

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09884

研究課題名（和文）歯の形態形成における亜鉛トランスポーターの役割とメカニズムの解明

研究課題名（英文）The role of the zinc transporter in tooth development

研究代表者

衣斐 美歩 (Ibi, Miho)

岩手医科大学・歯学部・特任講師

研究者番号：30609665

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）：エナメル上皮細胞には様々なトランスポーターやイオンチャネルが存在することが明らかとなっている。近年、亜鉛トランスポーターに着目した研究が進められておりこれまでに糖尿病や骨代謝異常、創傷治癒など多岐にわたっているが、歯の発生過程については報告がない。そこで本研究では亜鉛シグナルに焦点を当て歯の発生および形態形成制御機構における亜鉛トランスポーターを介した新規経路の解明を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然歯の再生は歯の構成成分の複雑さゆえ日常的な臨床応用には至っていない。今回歯の発生および形成過程において亜鉛トランスポーターを介した亜鉛シグナルとの関係が明らかとなれば歯の再生方法の新規戦略創出の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Various transporters and ion channels localized in enamel epithelial cells are involved in tooth formation. Recently, zinc transporters have been the focus of research in various fields, including diabetes, bone metabolic disorders, and wound healing, however, there have been no reports on their role in tooth development. Therefore, in this study, we focused on zinc signaling via zinc transporters and aimed to elucidate a novel pathway mediated by zinc transporters in the tooth development.

研究分野：生化学 細胞生物学

キーワード：歯の発生 亜鉛トランスポーター

様式 C - 19F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの場合齲蝕や歯周炎等により永久歯を失うと著しい口腔機能不全が生じる。その解決策のひとつとして歯の再生医療が試みられているが日常的な臨床応用には至っていない。

歯の発生および形成過程においてはエナメル上皮による電解質の制御が関わっておりエナメル上皮細胞にはさまざまなイオンチャネルやトランスポーターが発現していることが報告されている。しかしそのほとんどの役割や分子メカニズムが明らかにされていない。

歯と亜鉛の関係についてはこれまでにいくつかの報告があるが詳細は不明である。今回我々の研究グループは亜鉛トランスポーターに着目し、歯の発生および形成過程において亜鉛トランスポーターを介した亜鉛シグナルが重要な役割を担っているのではないかと仮説を立てた。

<参考文献>

Kim et al. The overview of channels, transporters, and calcium signaling molecules during amelogenesis. Arch Oral Biol, 93:47-55, 2018.

2. 研究の目的

本研究は、歯の発生および形成制御機構における新規経路の解明を目指して以下の2点を目的とする。

- 1) 歯の形成過程での亜鉛トランスポーターの直接的関与および歯の形成に関与する細胞における亜鉛シグナル応答分子を明らかにする。
- 2) 亜鉛シグナル応答分子の歯胚の発生および歯冠/歯根形成における役割を検証する。

3. 研究の方法

(1)亜鉛トランスポーター遺伝子改変マウスを用いた歯の形成過程での亜鉛トランスポーター発現細胞の出現時期と局在の探索

Zip10 ノックインマウスを用いて、歯の形成過程における亜鉛トランスポーター陽性細胞出現時期および組織での局在について明らかにする。

主に下顎第一および第二大臼歯について歯胚の形態学的特徴(蕾状期、帽状期、鐘状期)を参考に歯根完成期まで経時的に追跡しサンプルを採取し組織学的解析を行う。

(2)亜鉛トランスポーター遺伝子欠損による歯の形成過程への影響の実証

(1)で明らかとした亜鉛トランスポーター発現細胞が観察される時期で、亜鉛トランスポーターコンディショナルノックアウトマウス(Zip10^{flox}マウス)にて時期特異的に亜鉛トランスポーターをノックアウトした場合歯胚の発生および歯冠・歯根形成に何らかの障害が生じるかどうか検討する。また、in vitro による検討として器官原器再構成法により Zip10^{flox}マウスの歯胚から採取した細胞を用いて器官培養を行い生体外で人工歯胚を作製する。さらに作製した人工歯胚を成体マウスの抜歯窩に移植し生体内で歯の再生が起こるか検討する。

(3)歯の形成過程における亜鉛トランスポーター発現細胞内での亜鉛シグナル応答分子の探索

亜鉛トランスポーター発現細胞が出現する時期の歯胚または歯牙を顎骨内から摘出する。摘出された組織から亜鉛トランスポーター陽性細胞と陰性細胞をフローサイトメトリーにて分離し(EGFPまたはtdTomato陽性を基準に分離可能)、それらをCAGE(Cap Analysis Gene Expression)

法による次世代シーケンスを用いた遺伝子発現解析とプロモーター解析により比較し、歯の形成過程における亜鉛シグナル応答分子の全体像を明らかにする。

(4)亜鉛トランスポーター遺伝子安定発現細胞株の作製と亜鉛シグナル応答因子の機能的探索

採取した歯胚から単離した細胞に亜鉛トランスポーターを過剰発現させるためレンチウィルスベクターを導入し亜鉛トランスポーター安定過剰発現細胞を作製する。作製した細胞を用いて(3)で列挙された亜鉛シグナル応答分子の阻害薬もしくはキレート剤(TPEN) siRNAを使用した際に引き起こされるシグナル伝達への影響を生化学的および分子生物学的手法にて解析する。

これらの検討結果により歯の形成過程における亜鉛トランスポーターの役割を検証する。

4. 研究成果

(1)亜鉛トランスポーター遺伝子改変マウスを用いた歯の形成過程での亜鉛トランスポーター発現細胞の出現時期と局在の観察

初めに歯の形成過程における亜鉛トランスポーター陽性細胞出現時期および組織での局在について、Zip10 発現細胞を特異的に蛍光標識できる Zip10 ノックインマウスを用いて観察を行った。マウスの歯の発生時期については以下の論文を参考とし、歯胚の形態学的特徴(帽状期、鐘状期)が見られるタイミングでサンプルを採取し HE 標本作製後組織学的解析を行った。観察歯種はマウス両側下顎第一および第二大臼歯とした。マウス胎生 15.5 日(帽状期から初期鐘状期)において歯胚を構成しているエナメル上皮および星状網に亜鉛トランスポーターのひとつである Zip10 の局在が認められた。以前我々の研究グループはマウスの歯の発生の鐘状期にあたる胎生 17.5 日にも同様の局在が見られることをすでに見出していることから²本研究より亜鉛トランスポーター Zip10 は歯胚の後期(鐘状期)のみならず少なくともより早い中期(帽状期)以降から局在していることが明らかとなった。

<参考文献>

Ikeda et al, Functional ectodermal organ regeneration as the next generation of organ replacement therapy. Open Biol., 9: 190010, 2019.

Bin et al. Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: Implication of the ZIP10-p63 axis in epithelial homeostasis. PNAS., 114; no.46, pp. 12243-12248, 2017.

(2)亜鉛トランスポーター遺伝子欠損による歯の形成過程への影響の実証

(1)で明らかとした亜鉛トランスポーター発現細胞が観察される時期で、亜鉛トランスポーターコンディショナルノックアウトマウス(Zip10^{fllox}マウス)にて時期特異的に亜鉛トランスポーターをノックアウトした場合歯胚の発生に何らかの障害が生じるかどうか検討した。本実験ではより詳細な表現型を観察するため鐘状期(胎生 18.5 日)の歯胚形態を組織学的に解析した。亜鉛トランスポーター(zip10)を欠損した歯胚でコントロール群と比較して歯胚構成細胞の性質に変化が見られるかどうか観察を行った。

続いて、in vitro による器官原器再構成法により Zip10^{fllox}マウスの歯胚から採取した細胞を用いて器官培養を行うこととした。亜鉛シグナル応答分子の探索に安定した成果を得るための歯胚摘出の手技取得に努めた。

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 1件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Saito M, Ishida N, Yamada H, Ibi M, and Hirose M. | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 8-HEPE-Concentrated Materials from Pacific Krill Improve Plasma Cholesterol Levels and Hepatic Steatosis in High Cholesterol Diet-Fed Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor-Deficient Mice. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biol Pharm Bull. | 6. 最初と最後の頁 919-924 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00162. | 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 Lee MG, Chae S, Nakajima K, Ibi M, Sano H, Hara T, Jo H, Takagishi T, Cha B, Baek JM, Yoshigai E, Ohashi T, Irie T, Sano S, Lee JS, Fukada T, and Bin BH. | 4. 巻 98 |
| 2. 論文標題 Implication of the zinc-epigenetic axis in epidermal homeostasis. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Dermatol Sci. | 6. 最初と最後の頁 203-206 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.04.010. | 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 |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 浅沼 莞奈、横田 聖司、間山 寿代、帖佐 直幸、桑島 幸紀、松本 識野、阿部 カレン、吉田 弘法、衣斐 美歩、加茂 政晴、入江 太郎、佐藤 和朗、石崎 明 |
| 2. 発表標題 酸化ストレスを介した顎関節周囲滑膜炎の発症メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 第48回公益社団法人 日本口腔外科学会北日本支部学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 野尻俊樹, 嶋村健斗, 衣斐美歩, 入江太郎, 近藤尚知 |
| 2. 発表標題 クロマチンリモデリング関連因子CHD3がマウス歯根形成に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第52回公益社団法人 日本口腔インプラント学会学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 衣斐美歩, 佐藤泰生, 羽金雅登, 田中準一, 安原理佳, 美島健二, 入江太郎 |
| 2. 発表標題 Generation of salivary gland tumor model in mice |
| 3. 学会等名 第110回 日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 後藤弓里子, 衣斐美歩, 佐藤泰生, 田中準一, 安原理佳, 青田桂子, 東雅之, 深田俊幸, 美島健二, 入江太郎 |
| 2. 発表標題 PLAG1 enhances stemness in acinar cells of normal human salivary gland in cell type-specific manner. |
| 3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2020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 | 入江 太郎 (Irie Tarou) (00317570) | 岩手医科大学・歯学部・教授 (31201) | |
| 研究分担者 | 深田 俊幸 (Fukada Toshiyuki) (70373363) | 徳島文理大学・薬学部・教授 (36102) | |
| 研究分担者 | 佐藤 泰生 (Sato Hirotaka) (40244941) | 岩手医科大学・歯学部・講師 (31201) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|