

平成 22 年 4 月 2 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791583

研究課題名（和文） 新奇細胞間蛋白質による象牙芽細胞の分化機構の解明とその制御

研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanisms of odontoblast differentiation by novel gap junction protein

研究代表者

岩本 勉 (TSUTOMU IWAMOTO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90346916

研究成果の概要（和文）：歯の発生メカニズムを明らかにする目的で歯の遺伝子ライブラリーの作成を行い歯の発生に関わる遺伝子の包括的解析を試みている。われわれはこれまでに報告のない新奇の細胞外マトリックス遺伝子 TM14/Filulin 7 を同定し、象牙芽細胞の接着に重要であることを明らかにした。また、硬組織特異的な新奇細胞間蛋白質を同定し、歯、軟骨、骨の発生に重要であることを見出し、現在、その解析を行っている。

研究成果の概要（英文）： To find genes, important for tooth development, we had generated tooth cDNA library, and have been trying to find novel and functional genes. So far, we have identified a novel matrix protein gene, named TM14/Fibluin 7. We found that TM14/Fibluin 7 has an important role for odontoblast attachment. And also, we have identified a hard tissue specific novel gap junction gene, and have been analyzing its function in tooth, cartilage and bone development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯胚発生、象牙芽細胞、マトリックス蛋白、細胞間蛋白

1. 研究開始当初の背景

近年、生体組織工学の分野が目覚ましく発展し、再生医療に対する期待が高まってきている。歯科においても、歯を対象とした再生医学の様々な試みがなされており、脱落直前の乳歯歯髄組織から、あるいは胎児期の歯胚

形成される途中の間葉細胞から多分化能をもった幹細胞を精製し、歯様の構造物を作ることが可能となってきた。しかしながら、歯再生への課題は多く、いまだにその発生のメカニズムに不明な点も多いことと、機能的な再生が難しいというのが現状である。その為には各種因子の機能調節メカニズムや細胞

間のネットワーク、情報伝達カスケードにおける相互の位置づけの解明が重要な課題となってきた。

そこで、われわれの研究グループは、歯形成メカニズムを明らかにする目的で、歯の遺伝子ライブラリーの作成を行った (Nakamura T. et al, *The Journal of Biological Chemistry* 2004)。遺伝子ライブラリーには、多くの未知の新奇遺伝子を含む約 4,000 種類の遺伝子情報があり、研究代表者は、NCBI などのデータベースを用いたバイオインフォマティカル解析法を用いて、歯の発生に重要な機能を持っているだろうと推測される約 100 個の遺伝子を選定した。続いてそれらの発現を確認するために RT-PCR 法を用いて、他の組織と比較し、歯に発現の高い遺伝子のスクリーニングを行った。その中で 3 つの新規遺伝子 (これらに暫間的に TM14、TI-3、TI-4 と名付けた) について着目した。

2. 研究の目的

これまでに、TM14 (de Vega S., Iwamoto T., et al. *The Journal of Biological Chemistry* 2007)、TI-3、TI-4 の 3 種類の新奇遺伝子を歯の遺伝子ライブラリーより同定した。それらの組織間における発現パターンがユニークであることを RT-PCR 法および Northern blotting 法にてスクリーニングを行い解析の候補遺伝子としてきた。

TI-3 は、その遺伝子構造から新奇の細胞間蛋白質であることが予測されており、その発現および機能については全くの未知であった。in situ hybridization 法にてその発現が、歯および軟骨の細胞の分化のステージにおいて、発現が一過性であり、分化の開始と同時に発現がみられ、分化が進むとその発現が消失すると言った非常にユニークな遺伝子であることがわかった。このことはこの遺伝子が硬組織の形成において非常に重要な役割をもっていることが示唆された。その為、本研究期間においては、特に TI-3 について詳細に検討した。

3. 研究の方法

(1) 歯胚形成期および骨成長期における発現パターンの解析

マウス各ステージにおける歯胚および骨より mRNA を調整し、それぞれの組織が成長する過程での TI-3 遺伝子の発現を RT-PCR 法および in situ hybridization 法を用いて解析した。

(2) TI-3 特異抗体の作成

TI-3 特異的な配列のペプチドを作成し、ウサギを用いてポリクロナール抗体の作成を行った。これによって得る事ができた抗体を用いて、蛋白としての発現局在を組織や細胞において調べる為に免疫組織染色法を用いて解析した。

(3) 細胞株を用いた分化誘導過程における発現解析

それぞれの歯、軟骨、骨の分化モデルである象牙芽細胞 (mDP6)、軟骨様細胞 (ATDC5)、骨芽細胞様細胞 (C2C12) の各細胞株を用いて、分化誘導実験において、各分化段階における TI-3 の発現を RT-PCR 法を用いて解析を行った。

(4) 発現ベクターの構築

機能解析を行うために、pEF1/V5-His ベクターに TI-3 の翻訳領域をサブクローニングし発現ベクターの作成を行った。

(5) 過剰発現細胞株の作成

各細胞に遺伝子導入を行い選択培地にて過剰発現安定細胞株の作成を行った。

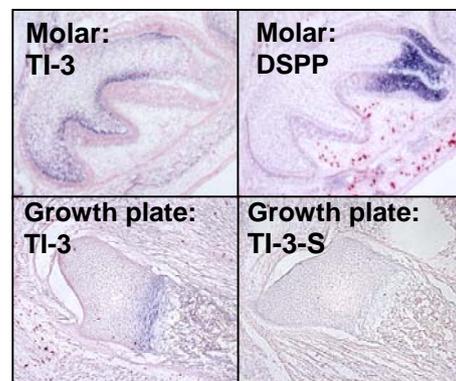
(6) 分化に与える影響の観察

過剰発現した細胞株を用いて、分化誘導をかけた場合その分化に及ぼす影響について、それぞれの分化マーカーを用いてその発現の変化を経時的に観察した。

siRNA 法-RNAi を設計し、RNAi 法を用いて、その遺伝子の内因性発現を抑制した場合に、分化に与える影響について検討を行った。

4. 研究成果

歯胚発生過程および骨形成過程において、TI-3 遺伝子は RT-PCR 法にて、その mRNA の発現誘導が発生の各段階において特異的な発現が確認された。さらに、その mRNA の発現細胞を明らかにするために、in situ



hybridization 法を行ったところ、歯では前

象牙芽細胞、成長板では前肥大軟骨細胞に特異的にその発現を認めることがわかった (図、Molar: 臼歯、DSPP: 象牙芽細胞特異的基質蛋白、Growth plate: 成長板、S: センスプローブ)。

次に、TI-3 蛋白の局在とその機能を明らかにする目的で、TI-3 特異的抗体の作成に取りかかった。まず TI-3 特異的な配列のペプチドを選択、合成し、ウサギを用いてポリクロナール抗体の作成を行った。この特異抗体を用いて免疫組織学的検討を行ったところ、その蛋白は歯では前象牙芽細胞、並びに軟骨では前肥大軟骨細胞層に一致して強い発現を認めた。また、細胞内の局在としては、歯では隣接する細胞と細胞の間にその発現がみられ、また、細胞と基底膜が接する側にもその発現を認めた。一方、軟骨では、周囲がマトリックスに取り囲まれており、そのマトリックスに向かって、細胞全周にその発現を認めた。これらの発現から、TI-3 は、歯および軟骨の両者において、これらの前駆細胞が増殖し、それらが最終分化する際に発現し、分化過程において、重要な機能があることが示唆された。また、TI-3 は細胞膜蛋白質として、細胞と細胞、さらには細胞とそれらを取り巻く外環境と何らかのシグナル伝達を行っている可能性が示唆された。

次に、TI-3 の機能解析の為に、歯、軟骨、骨の分化モデルとして用いた各細胞株 (mDP6、ATDC5、C2C12) を用いた。それぞれの細胞株は、BMP や insulin を用いることによって、それぞれ分化誘導することができ、一連の分化段階を模倣できる。そこで、これらの細胞株を用いて、分化段階での遺伝子発現を検討したところ、それぞれの分化が最終段階へと向かう直前で強く発現することが観察され、これらの結果は in vivo における発現パターンと非常に類似していた。これらの結果は、TI-3 は歯、軟骨、骨の分化に関わっている可能性を強く示唆した。

そこで、さらなる詳細な解析を行うために、歯および軟骨の細胞株である mDP6 並びに ATDC5 細胞を用いて過剰発現細胞株の作成を行った。この過剰発現細胞株において、コントロール細胞とその分化に及ぼす影響を比較検討したところ、それぞれの細胞株でその分化が促進されることがわかった。また、その一方で、siRNA を用いて、その遺伝子の内因性発現を抑制したところ、逆にそれぞれの分化が抑制されることが示された。これらの結果から、TI-3 は歯及び軟骨の分化において重要な因子であることが強く示唆された。

TI-3 はその遺伝子構造から、新奇の細胞-細胞間蛋白質であることが予測されている。これまでに硬組織特異的な細胞間蛋白質の報告は無く、この遺伝子の発見および解析は歯の発生にとどまらず硬組織形成メカニズ

ムを明らかにするうえで多大な貢献ができるものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Sonoda A*, Iwamoto T*, Nakamura T, Fukumoto E, Yoshizaki K, Yamada A, Arakaki M, Harada H, Nonaka K, Nakamura S, Yamada Y and Fukumoto S., The critical role of heparin binding domains of ameloblastin for dental epithelium cell adhesion and ameloblastoma proliferation., *J Biol Chem*, 2009 Oct 2;284(40):27176-84. (* Both authors contributed equally to this work.) 査読有

② Iwamoto T, Yamada A, Yuasa K, Fukumoto E, Nakamura T, Fujiwara T, Fukumoto S., Influences of Interferon-gamma on Cell Proliferation and Interleukin-6 Production in Down Syndrome derived Fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 2009, 54(10):963-9. 査読有

③ Iwamoto T, Yoshizaki K, Sonoda A, Nakamura Y, Matsuishi Y, Yamaguchi N and Nonaka K, Prevalence of Natal/Neonatal Teeth in Cleft Lip and Palate Infants, *Ped Dent J*, 2009, 19(1): 46-51. 査読有

④ Iwamoto T, Yoshizaki K, Nakamura Y, Sonoda A, Nakamoto Y, Okuma Y, Tamiya R and Nonaka K, Dens evaginatus and dens invaginatus in a mandibular central incisor, *Ped Dent J*, 2009, 19(1): 145-149. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① Ono M, Iwamoto T, Yoshizaki K, Fukumoto S, Mechanisms of ameloblast differentiation by Neurotrophic Factors, 第 32 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009. 12. 12

② 新垣真紀子、岩本 勉、山田亜矢、鈴木宏治、中村卓史、福本 敏、下顎第二乳臼歯の埋伏症例における不正咬合について、第 27 回日本小児歯科学会北日本地方会大会および総会、石巻専修大学、2009. 10. 24

③ 岩本 勉、中村卓史、吉崎恵悟、山田亜矢、山田吉彦、福本 敏、象牙芽細胞の分化に関わる新奇ギャップ結合分子の同定、第 51 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター、2009. 9. 10

④岩本 勉, 中村卓史, 山田亜矢, 山田吉彦, 福本 敏、新奇細胞間蛋白Pannexin 3 による象牙芽細胞の増殖と分化の制御、第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、仙台国際センター、2009. 6. 16

⑤Nan W, Yamamoto S, Iwamoto T, Yoshizaki K, Sonoda A, Yamada A, Nonaka K, Fukumoto S, Platelet-derived growth factors play an important role in early tooth germ development, 第47回日本小児歯科学会大会、大阪大学コンベンションセンター、2009. 5. 15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 勉 (TSUTOMU IWAMOTO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20791583

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：