

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462862

研究課題名(和文) 歯胚の形態形成におけるPP2Aインヒビターの細胞内シグナル伝達制御機構の解明

研究課題名(英文) A study of cellular signaling of PP2A inhibitor during the tooth development

## 研究代表者

永田 健吾 (Nagata, Kengo)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90189134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯の形態形成は上皮間葉相互作用により行われる。我々は、マウス歯胚形成初期に強発現を示す遺伝子をcDNAサブトラクション法によりいくつか検出した。今回、それらの因子の中でPP2Aインヒビター2(I2PP2A)およびFRG1について、マウス歯胚組織を用いてタンパクやmRNAの局在を形態学的に検索し、歯の形態形成において特異的な発現していることを見出した。併せて、マウス歯原性上皮細胞内でのFRG1発現および局在を検索し、I2PP2AおよびFRG1がマウス歯胚形態形成において重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Odontogenesis is regulated by the sequential and reciprocal epithelial-mesenchymal interactions through the various growth factors and cytokines. We previously performed cDNA subtraction between mouse mandibles collected on embryonic days 10.5 and 12.0 to identify the genes, including protein phosphatase 2A inhibitor 2 (I2PP2A) and facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene 1 (FRG1). In this study, we show the specific expression of I2PP2A and FRG1 during the mouse tooth morphogenesis. The expression and localization of FRG1 were also shown using the mouse odontogenic epithelial cell line. Our present findings indicate that I2PP2A and FRG1 may play important roles in mouse tooth morphogenesis.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯の発生 エナメル質形成 象牙質形成 I2PP2A FRG1

### 1. 研究開始当初の背景

歯の形態形成は上皮・間葉相互作用により行われていく。歯以外にも上皮・間葉相互作用で形態形成が行われる器官として、毛、唾液腺、肺、腎があげられる。形態形成に関与する遺伝子は時間空間的に厳密にその発現が調節されており、多くの分子が相互に関連しながらネットワークを作って働いている。我々はそれらのネットワークの中で歯の形成に重要な因子を見出そうとして、胎齢10.5日と12.0日のマウス下顎組織間でcDNAサブトラクション法を行い、その時期に強発現を示す遺伝子の中で、歯胚の形態形成への関与について今まで報告されていない因子をいくつか検出した。I2PP2A (protein phosphatase 2A inhibitor 2)はそのうちの1つである。

我々は、歯の再生医療を見据えた人工的な歯胚再生法の確立を目指した研究を推進しており、既に歯原性幹細胞の作製を試みていた。効率よく歯原性幹細胞を分化誘導するシステムの確立には、上皮・間葉相互作用に重要な歯胚形成因子の分子ネットワークを捉え、各因子の機能的役割を捉え明確にする必要があった。cDNAサブトラクション法により同定したマウス歯胚形成初期に強発現を示す遺伝子について、歯の形態形成における役割を解明しようとして解析を継続していた。

### 2. 研究の目的

本研究は、歯胚形成過程に重要とされる細胞内シグナリング分子ネットワークに着目し、それらのシグナル伝達を中心的に調節しているprotein phosphatase 2A (PP2A)の機能的阻害因子I2PP2A (protein phosphatase 2A inhibitor 2)の制御機構を捉え、その機能的役割を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

胎齢10.5日から生後20日までのBALB/cマウスを実験に用いた。In vivoや、器官培養後の試料について、継時的にサンプリングを行い、免疫組織化学法およびin situ hybridization法に用いるため、通法により組織を固定し、パラフィン標本や凍結標本を作製した。目的とするタンパクや遺伝子の局在を検索するには、免疫組織化学法では蛍光色素、in situ hybridization法ではジゴキシゲンにより行った。

また、マウス歯原性上皮細胞株 (mDE6) を用いて、タンパクの細胞内局在を調べるには細胞固定後に免疫細胞化学法を行い、その後蛍光顕微鏡により、検索を行った。培養細胞または組織からタンパクおよびRNAを回収し、ウエスタンブロッテ

ィング法によるタンパク発現の定量やRT-PCR法により遺伝子の発現解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 歯胚形成過程に重要とされる細胞内シグナル伝達を調節しているprotein phosphatase 2Aを阻害する因子であるI2PP2Aに着目し、その機能的役割を解明することを目的とし、始めに胎齢11日 (E11)の下顎および胎齢15日歯胚組織を器官培養下でsiRNA法によるI2PP2Aノックダウンを行い、通法により組織標本を作製し、歯胚形態の変化を組織学的に解析した。しかし、I2PP2Aの機能解明に必要とするI2PP2A発現制御ベクターの作製に時間を要し、機能解析を行うまでには至らなかった。(2) そこで歯胚形成初期に強発現を示す遺伝子としてI2PP2Aと一緒に検出されたfacioscapulo-humeral muscular dystrophy region gene 1 (FRG1)について、歯胚形成開始期 (E10.5) から、肥厚期 (E12)、蕾状期 (E14)、帽状期 (E15-16)、早期鐘状期 (E18)、晚期鐘状期 (P0-P3)、歯根形成期 (P10)、萌出期 (P20) までの各時期について、免疫組織化学法およびin situ hybridization法により、FRG1タンパクと遺伝子の発現様式を解析した。

歯胚形成開始期E10.5には歯胚が形成される予定域の上皮層と間葉組織に、E12には歯胚予定上皮と周囲の間葉組織、E14には蕾状期歯胚上皮および間葉組織にFRG1タンパクとmRNAのシグナルを確認できた。E15-16には歯胚組織の分化がみられエナメル器全体にmRNAのシグナルを確認できた。間葉組織の歯乳頭と歯小囊における発現シグナルは上皮性歯胚のエナメル器よりも弱かった。E15-16のFRG1タンパクの発現はmRNAの発現とほとんど一致しており、一次エナメル結節に強発現を認めた (図1)。

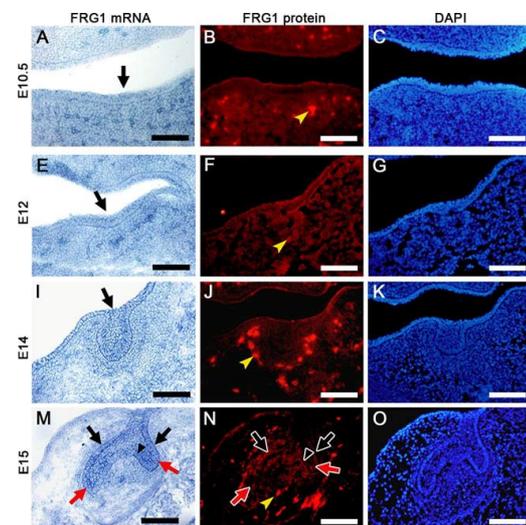


図1 歯胚形成開始期～帽状期歯胚

E18には歯胚組織の分化がさらに進み、内エナメル上皮にFRG1タンパクとmRNAの強い発現局在がみられた。間葉組織の歯乳頭では上皮組織に比べるといずれも弱い発現を示したが、内エナメル上皮に面する歯乳頭細胞には強い発現を認めた。

硬組織形成が始まるP0-P3になると内エナメル上皮からエナメル芽細胞、歯乳頭から象牙芽細胞への分化がみられ、エナメル質および象牙質を分泌するようになる。同時期には、エナメル芽細胞および象牙芽細胞にFRG1タンパクとmRNAの強い発現局在がみられただけでなく、前エナメル芽細胞、内エナメル上皮、中間層、前象牙芽細胞にもFRG1タンパクとmRNAの発現は認められた(図2)。

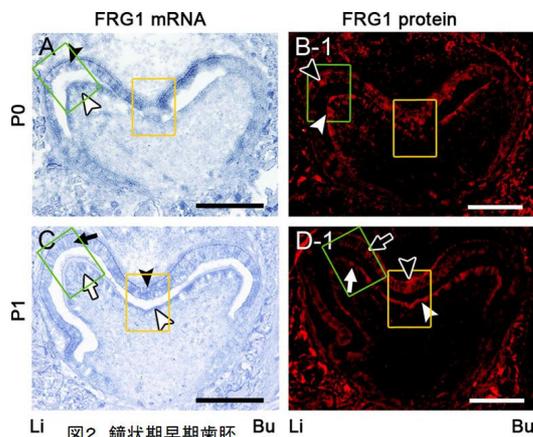


図2 鐘状期早期歯胚

歯冠の形態形成を終えたエナメル器はさらに下方へ伸長しHertwig上皮鞘(HERS)とよばれるようになり、歯根形成が行われて行く。P10では中間層の細胞や歯頸部付近にあるエナメル芽細胞にFRG1 mRNAの強発現が、また、咬頭頂に相当する部位の象牙芽細胞や歯頸部付近の前象牙芽細胞にもFRG1 mRNAの強発現が認められた。HERSにはFRG1タンパクの発現が認められた(図3)。

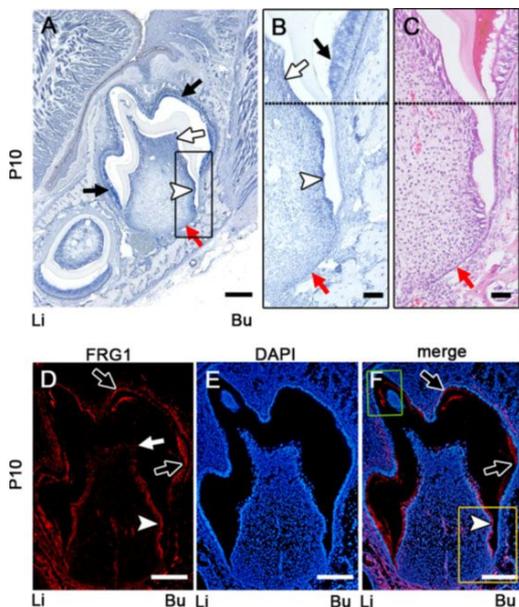


図3 歯根形成期歯胚

萌出期P20には、口腔粘膜からエナメル質が露出し、咬合平面に向かう歯の萌出運動が行われ、歯根形成が終了すると同じくして萌出が完了する。この時期においては上皮性歯胚は変性し、わずかにMalassez上皮遺残として歯根膜に存在するのみとなる。FRG1タンパクとmRNAの発現は象牙芽細胞に確認できた。

(3) マウス歯原性上皮細胞株mDE6を用いて、FRG1の機能的役割を解明するための実験を行った。まず、FRG1タンパクに対する抗体を用いた免疫細胞化学により、FRG1タンパクはmDE6では主に核に存在していることが認められた。mDE6をbone morphogenetic protein-4(BMP4)で活性化する(in vivoでの内エナメル上皮からエナメル芽細胞へ分化を想定)と、FRG1タンパクは核だけではなく細胞質にも局在が認められた。細胞質での局在は、アクチンとFRG1タンパクを二重染色することにより、FRG1タンパクはアクチンと共存していることが分かった(図4)。

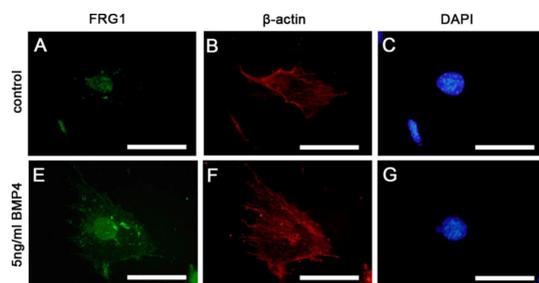


図4 BMP4刺激歯原性上皮細胞mDE6でのFRG1の細胞内局在

さらに、mDE6でのFRG1タンパクの細胞内局在について、ウエスタンブロットングデモカクニンシタ。BMP4刺激後のmDE6から細胞質画分と核画分を精製し、ウエスタンブロットング法でFRG1タンパクの存在を検索したところ、BMP4刺激後の細胞質画分にFRG1タンパクが存在していることを確認できた(図5)。

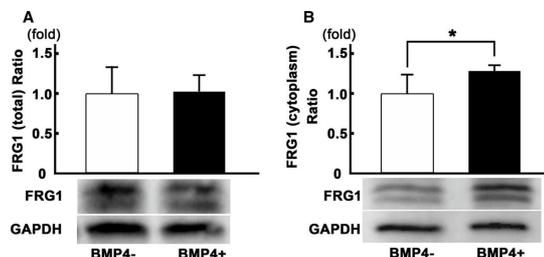


図5 BMP4刺激歯原性上皮細胞mDE6でのFRG1タンパク発現定量

歯胚形成初期から歯冠形成期にかけてのFRG1の発現局在は上皮性歯胚および間葉性歯胚組織のいずれにも見られた。E15ではFRG1がエナメル器の一次エナメル結節に強発現していたことから、歯冠形態形成への関与が伺われた。硬組織形成が始まるP1-0期には、前エナメル芽細胞およびエナメル芽細胞、前象牙芽細胞および象牙芽細胞においてFRG1が強発現を示していたことと、BMP4刺激

により歯原性上皮細胞 mDE6 において、細胞質内で FRG1 とアクチンとの共局在が示したことから、核内に存在していた FRG1 が細胞質に移動してアクチンと作用することでエナメル質および象牙質形成、すなわち歯の形態形成に関与している可能性が示された。

#### 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1件)

Kana Hasegawa, Hiroko Wada, Kengo Nagata, Hiroaki Fujiwara, Naohisa Wada, Hirotaka Someya, Yurie Mikami, Hidetaka Sakai and Tamotsu Kiyosima

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) region gene 1 (FRG1) expression and possible function in mouse tooth germ development. Journal of Molecular Histology 2016, in press. 査読あり

##### 〔学会発表〕(計2件)

永田 健吾、藤原 弘明、和田 裕子、三上友理恵、神野彰子、安部みさき、清島 保

Immunoexpression of glucose regulated protein-78 in the mouse molar and incisor teeth during tooth development. 第57回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015年、新潟市

長谷川佳那、和田 裕子、永田 健吾、藤原 弘明、染矢裕孝、神野彰子、三上友理恵、清島 保

歯胚の発育における Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Region Gene 1 (FRG) の発現様式 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014年、福岡市

##### 〔図書〕(計0件)

##### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

##### 〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

永田 健吾 (NAGATA, Kengo)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 90189134

##### (2) 研究分担者

清島 保 (KIYOSHIMA, Tamotsu)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号: 20264054

和田 裕子 (WADA, Hiroko)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 70380706

藤原 弘明 (FUJIWARA, Hiroaki)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 50634200

坂井 英隆 (SAKAI, Hidetaka)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号: 80136499