の頁 1098-1116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takahashi, M., Machida, T., Yonezawa, T., Takemoto, T., Isagawa, T., Takeda, N., Sekine, H., Noda, Y.
2. 発表標題 Roles of Six family transcription factors and an innate immune factor MASP3 in craniofacial development.
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takahashi, M., Ikeda, K., Takemoto, T., Hayashi, S., Ohmuraya, M., Nakagawa, Y., Sakuma, T., Yamamoto, T., Kawakami, K.
2. 発表標題 Six1 is required for labial-lingual asymmetric patterning of lower incisors in mice.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋将文
2. 発表標題 疾患マウスモデルを用いた腹壁閉鎖不全の分子細胞機序の解析
3. 学会等名 自治医科大学シンポジウム
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------