

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18762

研究課題名(和文) 基底膜-上皮細胞相互作用を介したエナメル芽細胞分化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of ameloblast differentiation through basement membrane-epithelial cell interaction

研究代表者

鮎田 啓太 (Funada, Keita)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80847997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯の発生は上皮-間葉相互作用により形成されることが知られており、上皮細胞と間葉細胞の間に介在する基底膜は、様々なシグナル伝達を調節する上で重要な足場であると考えられる。本研究では、歯の基底膜に発現するネフロネクチン(Npnt)のC末端側に存在するRGD領域の機能解析を行った。Npnt-FLおよびNpnt-EGFを発現させた歯原性上皮細胞株M3H1において、エナメル芽細胞分化マーカーであるAmeloblastinの発現が誘導されたが、Npnt-RGDでは認められなかった。以上の結果から、NpntのRGD領域はエナメル芽細胞分化に重要であ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

歯の再生において、歯の表面を覆うエナメル質の再生は困難であることが知られている。本研究により、歯原性上皮幹細胞の大量培養法への開発に繋がると考えられる基底膜分子ネフロネクチンの同定に成功した。細胞外マトリックス因子である基底膜分子は、遺伝子導入や遺伝子改変等の技術を必要とせずに細胞へと作用させることができることから、再生医療の応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Tooth development is initiated by epithelial-mesenchymal interactions. The basement membrane between the epithelium and mesenchyme mediates as an essential scaffold that regulates various signals. We focused on Nephronectin (NPNT), which is specifically localized in the basement membrane during epithelial-mesenchymal interaction. In this study, we analyzed the function of RGD domain of NPNT using Npnt-EGF and Npnt-RGD expression vectors, lacking the EGF-like repeats and the RGD domain of NPNT. Npnt-FL and Npnt-EGF overexpression in dental epithelial cells (M3H1) resulted in increased expression of ameloblastin (Ambn), which is a differentiation marker for ameloblasts. However, overexpression of Npnt-RGD did not alter the expression of Ambn in M3H1 cells. These data suggest that the RGD domain of NPNT may play an important role for ameloblast differentiation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯 細胞外マトリックス 基底膜 分化

## 1. 研究開始当初の背景

現在、様々な器官の再生医療を目指した研究が行われているが、依然として歯の再生は困難な状況にある。歯の再生を難しくしている問題点として、cell source の獲得が挙げられる。臨床上応用可能な細胞を得るには、歯の形態形成能を持った上皮細胞および間葉細胞の獲得が必要であり、それらを相互作用させることによって歯の形態形成を *in vitro* で再現することが可能になると考えられる。間葉細胞は、成熟した歯では歯髄と呼ばれる歯の内部に存在しているため比較的容易に採取でき、幹細胞が存在することから様々な分野での cell source として期待されている。しかしながら上皮細胞は、歯の表面を覆う硬組織であるエナメル質を形成後、口腔内に萌出する過程で失われてしまうため、安定した上皮細胞の獲得が問題となる。

我々はこれまでの研究で、歯原性上皮細胞の分化制御に重要な因子として増殖因子、転写因子および足場因子 (細胞外マトリックス) の3つに着目し、それぞれの方面からのアプローチを試みているが、最終的に歯の厳密な再生を行うためには、いくつかの問題点が残されている。歯原性上皮細胞の大量培養法の開発、細胞-基底膜 (細胞外マトリックス) 相互作用の解明、細胞-細胞間相互作用の役割の解明、分化した細胞に歯としての形態を付与する為の形態形成メカニズムの解明などであり、これらの役割を明らかにし、厳密に制御していくことで歯の再生やエナメル質の形成が可能になると考えられる。本研究では、細胞外マトリックスに関連すると思われる新規の基底膜分子 Nephronectin (Npnt) に着目し研究を開始した。本分子は基底膜に存在し、その遺伝子欠損マウスでは腎臓の形成不全を呈することが知られており、上皮-間葉相互作用により形成される器官発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

歯科医学の最終目的は歯および周囲組織の再生メカニズムの解明とその臨床応用である。歯の再生に向けた cell source の獲得へ向けて、歯原性上皮幹細胞の大量培養法への開発に繋がると考えられる細胞外マトリックス因子 (足場因子) Npnt の同定に成功した。同因子は歯原性上皮幹細胞に局在し、幹細胞分化および細胞増殖を制御している可能性が考えられる。細胞外マトリックス因子は遺伝子導入等の技術を必要とせず、比較的安全に細胞へと作用させることが可能となる。ネフロネクチンはその構造から、EGF-like repeat 領域および RGD 領域を有することが知られている。我々のこれまでの研究で、EGF-like repeat 領域は、EGFR を介して PI3K/AKT シグナル経路を活性化し、歯原性上皮幹細胞マーカーである Sox2 の発現を抑制することで前エナメル芽細胞へ細胞運命決定を行う可能性を示してきた。一方で、Npnt は C 末端に RGD 配列 (Arg-Gly-Asp) を持ち、インテグリンとの結合が示唆される。そこで本研究では、Npnt の RGD 領域を介したエナメル芽細胞分化制御機構解明を目的として、研究を行った。

## 3. 研究の方法

Npnt の機能解析のため、歯原性上皮細胞株 M3H1 を用いて研究を行った。Npnt リコンビナントタンパクを培養皿にコーティングし、細胞接着能および分化能の検討を行った。また、Npnt の機能ドメインを欠失した発現ベクターを作製し、解析に用いた。遺伝子発現解析は RT-qPCR 法を用いて行い、免疫沈降法の可視化に western blotting 法を用いた。歯の発生における integrin の発現パターン解析のため、生後 1 日齢マウス切歯の凍結切片を作製し、免疫染色法にて検討を行った。

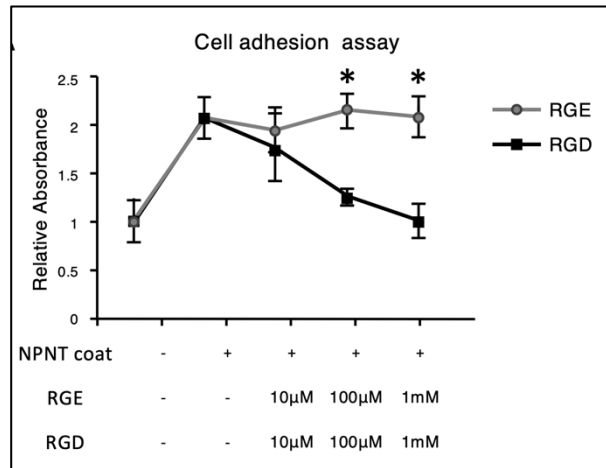
## 4. 研究成果

Npnt の RGD 領域が細胞分化に与える影響

Npnt はその N 末端側に EGF like repeat 領域、C 末端側に RGD 領域を持つことで知られている。そこで、全長発現ベクターを作製し、EGF-like repeat 領域および RGD 領域を欠失させた Npnt- $\Delta$ EGF および Npnt- $\Delta$ RGD 発現ベクターを作成した。歯原性上皮幹細胞株 M3H1 に Npnt-FL を遺伝子導入し、RT-qPCR 法を用いて細胞分化に与える影響を検討したところ、エナメル芽細胞分化マーカーである Ameloblastin (Ambn) を誘導することがわかった。この Ambn 誘導能は Npnt- $\Delta$ RGD 遺伝子導入を行うと抑制された。以上の結果から、Npnt の RGD 領域はエナメル芽細胞の分化に影響を与えている可能性が示唆された。

## RGD 領域の細胞接着能

RGD 領域は、インテグリン結合領域として知られており、細胞接着に重要であると考えられる。そこで、Npnt コーティングディッシュに M3H1 細胞を播種し、細胞接着能の検討を行った。RGD 拮抗作用がある RGD peptide を添加したところ、濃度依存的に M3H1 の細胞接着能が低下した (右図)。しかしながら、拮抗作用を持たない RGE peptide では、細胞接着能の低下は認められなかった。以上の結果から、Npnt の RGD 領域は機能ドメインとして働いている可能性が示唆された。



## Npnt に結合する integrin の同定

歯原性上皮細胞において発現する integrin family の中から、Npnt に反応する分子をスクリーニングするため、Npnt コーティングディッシュを作製し、RT-qPCR 法にて検索を行った。その結果、Npnt コーティングにより誘導される  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖インテグリンを同定した。両分子の遺伝子欠損マウスは、エナメル質形成不全症を呈することが報告されている。そこで、Npnt により誘導される細胞分化に影響を与えているか確認するため、siRNA を用いて検討を行ったところ、Npnt により誘導される Ambn が integrin 特異的 siRNA により抑制されることが判明した。そこで、免疫染色法にて integrin の局在を確認したところ、エナメルマトリックス分泌期のエナメル芽細胞に発現していた。そこで、Npnt と同定した integrin が直接結合しているか確認するため、免疫沈降法を行ったところ、Npnt と integrin の結合を認めた。以上の結果から、Npnt に結合すると考えられる integrin を同定し、同 integrin は Npnt を介してエナメル芽細胞の分化を制御している可能性が示唆された。

我々のこれまでの研究で、Npnt の EGF-like repeat 領域は、歯原性上皮幹細胞マーカーである Sox2 の発現を抑制することで前エナメル芽細胞へ細胞運命決定を行うことが判明している。本研究により、Npnt の RGD 領域は、エナメル芽細胞に発現するインテグリンと結合することでエナメル芽細胞の分化に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。本研究により、Npnt は歯の発生過程において、その機能ドメインを変化させることで歯の形成を制御しているユニークな機能を有している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Tian Tian, Miyazaki Kanako, Chiba Yuta, Funada Keita, Yuta Tomomi, Mizuta Kanji, Fu Yao, Kawahara Jumpei, Han Xue, Ando Yuna, Funada Ami, Yamada Aya, Iwamoto Tsutomu, Nakamura Seiji, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi, Yoshizaki Keigo | 4. 巻<br>12         |
| 2. 論文標題<br>An ex vivo organ culture screening model revealed that low temperature conditions prevent side effects of anticancer drugs  | 5. 発行年<br>2022年    |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>3093 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-022-06945-7  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tian Tian, Keigo Yoshizaki, Kanako Miyazaki, Keita Funada, Tomomi Yuta, Kanji Mizuta, Yao Fu, Ichiro Takahashi.                         |
| 2. 発表標題<br>Cyclophosphamide, an anti-cancer drug, disrupts tooth germ development by inhibiting epithelial cell proliferation and differentiation. |
| 3. 学会等名<br>第9回国際矯正歯科会議世界大会（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kanji Mizuta, Keigo Yoshizaki, Kanako Miyazaki, Keita Funada, Tomomi Yuta, Tian Tian, Yao Fu, Ichiro Takahashi. |
| 2. 発表標題<br>Nephronectin regulates ameloblast differentiation through its RGD domain.                                       |
| 3. 学会等名<br>第9回国際矯正歯科会議世界大会（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yao Fu, Kanako Miyazaki, Keigo Yoshizaki, Keita Funada, Tomomi Yuta, Tian Tian, Kanji Mizuta, Ichiro Takahashi.   |
| 2. 発表標題<br>A tooth specific Lypd1 expressed in dental mesenchyme regulates odontoblast differentiation in tooth development. |
| 3. 学会等名<br>第9回国際矯正歯科会議世界大会（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kanji Mizuta, Keigo Yoshizaki, Tomomi Yuta, Kanako Miyazaki, Keita Funada, Tian Tian, Yao Fu, Yuta Chiba, Ichiro Takahashi, Satoshi Fukumoto. |
| 2. 発表標題<br>A basement membrane protein Nephronectin plays important roles in tooth development.  |
| 3. 学会等名<br>A special symposium celebrating the 50th anniversary of the Protein Data Bank (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田 甜、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、鮎田 啓太、湯田 智美、水田 敢士、傅 堯、川原 純平、福本 敏、高橋 一郎 |
| 2. 発表標題<br>低温器官培養法を用いた抗癌剤シクロホスファミドによる歯胚形成阻害回避モデルの構築                |
| 3. 学会等名<br>第63回歯科基礎医学会学術大会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>水田 敢士、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、鮎田 啓太、湯田 智美、田 甜、傅 堯、川原 純平、福本 敏、高橋 一郎 |
| 2. 発表標題<br>基底膜分子 Nephronectin は RGD 領域を介してエナメル芽細胞の分化制御に関与する        |
| 3. 学会等名<br>第63回歯科基礎医学会学術大会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>宮崎 佳奈子、吉崎 恵悟、傅 堯、鮎田 啓太、湯田 智美、田 甜、水田 敢士、川原 純平、福本 敏、高橋 一郎 |
| 2. 発表標題<br>デスモゾーム構成因子 Plakophilin 1 は核内移行シグナルを介して細胞増殖を制御する         |
| 3. 学会等名<br>第63回歯科基礎医学会学術大会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>傅 堯、宮崎佳奈子、吉崎 恵悟、千葉 雄太、鮎田 啓太、田 甜、湯田 智美、水田 敢士、福本 敏、高橋 一郎 |
| 2. 発表標題<br>GPI アンカー型タンパク質 Lypd1 は象牙芽細胞分化に重要な役割を果たす                |
| 3. 学会等名<br>第63回歯科基礎医学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田 甜、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、安藤 優那、鮎田 啓太、湯田 智美、水田 敢士、傅 堯、川原 純平、高橋一郎 |
| 2. 発表標題<br>抗がん剤シクロホスファミドの歯胚に与える影響と副作用回避法の検索                        |
| 3. 学会等名<br>第80回日本矯正歯科学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>傅 堯、宮崎 佳奈子、吉崎 恵悟、田 甜、鮎田 啓太、湯田 智美、水田 敢士、川原 純平、花田 彩圭、高橋一郎 |
| 2. 発表標題<br>GPI アンカー型タンパク質Lypd1は歯の発生において象牙芽細胞分化を制御する                |
| 3. 学会等名<br>第80回日本矯正歯科学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>水田 敢士、吉崎 恵悟、宮崎 佳奈子、田 甜、鮎田 啓太、湯田 智美、傅 堯、川原 純平、高橋 一郎  |
| 2. 発表標題<br>基底膜分子Nephronectinは歯の発生においてRGD配列を介してエナメル芽細胞分化を制御している |
| 3. 学会等名<br>第80回日本矯正歯科学会学術大会                                    |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>宮崎 佳奈子, 吉崎 恵悟, 傅 堯, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 田 甜, 水田 敢士, 川原 純平, 花田 彩圭, 高橋 一郎 |
| 2. 発表標題<br>外胚葉異形成症原因遺伝子Plakophilin 1は転写共役因子として上皮形成を促進する                      |
| 3. 学会等名<br>第80回日本矯正歯科学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kanji Mizuta, Keigo Yoshizaki, Kanako Miyazaki, Keita Funada, Tomomi Yuta, Tian Tian, Yao Fu, Jumpei Kawahara, Ichiro Takahashi. |
| 2. 発表標題<br>The role of basement membrane protein Nephronectin in tooth development.   |
| 3. 学会等名<br>KOB & OBT 5thJoint International Symposium (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 吉崎 恵悟<br><br>(Yoshizaki Keigo)<br><br>(10507982) | 九州大学・歯学研究院・助教<br><br><br><br>(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 |
|---------|---------|