

令和 5 年 4 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18775

研究課題名（和文）歯胚間葉でのFoxc1の機能と分子制御解明-iPS細胞を用いた歯胚発生への応用-

研究課題名（英文）Elucidation of the function and molecular regulation of Foxc1 in tooth germ mesenchyme -Application to tooth germ development using iPS cells-

研究代表者

吉田 倫子 (Yoshida, Michiko)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80746818

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）：Foxc1の異常に起因するAxenfeld-Rieger症候群では、歯の先天欠如や形態異常が認められる。そのため、Foxc1が歯の発生に重要であると推察されるが、その機能は不明である。そこで本研究では、Foxc1が歯胚発生を制御する転写因子であると仮説を立て、歯胚発生におけるFoxc1の機能と分子制御をGli2との相互関係に着目して解析を行った。その結果、Foxc1は歯性間葉細胞に発現し、増殖および分化に関与していること、Gli2と物理的に結合することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Foxc1の異常に起因するAxenfeld-Rieger症候群では、歯の先天欠如や形態異常が認められるが、歯の発生におけるFoxc1の発現、機能、および分子制御は不明である。本研究により、Foxc1は歯の発生過程において主に歯性間葉細胞に発現し、Gli2との相互関係により、歯胚間葉の増殖および分化に関与し歯の発生を促すことが推測された。これらの知見に基づき、今後さらに歯胚発生におけるFoxc1を基軸とした新規分子制御が解明されれば、未だ全容の明らかでない先天性の歯の発生異常の病因解明につながるものが期待される。

研究成果の概要（英文）：Axenfeld-Rieger syndrome, caused by Foxc1 defects, is associated with congenital absence and malformation of teeth. Therefore, Foxc1 is presumed to be important for tooth development, but its function is unknown. In this study, we hypothesized that Foxc1 is a transcription factor that regulates tooth germ development, and analyzed the function and molecular regulation of Foxc1 in tooth germ development, focusing on its interrelationship with Gli2. As a result, it was revealed that Foxc1 is expressed in dental mesenchymal cells, is involved in proliferation and differentiation, and physically binds to Gli2.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Foxc1 歯胚発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障や無虹彩など眼の異常を主症状とする常染色体優性遺伝性疾患 Axenfeld-Rieger 症候群 (ARS) には、歯の先天欠如や矮小歯・タウロント歯などの歯の形態異常が認められる。ARS の原因遺伝子として *Foxc1* が知られている。そのため、*Foxc1* の遺伝子異常が、ARS における歯の発生異常を誘導すると推察されるが、歯の発生における *Foxc1* の発現、機能、および分子制御は不明である。

Foxc1 は、フォークヘッド遺伝子ファミリーに属する転写因子で、胎生期に眼、軟骨、および腎臓などに発現し発生を促す。フォークヘッド遺伝子ファミリーは、これまでに 44 個のメンバーが知られている。その中で *Foxf* は歯の発生過程において間葉組織に発現し、遺伝子変異により歯の欠損が認められることが知られている (Xu et al., *Development*, 2018)。しかし、*Foxc1* を含む他のフォークヘッド遺伝子ファミリーメンバーの歯胚発生における役割は不明である。

代表者は、*Foxc1* がヘッジホッグのシグナル伝達分子 *Gli2* と物理的に結合し、PTHrP の発現を促すことにより、内軟骨性骨化を制御することを見出した (Yoshida et al., *Nat Commun*, 2015)。加えて、マウス初代軟骨細胞において、*Foxc1* による PTHrP 発現制御にエピジェネティクスが関与することを明らかにした。一方、ヘッジホッグシグナリングは、歯の発生に必須な分子制御機構である。これまで、*Gli2* の異常により矮小歯や癒合歯を呈し、歯の発生過程における形態および位置異常が認められることが報告された。以上の知見から、*Foxc1* と *Gli2* の相互関係によるエピジェネティクス制御と歯の発生との関連が推察される。

また、代表者が所属するグループは、ARS 患者の矯正歯科治療を行い、症例報告を行った (Seki et al., *Acta Med Okayama*, 2019)。この患者では、上下顎前歯部の歯の先天欠如および上下顎大臼歯部に計 8 本のタウロント歯が認められた。*Foxc1* は ARS の原因遺伝子の一つであるため、代表者は ARS 患者における歯の発生異常に *Foxc1* が関与する可能性を見出した。

さらに、代表者の予備実験において、胎生マウス歯胚の上皮と間葉細胞における *Foxc1* の発現を解析した結果、歯性上皮細胞に比べて歯性間葉細胞において高い発現を示した。

以上により、代表者は、*Foxc1* は歯の発生過程で主に歯性間葉細胞で発現し、*Gli2* との相互関係によるエピジェネティクス制御により、歯の発生を促すと仮説を立てた。そこで本研究では、*Foxc1* が歯胚発生を制御する転写因子であると仮説を立て、歯胚発生における *Foxc1* の機能と分子制御を *Gli2* との相互関係に着目して明らかにすることとした。本研究により、歯胚発生における *Foxc1* を基軸とした新規分子制御を解明されれば、未だ全容の明らかでない先天性の歯の発生異常の病因解明につながることを期待される。

2. 研究の目的

Foxc1 の異常に起因する Axenfeld-Rieger 症候群では、歯の先天欠如や形態異常が認められる。そのため、*Foxc1* が歯の発生に重要であると推察されるが、その機能は不明である。代表者の予備実験から、歯胚の間葉細胞において高い *Foxc1* の発現が示された。さらに代表者は、過去に *Foxc1* が *Gli2* と物理的に結合し、内軟骨性骨化を制御することを報告した。*Gli2* は、歯の発生に関与することが知られている。これらの知見から代表者は、歯性間葉細胞で発現する *Foxc1* が *Gli2* と相互関係を持ち、正常な歯の発生に寄与すると仮説を立てた。本研究の目的は、歯の発生過程における歯性間葉細胞での *Foxc1* の機能と分子メカニズムを、*Gli2* との相互関係によるエピジェネティクス制御に着目して解明することである。本研究により、歯の発生の新規制御機構の解明が期待される。

3. 研究の方法

(1) マウス歯胚発生における *Foxc1* の発現解析の方法

組織切片の作製

歯胚発生の開始期、蕾状期、帽状期、および鐘状期に相当する胎生 12.5、13.5、14.5、16.5 および 18.5 日 C57BL/6 マウス (日本クレア, Tokyo, Japan) から摘出した下顎臼歯歯胚を含む頭部組織を、4% paraformaldehyde (PFA) にて固定した。その後 4.5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を用いて 4°C で 24 時間脱灰を行った。脱水後、組織をパラフィンに包埋し、5-6 μm の厚さで組織切片を作製した。

免疫組織化学染色

Foxc1 の検出のために、脱パラフィンした組織切片を 0.1 M クエン酸溶液に浸し、マイクロウェーブで 2 分間沸騰させた後、30 分間室温にて徐冷した。PBS で洗浄後、切片を 3% 過酸化水素を含む methanol により室温で 15 分間処理した。切片を、PBS で希釈した抗 *Foxc1* 抗体にて、4°C で一晩反応させた。PBS にて洗浄後、Histofine Simplestain Max PO (Nichirei, Tokyo, Japan) にて室温で 30 分処理を行い、ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB; Nichirei, Tokyo, Japan) にてシグナルを検出した。

(2) マウス歯性上皮細胞および歯性間葉細胞における *Foxc1* の機能解析の方法

歯性上皮細胞および歯性間葉細胞の単離および培養

胎齢 14.5 日 C57BL/6 マウス (日本クレア, Tokyo, Japan) の下顎臼歯歯胚を外科的に摘出した。下顎臼歯歯胚は、1.2 U/ml dispase (Roche, Mannheim, Germany) と、20 U/ml DNase

(Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて、常温にて12.5分インキュベートされた後、注射針を用いて機械的に上皮ならびに間葉組織に分離した。

歯胚上皮組織は、100 U/ml collagenase (Worthington, Lakewood, NJ) を含む Phosphate buffered saline (PBS)にて37 °Cで15分間酵素処理を二回行い、その後0.25% trypsin (Sigma, St. Louis, MO) および20 U/ml DNase (Takara Bio) を含むPBSにて37 °Cで5分間インキュベートし、細胞の単一化を行った。歯性上皮細胞は、ガラスボトムディッシュを20 µg/ml フィブロネクチンおよび100 µg/ml 型コラーゲンでコーティング後、単離した上皮細胞を 1.5×10^5 cell/cm²の密度で96 well plateに播種し、CnT-PR-Dを用いて培養した。

歯胚間葉組織は、0.25% trypsin、50 U/ml collagenase および20 U/ml DNase を含むPBSにて37 °Cで15分間の酵素処理を行い、細胞の単一化を行った。歯性間葉細胞は、10% FBS、100 units/ml の penicillin および100 µg/ml の streptomycin を添加した D-MEM を用いて培養した。

Foxc1 レンチウイルスの作製

Foxc1Flag 標識の cDNA を含む発現ベクターは、GenScript (ニュージャージー州、米国) から購入した。Foxc1Flag 標識の cDNA を PCR で増幅し、pLV5IN-IRES-ZsGreen1 レンチウイルスプラスミド(タカラバイオ、滋賀、日本)の XhoI および XbaI 部位にサブクローニングした。ウイルス粒子は、Lentiviral High Titer Packaging Mix (Takara) を使用し、製品プロトコールに従って293T Lenti-X 細胞株 (Clontech, CA, USA) で生成され、Lenti-X qRT-PCR Titration Kit (Clontech) を使用して力価測定を行った。タンパク質の発現は、抗 Flag 抗体 (Sigma-Aldrich, MO, USA) を使用したウェスタンブロッティングによって確かめられた。

歯性上皮細胞および歯性間葉細胞における Foxc1 過剰発現解析

歯性上皮細胞および歯性間葉細胞に Foxc1 レンチウイルスを過剰発現させて培養後に、RNeasy Kit を用いて、細胞からトータル RNA を抽出した。0.4 µg の RNA を鋳型とし、PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて逆転写反応を行い、cDNA 合成を行った。

リアルタイム PCR は Thermal Cycler Dice Real Time system (Takara Bio)を用いて行った。反応液は、2倍希釈した cDNA を2 µl、センスプライマー、アンチセンスプライマーを0.4 µM、SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio)を12.5 µl含む。PCR 反応は熱変性を95 °C、5秒、アニーリングおよび伸長反応を60 °C、30秒間の条件で40サイクル行った。各遺伝子発現量は GAPDH の発現量に対する相対値で示し、 $2^{-\Delta CT}$ 法で解析した。発現解析する因子は、歯性上皮細胞マーカー、歯性間葉細胞マーカーおよび象牙芽細胞マーカーである。

また、BrdU In-Situ Detection Kit を用いて、製品プロトコールに従い、Bromodeoxyuridine (BrdU)アッセイを行った。

(3) 歯性間葉細胞における Foxc1 と Gli2 の免疫沈降法

歯性間葉細胞に、3xFlag-Foxc1、Myc-Gli2 のいずれか、または両者をトランスフェクションし、48時間後に細胞をリン酸緩衝生理食塩水にて2回洗浄後、細胞溶解溶液(20 mM Hepes pH 7.4、150 mM 塩化ナトリウム (NaCl)、1 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA)、1.5 mM 塩化マグネシウム (MgCl₂)、10 %グリセロール、1 % Triton X-100、10 µg/ml アプロチニン、10 µg/ml ロイペプチン、1 mM ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩、0.2 mM オルソバナジウム酸ナトリウム)により溶解した後、15,000 g、15分、遠心分離し、上清を全タンパク質抽出液とした。この上清にプロテイン G 磁気ビーズが付着したマウス抗 Flag 抗体 (Sigma) またはマウス抗 Myc 抗体 (医学生物研究所、愛知) を添加し、4 °C、1時間、反応させた。1ml の冷リン酸緩衝生理食塩水にて4回洗浄後、0.5 M メルカプトエタノール含有の SDS サンプルバッファーで熱溶解 (95 °C、5分) し、上清をサンプルとした。これらサンプルは、10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、ウェスタンブロッティング法により検出した。

4. 研究成果

(1) マウス歯胚発生における Foxc1 の発現について

歯胚発生過程における Foxc1 の発現パターンを解析した結果、蕾状期から鐘状期をとおして歯胚間葉の領域で Foxc1 の発現が明らかとなった。

以上により、歯胚発生を通して、Foxc1 が歯性間葉細胞の分化において重要な役割を果たしていることが推察される。

(2) Foxc1 がマウス歯性上皮細胞および歯性間葉細胞に及ぼす影響について

歯性間葉細胞に Foxc1 レンチウイルスを用いて Foxc1 を過剰発現させた結果、歯性間葉細胞マーカーおよび象牙芽細胞マーカーの発現が上昇することが明らかとなった。さらに、象牙芽細胞の分化亢進と増殖の低下が認められた。

以上により、Foxc1 は歯性間葉細胞の増殖および分化に関与していることが明らかとなった。

(3) 歯性間葉細胞における Foxc1 と Gli2 の相互関係について

Foxc1 と Gli2 の協調作用を検討するために、Myc 標識した Gli2 と Flag 標識した Foxc1 を歯性間葉細胞に遺伝子導入し、免疫共沈降実験を行った結果、Foxc1 は Gli2 と物理的に結合することが明らかとなった。

以上により、Foxc1 は歯の発生過程において主に歯性間葉細胞に発現し、Gli2 との相互関係により、歯胚間葉の増殖および分化に関与し歯の発生を促すことが推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takano I, Takeshita N, Yoshida M, Seki D, Oyanagi T, Kimura S, Jiang W, Sasaki K, Sogi C, Kawatsu M, Takano-Yamamoto T.	4. 巻 236
2. 論文標題 Ten-m/0dz3 regulates migration and differentiation of chondrogenic ATDC5 cells via RhoA-mediated actin reorganization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 2906-2919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30058	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 Ono K, Hata K, Nakamura E, Ishihara S, Kobayashi S, Nakanishi M, Yoshida M, Takahata Y, Murakami T, Takenoshita S, Komori T, Nishimura R, Yoneda T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Dmrt2 promotes transition of endochondral bone formation by linking Sox9 and Runx2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01848-1	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 Jiang W, Takeshita N, Maeda T, Sogi C, Oyanagi T, Kimura S, Yoshida M, Sasaki K, Ito A, Takano-Yamamoto T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Connective tissue growth factor promotes chemotaxis of preosteoblasts through integrin 5 and Ras during tensile force-induced intramembranous osteogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82246-9	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 Sogi C, Takeshita N, Jiang W, Kim S, Maeda T, Yoshida M, Oyanagi T, Ito A, Kimura S, Seki D, Takano I, Sakai Y, Fujiwara I, Kure S, Takano-Yamamoto T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Methionine Enkephalin Suppresses Osteocyte Apoptosis Induced by Compressive Force through Regulation of Nuclear Translocation of NFATc1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JBMR Plus.	6. 最初と最後の頁 e10369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm4.10369	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 -

〔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 穴田一生、伊藤新、安野梢、吉田倫子、溝口到
2. 発表標題 顎関節荷重負荷がラット関節円板のコラーゲン発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下信郎, ジャン・ウェイ, 前田敏博, 曾木千純, 大柳俊仁, 木村晴地, 吉田倫子, 佐々木紀代, 伊藤新, 山本照子
2. 発表標題 膜性骨化においてCTGFはintegrin 5とRasを介し前駆骨芽細胞のchemotaxisを促す
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下信郎, 曾木千純, 大柳俊仁, 吉田倫子, 山本照子
2. 発表標題 牽引力が誘導する膜性骨化においてCTGFはintegrin 5とRasを介して前駆骨芽細胞のchemotaxisを促す
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤新、吉田倫子、穴田一生、安野梢、溝口到
2. 発表標題 顎関節円板におけるエラスチンの加齢変化
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会 & 第9回日韓ジョイントシンポジウム
4. 発表年 2022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
---------	---------