

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06286・19K21375

研究課題名(和文) 歯胚形態形成に関わる新規転写因子AmeloDの機能解析

研究課題名(英文) The role of novel basic-helix-loop-helix transcription factor AmeloD during tooth development

研究代表者

千葉 雄太 (Chiba, Yuta)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：10821986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：MyoD, NeuroDといった組織特異的なbasic-Helix-Loop-Helix(bHLH)遺伝子は器官発生に重要な役割を有するが、歯胚に特異的なbHLH遺伝子は報告されていない。

我々は歯胚遺伝子発現ライブラリより新規のbHLH遺伝子を同定し、AmeloDと命名した。我々はAmeloD欠損マウスおよび歯原性上皮細胞を用いた解析を行った結果、AmeloDがエナメル芽細胞前駆細胞である内エナメル上皮に発現し、細胞間結合分子Eカドヘリンの転写抑制を行うことで、細胞遊走能を促進し、歯胚の形態を制御することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでAmeloD遺伝子の遺伝子座にはAscl5という偽遺伝子が存在していたが、本研究を通して遺伝子の全長を同定し、新規の遺伝子としてGene bankに登録した。今回新規の機能を有する遺伝子が発見されることで、歯の発生と共通の発生開始段階を有する外胚葉性器官との差異が明らかとなり、例えば肺、腎臓、唾液腺などでも同様の新規遺伝子が発見される手がかりとなる。

また、歯の再生医療を構想する上では、人工培養歯胚の形態制御因子としてAmeloDを応用することで、効率的かつ機能的な歯胚培養技術の開発へとつながる可能性を秘めた、生命科学に重要な発見であると言える。

研究成果の概要(英文)：Organ-specific basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) factors, such as MyoD and NeuroD, have essential roles in organ development processes. However, tooth-specific bHLH factor has not been reported yet.

The aim of this study is identification of the tooth-specific bHLH factor. We screened the bHLH family expressed in tooth germ cDNA library and identified the novel bHLH factor, AmeloD. In vivo and in vitro analyses using AmeloD knockout mouse revealed that AmeloD plays essential role in tooth morphogenesis. AmeloD was expressed in inner dental epithelium, the ameloblast progenitor cell. AmeloD promoted migration of inner enamel epithelium via suppression of transcriptional activity of E-cadherin, a cell adhesion molecule. Thus, AmeloD is a novel bHLH factor essential for tooth development processes.

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯の発生 エナメル芽細胞 AmeloD 内エナメル上皮 細胞遊走 Eカドヘリン ノックアウトマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の再生研究においては、これまでに動物モデルでの人工歯胚の作成が可能となってきたが、再生された歯胚は天然の歯に比べ大きさが小さく、またかたちの制御が困難である。そのためヒトへの臨床応用に向けて、効率的に十分な大きさの歯を作成し、また咬合を構築する機能的な形態を制御することが必須である。

我々は今までに歯の再生技術の開発を目指し、iPS細胞からエナメル質を形成するエナメル芽細胞の分化誘導法を確立し(Arakaki M et al. J Biol Chem. 2012)、さらに iPS 細胞から分化誘導した細胞を組み合わせることで人工的に歯胚を構成することに成功した(Kim EJ et al. Dev Dyn. 2019)。

その一方で我々は、歯の発生メカニズムを解明し、その分子機序を歯の再生技術へと応用するために、歯胚遺伝子発現ライブラリより新規の遺伝子同定と機能解析を進めてきた。その中で、Epiprofin(Epfn/Sp6)はエナメル芽細胞の分化に必須の分子であり、Epfn を強制発現させることでエナメル芽細胞が人工的に作成できることを発見した(Nakamura T et al. J Bone Miner Res. 2017)。エナメル質の再生を構想する上では、いかにして十分な量のエナメル芽細胞を調整するかが重要なポイントとなるが、これまでの研究から、細胞の分化誘導法の基盤は構築されつつある一方で、臓器形態を制御する技術の開発は進んでいない。これからの歯の再生技術の発展のためには、新たな分子機序を解明していく必要がある。

このような背景の中で、我々は bHLH 転写因子群に着目した。bHLH ファミリーには、筋発生のマスター遺伝子である MyoD、神経発生の NeuroD マスター遺伝子であるなどを始め、様々な器官形成に重要な因子として組織特異的な bHLH 因子が数多く報告されている。一方、歯に特異的な因子の報告は少なく、歯に特異的な未報告の bHLH 因子が歯胚発生における新規機序を内包しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

この仮説を元に、歯胚遺伝子発現ライブラリをスクリーニングし、新規 bHLH 因子を同定することを当初の目的として研究を進めた。その結果、未だに発現組織および機能の報告がない bHLH 因子を発見し、その遺伝子全長をクローニングすることで新規遺伝子 AmeloD の同定に成功した(He B et al. J Dent Res. 2019)。AmeloD の発現組織を検討した結果、歯に特異的な発現を認めたため、歯の発生における新規の分子機序解明につながると考えた。

本研究では、AmeloD の歯の発生における機能解析を目的とする。我々は AmeloD の欠損マウスを作成しその表現型を検討したところ、臼歯の歯冠長及び歯根長が短く、歯の大きさの制御に重要な因子であることが分かった。しかしながら、AmeloD がどのように歯の大きさやかたちを制御するのか、その分子機序は不明である。そこで、AmeloD による歯の形態形成制御メカニズムを解明することで、歯の再生研究における人工歯胚の効率的な成長促進技術の開発及び、機能的な歯冠・歯根形態制御法の開発に向けての新たな知見を得る。

3. 研究の方法

(1) AmeloD 欠損マウスの歯胚発生における表現型解析

Zinc Finger Nuclease 法を用いて AmeloD 欠損マウスを作成した。発生過程の歯胚における表現型は歯胚切片を用いて組織学的に歯胚形態、細胞形態について検討した。形成された歯の表現型は生後 6 週齢マウスを使用し、肉眼的解析、軟エックス線解析、マイクロ CT、走査型電子顕微鏡を用いて、歯の形態ならびに構造について解析を行った。

(2) 歯原性上皮細胞における AmeloD の分子機能解析

AmeloD の分子機能解析については、AmeloD 欠損マウス歯胚切片を用いて、細胞増殖能ならびに標的分子の発現変化に与える影響を EdU 染色ならびに免疫染色にて検討した。加えて、歯の成長速度を incisor clipping assay にて測定した。さらに、マウス歯原性上皮細胞株 CLDE に AmeloD を過剰発現させ、細胞増殖能に与える影響を MTT アッセイ並びに EdU 染色、細胞遊走能に与える影響を wound healing assay、細胞凝集能に与える影響を hanging drop 法にて検討した。

(3) 過剰歯形成における AmeloD の役割解明

我々の研究グループで同定した Epiprofin(Epfn/Sp6)は歯数の制御に関わる重要な因子であり、Epfn 欠損マウスでは、50本を超える過剰歯を形成するため、過剰歯形成モデルマウスとして有用である。予備実験において、Epfn 欠損マウス歯胚の歯原性上皮細胞において、AmeloD の発現が異常に亢進していることを発見した。

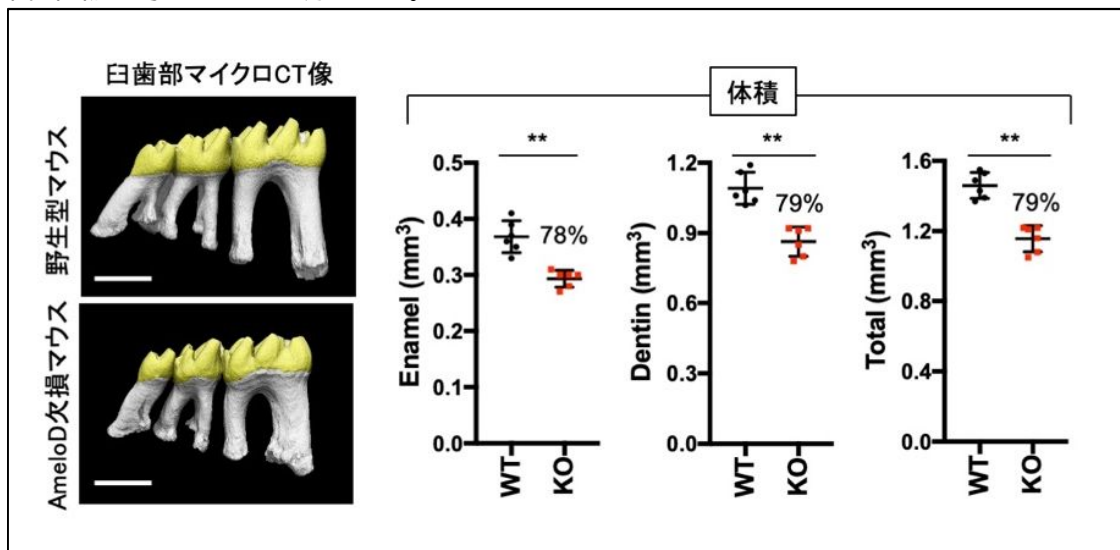
そこで、過剰歯の形成における AmeloD 役割を解明するため、Epfn と AmeloD の二重欠損マウスを作成した。歯の表現型解析は AmeloD 欠損マウスの解析と同様に行った。分子機序解析に関しては免疫染色により標的遺伝子の発現変化を検討した。

(4) 遺伝子導入による効率的かつ機能的な歯胚培養技術の開発

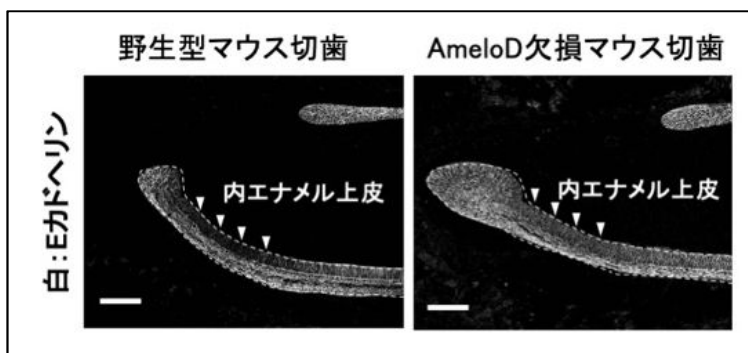
再生器官の形態制御法の開発に関して、AmeloD の遺伝子導入による歯胚形態の変化を検討した。胎生 13.5 日齢マウス切歯および臼歯歯胚を AmeloD siRNA とともに 7 日間培養し、培養歯胚の大きさに与える影響を実体顕微鏡下にて評価した。

4. 研究成果

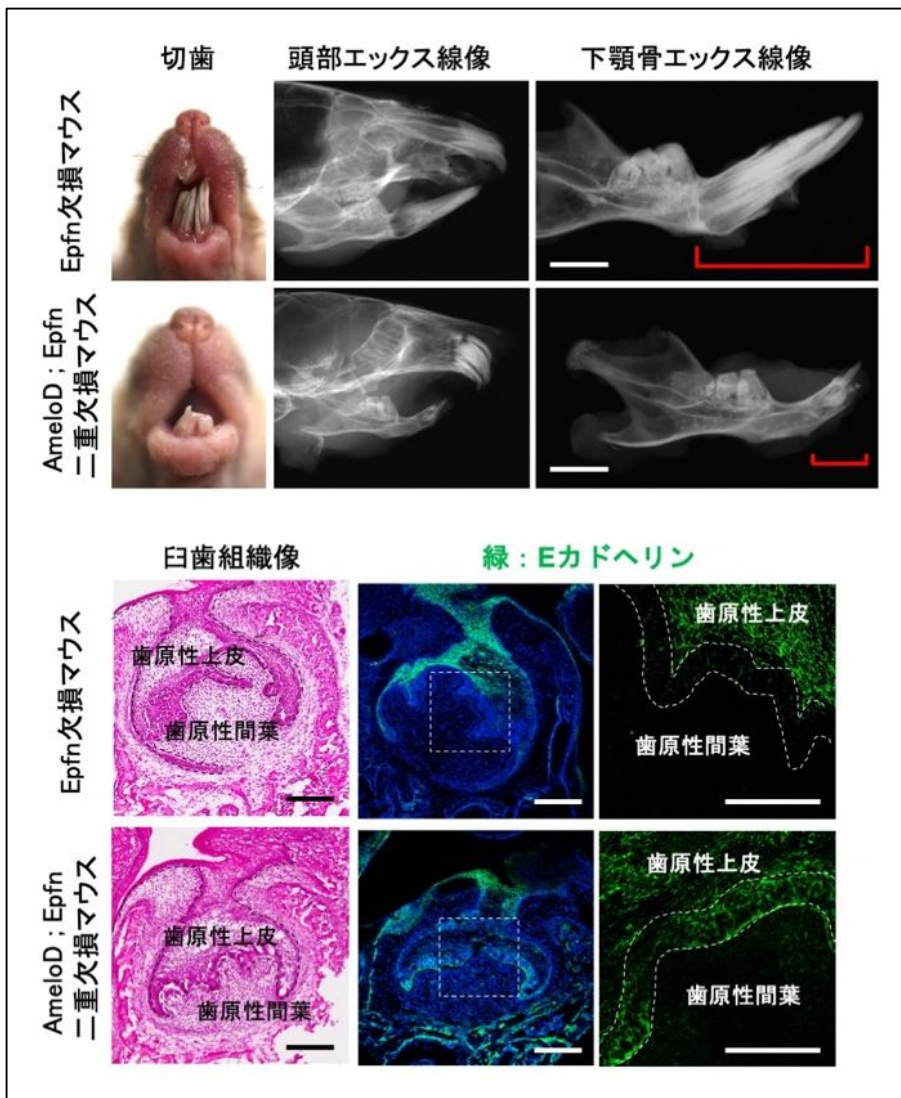
歯胚の発生は歯原性上皮が間葉組織へと陥入することにより開始され、その過程で歯原性上皮幹細胞が、エナメル芽細胞前駆細胞である内エナメル上皮細胞を含む複数の上皮細胞へと分化する。まず始めに歯胚発生過程における AmeloD の発現を、マウス臼歯の免疫染色法にて検討したところ、内エナメル上皮に特異的に発現し、エナメル芽細胞へと分化が進むとその発現が消失することが確認できた。次に、AmeloD 欠損マウスを作成し、歯の表現型解析を行った結果、歯冠・歯根長が野生型マウスと比較し有意に小さく、エナメル質及び象牙質体積が 2 割程度減少することが明らかとなった（図 1）。次いで発生過程のどの段階に成長障害が見られるのかを検討するため、歯胚切片による組織学的解析を行ったところ、AmeloD 欠損マウスでは鐘状期以降の臼歯歯胚が小さいことが分かった。



次に、AmeloD の分子機能を同定するため、AmeloD の特徴的な発現パターンに着目した。AmeloD が限局的に発現を示す内エナメル上皮は、活発な細胞増殖能と細胞遊走能を示し、歯胚の形態形成に参与する。そこで、AmeloD 欠損マウス歯胚における細胞増殖能を EdU 染色で検討したところ、野生型マウスと有意な変化は認められなかった。次に、細胞遊走能に与える影響を検討した。歯原性上皮には胞間結合分子 E カドヘリンが発現しているが、内エナメル上皮では E カドヘリンの発現が一時的に減少しており、それ故に細胞遊走が活発に行われていることが示唆されている (Li et al. Dev. Biol. 2012)。我々はこの E カドヘリン分子の発現パターンが、AmeloD の発現パターンと対照的であることに着目し、AmeloD が E カドヘリンの抑制因子なのではないかと考えた。切歯歯胚切片を用いた免疫染色の結果、AmeloD 欠損マウスにおいては内エナメル上皮における E カドヘリンの発現減少が認められないことがわかった（図 2）。このことから、歯原性上皮細胞株 CLDE 細胞を使用し、AmeloD の分子機能を解析した結果、AmeloD 過剰発現細胞ならびに抗 E カドヘリン中和抗体添加細胞は高い遊走能を示すことが分かった。以上の結果より、AmeloD は内エナメル上皮において、E カドヘリンの発現調整を介して細胞遊走能を促進する、歯胚の形態形成に重要な因子であることがわかった。



Epfn 欠損マウスにおいては、歯原性上皮の不規則な陥入により、過剰歯の形成が引き起こされる(Nakamura et al. J Biol. Chem. 2007)。前述の結果より、AmeloD が歯原性上皮の陥入と歯の形態形成に重要な役割を有していることが明らかとなったため、Epfn 欠損マウスの過剰歯形成に AmeloD が関与しているかどうかを検討した。Epfn 欠損マウス歯原性上皮においては、上皮の陥入部分において E カドヘリンの発現は認めず、一方で同部分に AmeloD の発現を認めた。そこで、Epfn と AmeloD の二重欠損マウスを作成したところ、歯原性上皮の陥入部分において E カドヘリンの発現が上昇し、上皮の陥入が阻害されることで、Epfn 欠損マウスと比較して歯の大きさと本数が劇的に減少することが分かった(図3)。この結果より、AmeloD が歯の大きさだけでなく、歯の本数の制御に関与していることが示唆された。



これらの知見は歯の発生に関わる新規の分子機序として歯の発生機構解明に貢献するのみならず、AmeloD が内エナメル上皮特異的のマーカ-遺伝子として確立されることで、今後の内エナメル上皮細胞の解析を進展させる重要な発見である。また、歯の再生医療への応用という観点からは、AmeloD が歯胚形態制御因子として有用である可能性が示された。今後、Epfn と AmeloD の同時制御による人工歯胚のかたち、大きさ、本数の制御方法開発を構想している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 He B., Chiba Y., Li H., de Vega S., Tanaka K., Yoshizaki K., Ishijima M., Yuasa K., Ishikawa M., Rhodes C., Sakai K., Zhang P., Fukumoto S., Zhou X., Yamada Y.	4. 巻 98(2)
2. 論文標題 Identification of the Novel Tooth-Specific Transcription Factor AmeloD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 234 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034518808254	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 該当する
1. 著者名 Chiba Yuta, He Bing, Yoshizaki Keigo, Rhodes Craig, Ishijima Muneaki, Bleck Christopher K. E., Stempinski Erin, Chu Emily Y., Nakamura Takashi, Iwamoto Tsutomu, de Vega Susana, Saito Kan, Fukumoto Satoshi, Yamada Yoshihiko	4. 巻 294(10)
2. 論文標題 The transcription factor AmeloD stimulates epithelial cell motility essential for tooth morphology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3406 ~ 3418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005298	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 該当する
1. 著者名 Zhang Peipei, Ishikawa Masaki, Rhodes Craig, Doyle Andrew, Ikeuchi Tomoko, Nakamura Kuniyuki, Chiba Yuta, He Bing, Yamada Yoshihiko	4. 巻 139(4)
2. 論文標題 Pannexin-3 Deficiency Delays Skin Wound Healing in Mice due to Defects in Channel Functionality	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 909-918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.08.033	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 該当する
1. 著者名 Han X, Yoshizaki K, Miyazaki K, Arai C, Funada K, Yuta T, Tian T, Chiba Y, Saito K, Iwamoto T, Yamada A, Takahashi I, Fukumoto S	4. 巻 293(38)
2. 論文標題 The transcription factor NKX2-3 mediates p21 expression and ectodysplasin-A signaling in the enamel knot for cusp formation in tooth development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of biological chemistry	6. 最初と最後の頁 38-14572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.003373	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 Hirayama Koji, Hanada Takashi, Hino Ryoko, Saito Kan, Kobayashi Mayu, Arakaki Makiko, Chiba Yuta, Nakamura Norihiko, Sakurai Takeshi, Iwamoto Tsutomu, Fukumoto Satoshi, Yamada Aya	4. 巻 28(2)
2. 論文標題 Material properties on enamel and fissure of surface pre-reacted glass-ionomer filler-containing dental sealant	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 87 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pdj.2018.05.001	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 Nakamura Kuniyuki, Ikeuchi Tomoko, Nara Kazuki, Rhodes Craig S., Zhang Peipei, Chiba Yuta, Kazuno Saiko, Miura Yoshiki, Ago Tetsuro, Arikawa-Hirasawa Eri, Mukouyama Yoh-suke, Yamada Yoshihiko	4. 巻 218
2. 論文標題 Perlecan regulates pericyte dynamics in the maintenance and repair of the blood-brain barrier	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3506 ~ 3525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1083/jcb.201807178	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 該当する

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 千葉 雄太, 吉崎 恵悟, 齋藤 幹, 中村 卓史, 岩本 勉, 福本 敏, He Bing, de Vega Susana, 石島 旨章, 山田 吉彦
2. 発表標題 新規basic-helix-loop-helix転写因子AmeloDは歯原性上皮細胞の遊走能を制御し歯胚形態形成に関与する
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉 雄太, 齋藤 幹, 岩本 勉, 中村 卓史, 福本 敏
2. 発表標題 歯冠・歯根長を制御する新規歯胚形態制御因子の同定と機能解明
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Chiba, Saito Kan, Yoshizaki Keigo, Tsutomu Iwamoto, Yoshihiko Yamada and Satoshi Fukumoto :
2. 発表標題 The G protein-coupled receptor Gpr115 regulates pH balance that is essential for tooth mineralization
3. 学会等名 11th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, Beijing, Sep. 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉 雄太、山田 吉彦、福本 敏
2. 発表標題 新規bHLH転写因子AmeloDの同定と歯の発生過程における役割
3. 学会等名 第4回口腔医科学フロンティア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Chiba, Kan Saito, Takashi Nakamura, Yoshihiko Yamada and Satoshi Fukumoto
2. 発表標題 Identification of the tooth-specific novel transcription factor AmeloD and its role during tooth development
3. 学会等名 The Kick-off Symposium of Advanced Graduate Program for Future Medicine and Health Care (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Chiba, Keigo Yoshizaki, Tomoko Ikeuchi, Kan Saito, Craig Rhodes, Tsutomu Iwamoto, Takashi Nakamura, Yoshihiko Yamada, Satoshi Fukumoto
2. 発表標題 The G-protein coupled receptor Gpr115 is essential for enamel mineralization via regulation of pH homeostasis
3. 学会等名 NIH-Japan-JSPS symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 AL THAMIN Shahad, 千葉雄太, 吉崎恵悟, JIA LingLing, 山田亜矢, 齋藤幹, 福本敏
2. 発表標題 内エナメル上皮の新規マーカーAmeloidの転写制御機構解明
3. 学会等名 第57回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉雄太, 齋藤幹, 吉崎恵悟, 福本敏, 福本敏
2. 発表標題 Gタンパク質共役型受容体Gpr115はエナメル芽細胞における炭酸脱水素酵素の発現を制御しエナメル質形成に関与する
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福本 敏、吉崎恵悟、千葉雄太、新垣真紀子、山田亜矢、齋藤 幹	4. 発行年 2018年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 50
3. 書名 月刊「細胞」 2018年 細胞 9月号	

〔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
研究協力者	福本 敏 (Fukumoto Satoshi) (30264253)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	山田 吉彦 (Yamada Yoshihiko)	米国国立衛生研究所・国立歯科頭蓋顔面研究所・主任研究員	