

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462889

研究課題名(和文) 歯髄で高発現するホメオボックス遺伝子MSXファミリーの機能解析

研究課題名(英文) Expression and functional analysis of MSX homeobox gene family in dental pulp

研究代表者

藤本 勝巳 (FUJIMOTO, KATSUMI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：40294566

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)：歯髄細胞の骨芽細胞分化/象牙芽細胞分化におけるMSX1の役割について解析した。MSX1のノックダウンにより、歯髄細胞の石灰化が著しく抑制され、骨芽細胞分化関連遺伝子の発現も低下したことから、MSX1は骨芽細胞分化/象牙芽細胞分化の促進因子として機能していることが示唆された。MSX1タンパクはマウス臼歯の歯根部の象牙芽細胞および血管周囲の歯髄間葉系細胞に強く発現していた。また、MSX1標的候補遺伝子を同定するために、ChIP-SeqおよびDNAマイクロアレイ解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We examined that the role of MSX1 in regulating osteogenic/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs). Knockdown of MSX1 suppressed the expression of osteoblast-related genes, alkaline phosphatase activity and calcification in DPSCs under osteogenic conditions, suggesting that MSX1 positively regulates osteogenic/odontogenic differentiation. MSX1 proteins were intensely expressed in odontoblasts of the roots and pulpal mesenchymal cells surrounding the blood vessels in the maxillary molar of 3 week-old mice. In addition, we performed gene expression microarray and ChIP-seq analysis to identify candidate MSX1 target genes.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯髄細胞 MSX1 骨芽細胞分化 象牙芽細胞分化

1. 研究開始当初の背景

歯の修復・再生にとって歯髄は重要な組織である。歯髄内の前駆細胞や幹細胞が象牙芽細胞に分化し、反応象牙質や修復象牙質が形成される。歯髄細胞の象牙芽細胞分化能の高さから、歯髄細胞特有の象牙芽細胞分化関連因子(転写因子およびシグナル因子)の存在が示唆されているが、まだ十分に解明されていない。

申請者は、歯髄細胞の特徴を明らかにするために DNA マイクロアレイ解析を行い、歯髄細胞および歯髄幹細胞に高発現する遺伝群を同定した。その中には、歯牙形成の重要因子として知られているホメオボックス型転写因子 MSX1 が含まれており、他の組織(骨髄、脂肪組織、関節滑膜)由来の幹細胞や線維芽細胞と比べ、歯髄細胞および歯髄幹細胞では5倍以上の発現を示した。MSX1 は歯胚等の器官形成過程において上皮-間葉相互作用の誘導や骨・軟骨分化に関与することが知られているが、歯髄における役割については不明である。

2. 研究の目的

ホメオボックス遺伝子 MSX1 は、歯牙等の器官形成過程における上皮-間葉相互作用に関与する転写因子である。これまでの研究により、MSX1 および MSX2 は先天性形態異常疾患に関わる原因遺伝子であることが明らかにされてきた。ヒトにおいて MSX1 の変異は、症候群性の歯牙欠損や常染色体優性の非症候群性先天性多数歯欠損症を引き起こし、MSX1 ノックアウトマウスでは口唇口蓋裂や歯牙欠損が認められる。一方、MSX2 ノックアウトマウスでは骨・軟骨および歯エナメル形成障害が観察される。また、MSX1,2 ダブルノックアウトマウスは胎生致死で、きわめて多くの器官において発生異常がみられることから、MSX1 と MSX2 はお互いの機能を代償し得ると考えられている。このように、多くの遺伝学的・形態学的研究により、歯牙形成を含む多くの器官形成における MSX 遺伝子の重要性が示唆されているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。また、これまでに同定された MSX1 および MSX2 の標的遺伝子の数は少なく、転写因子としての作用メカニズムについても十分に解明されていない。

申請者らの研究により、MSX1 は歯髄細胞および歯髄幹細胞に高発現していることが明らかになったが、その作用機序は不明である。本研究では、歯髄細胞における MSX1 標的遺伝子を網羅的に解析し、歯髄細胞の象牙芽細胞分化における MSX1 の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ChIP-Seq 解析による MSX1 標的遺伝子の探索
ゲノム上の MSX1 結合位置を特定するために、

歯髄幹細胞の DNA 断片を MSX1 抗体で免疫沈降させ、回収した DNA 断片の配列情報を次世代シーケンサーで網羅的に解析した。

(2)DNA マイクロアレイ解析による MSX1 標的遺伝子の探索

MSX1 により発現が制御される遺伝子を調べるために、コントロール群と MSX1 ノックダウン群の歯髄幹細胞から RNA を回収し、DNA マイクロアレイ解析により発現量に差のある遺伝子群を抽出した。さらに、(1)の ChIP-Seq 解析と(2)の DNA マイクロアレイ解析の結果を統合して、標的遺伝子を選定した。

(3)骨芽細胞分化 / 象牙芽細胞分化過程における MSX1 の発現解析

歯髄幹細胞を骨芽細胞分化 / 象牙芽細胞に分化誘導し、分化誘導後の各ポイントにおける MSX1 の mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR で解析した。また、象牙芽細胞マーカー遺伝子 (RUNX2、BMP2、オステリックス、アルカリンフォスファターゼ、オステオカルシン) の発現と比較した。

(4)歯髄幹細胞の石灰化に対する MSX1 ノックダウンの影響

RNAi 法により MSX1 の発現を阻害した歯髄幹細胞 (MSX1 ノックダウン歯髄幹細胞) を作製した。これらの細胞およびコントロール歯髄幹細胞を骨芽細胞 / 象牙芽細胞に分化誘導し、石灰化の程度をアリザリンレッド染色により解析した。

(5)歯髄幹細胞の骨分化マーカー遺伝子発現に対する MSX1 ノックダウンの影響

MSX1 ノックダウン歯髄幹細胞およびコントロール歯髄幹細胞を骨芽細胞 / 象牙芽細胞に分化誘導し、細胞から RNA を回収後、骨芽細胞 / 象牙芽細胞マーカーである RUNX2、BMP2、オステリックス、アルカリンフォスファターゼ、オステオカルシンの mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR で測定した。

(6)歯髄幹細胞のアルカリンフォスファターゼ活性に対する MSX1 ノックダウンの影響

MSX1 ノックダウン歯髄幹細胞およびコントロール歯髄幹細胞を骨芽細胞 / 象牙芽細胞に分化誘導し、細胞を 1% NP-40 で抽出後、アルカリンフォスファターゼ活性を測定した。

(7) MSX1 免疫染色

3 週齢のマウスから臼歯を含む上顎を回収し、そのパラフィン切片を作製した。一次抗体は抗マウス MSX1 ウサギポリクローナル抗体を使用した。二次抗体は抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体-HRP ポリマー試薬を使用し、最終的にパーオキシダーゼの酵素反応によって MSX1 タンパク発現部位を染色した。

4. 研究成果

(1)ChIP-Seq解析によるMSX1標的遺伝子の探索

ChIP-Seqの配列情報からMSX1が結合するゲノム上の位置を数多く特定した。その中でもp値が 10^{-5} 以下の7249箇所についてゲノム領域との関係性について解析した結果、これらのMSX1結合部位の26%は遺伝子上流領域である5' UTRとプロモーター領域に分布する一方、遺伝子の下流領域である3' UTRとその下流領域には2%しか存在していなかった。ゲノムにおける遺伝子上流領域の占める割合は10%以下なので、MSX1は遺伝子上流領域に比較的多く結合し、転写の調節に寄与していると予想された。

(2)DNAマイクロアレイ解析によるMSX1標的遺伝子の探索

コントロール歯髄幹細胞と比べMSX1をノックダウンした歯髄幹細胞において発現が1.5倍以上低下あるいは増加した遺伝子は、それぞれ545個と464個であった。MSX1は転写抑制因子であるので、ノックダウンで発現が増加した464個の遺伝子とChIP-Seqのゲノム結合部位の情報を統合して、109個の遺伝子をMSX1標的候補遺伝子として選定した。その中にはシグナル伝達や細胞分化に関わる遺伝子が多数含まれていた。

(3)骨芽細胞分化/象牙芽細胞分化過程におけるMSX1の発現変動

MSX1のmRNAの発現は骨芽細胞分化/象牙芽細胞分化誘導後4日目で約5倍に増加し、その後徐々に低下していった。この発現パターンは骨芽細胞/象牙芽細胞マーカー遺伝子であるRUNX2、BMP2、アルカリンフォスファターゼ、オステオカルシンの発現パターンと類似していた。

(4)MSX1の骨芽細胞分化/象牙芽細胞分化に対する影響

MSX1をノックダウンした歯髄幹細胞ではコントロール歯髄幹細胞と比べ、石灰化が著しく抑制された。骨芽細胞分化/象牙芽細胞分化関連遺伝子であるRUNX2、BMP2、アルカリンフォスファターゼ、オステオカルシンのmRNA発現はMSX1ノックダウン細胞で有意に低下した。また、MSX1ノックダウンによるアルカリンフォスファターゼ活性の低下が確認された。これらの結果は、MSX1が歯髄幹細胞において象牙芽細胞/骨芽細胞分化の促進因子として機能していることを示唆している。

(5)免疫染色によるマウス上顎臼歯組織におけるMSX1タンパク発現解析

歯根部分の分化途中の象牙芽細胞において、核と細胞質(象牙芽細胞突起を含む)の両方にMSX1の強い発現が観察されたが、歯冠部の成熟した象牙芽細胞ではMSX1はあまり発現し

ていなかった。また、血管周囲の歯髄間葉系細胞においても、MSX1は核に強く発現していた。これらの結果から、MSX1は歯髄組織において初期もしくは中期の象牙芽細胞分化の制御、および歯髄間葉系細胞の維持に関与していると考えられる。

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 7件)

DEC2 is a negative regulator for the proliferation and differentiation of chondrocyte lineage-committed mesenchymal stem cells. Sasamoto, T., Fujimoto, K., Kanawa, M., Kimura, J., Takeuchi, J., Harada, N., Goto, N., Kawamoto, T., Noshiro, M., Suardita, K., Tanne, K., Kato, Y. *Int. J. Mol. Med.* in press. 査読有り, <https://www.spandidos-publications.com/ijmm>

Characteristic expression of MSX1, MSX2, TBX2 and ENTPD1 in dental pulp cells. Fujii, S., Fujimoto, K., Goto, N., Kanawa, M., Kawamoto, T., Pan, H., Srivatanakul, P., Rakdang, W., Pornprasitwech, J., Saskianti, T., Suardita, K., Nishimura, F., Kato, Y. *Biomed. Rep.*, 3(4), 566-572, 2015. 査読有り, DOI: 10.3892/br.2015.456

DEC2-E4BP4 Heterodimer Represses the Transcriptional Enhancer Activity of the EE Element in the Per2 Promoter. Tanoue, S., Fujimoto, K., Myung, J., Hatanaka, F., Kato, Y., Takumi, T. *Front. Neurol.*, 6, 166, 2015. 査読有り, DOI: 10.3389/fneur.2015.00166

Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 regulates the cisplatin-induced apoptotic pathway of human esophageal cancer cells. Seino, H., Wu, Y., Morohashi, S., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Kato, Y., Takai, Y., Kijima, H. *Biomed. Res.*, 36(2), 89-96, 2015. 査読有り, DOI: 10.2220/biomedres.36.89

Involvement of c-Myc in the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells induced by bHLH transcription factor DEC2. Wu, Y., Sato, H., Suzuki, T., Yoshizawa, T., Morohashi, S., Seino, H., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Kato, Y., Kijima, H. *Int. J. Mol. Med.*, 35(3), 815-820, 2015. 査

読有り, DOI: 10.3892/ijmm.2014.2042

A Novel Protein, CHRONO, Functions as a Core Component of the Mammalian Circadian Clock. Goriki, A., Hatanaka, F., Myung, J., Kim, J.K., Yoritaka, T., Tanoue, S., Abe, T., Kiyonari, H., Fujimoto, K., Kato, Y., Todo, T., Matsubara, A., Forger, D., Takumi, T. PLoS Biol., 12(4), e1001839, 2014. 査読有り, DOI: 10.1371/journal.pbio.1001839

DEC1/STRA13/SHARP2 and DEC2/SHARP1 Coordinate Physiological Processes, Including Circadian Rhythms in Response to Environmental Stimuli. Kato, Y., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M. Current Topics in Developmental Biology, 110, 339-372, 2014. 査読有り, doi: 10.1016/B978-0-12-405943-6.00010-5

〔学会発表〕(計 9件)

ホメオボックス型転写因子MSX1による歯髄幹細胞分化制御、藤本勝巳、五藤紀子、河本健、能城光秀、宿南知佐、香西克之、加藤幸夫、第99回広島大学歯学会例会 併催 第54回広島県歯科医学会 併催 日本歯科技工学会中国・四国支部第10回学術大会、平成27年11月8日、「広島県歯科医師会館(広島県・広島市)」

MSX1 down-regulates the expression of cholesterol synthesis-related genes in dental pulp stem cells、五藤紀子、藤本勝巳、藤井紗貴子、依田浩子、大島勇人、河本健、能城光秀、宿南知佐、香西克之、加藤幸夫、第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会合同大会、平成27年12月2日、「神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)」

ホメオボックス型転写因子MSX1による歯髄幹細胞の象牙芽細胞/骨芽細胞分化の制御、五藤紀子、藤本勝巳、依田浩子、大島勇人、河本健、能城光秀、宿南知佐、香西克之、加藤幸夫、第15回運動器科学研究会、平成26年9月5日、「ベルサール三田(東京都・港区)」

ホメオボックス型転写因子MSX1による歯髄幹細胞の象牙芽細胞/骨芽細胞分化制御、五藤紀子、藤本勝巳、依田浩子、大島勇人、河本健、能城光秀、宿南知佐、香西克之、加藤幸夫、第87回日本生化学会大会、平成26年10月18日、「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

The improved performance of

mesenchymal stem cell cultures by fibronectin and mixed self-assembled monolayers under serum-free conditions. Veronica Sainik Ronald, Masami Kanawa, Isao Hirata, Koichi Kato, Katsumi Fujimoto, Chisa Shukunami, Yukio Kato、第53回広島県歯科医学会 併催 第98回広島大学歯学会例会 併催 日本歯科技工学会中国・四国支部第9回学術大会、平成26年11月9日、「広島県歯科医師会館(広島県・広島市)」

Genome-wide analysis of MSX1 target genes in stem cells from human exfoliated deciduous teeth、五藤紀子、藤本勝巳、藤井紗貴子、河本健、能城光秀、香西克之、加藤幸夫、第24回国際小児歯科学会、平成25年6月12日-13日、「ソウル(韓国)」

The identification of MSX1 target genes in stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)、五藤紀子、藤本勝巳、今村芹佳、藤井紗貴子、河本健、能城光秀、香西克之、加藤幸夫、第46回広島大学歯学会総会、平成25年6月29日、「広島大学(広島県・広島市)」

The functional role of MSX1 in stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)、5th Hiroshima Conference on Education and Science、五藤紀子、藤本勝巳、ロナルド ベロニカ、藤井紗貴子、今村芹佳、河本健、能城光秀、香西克之、加藤幸夫、平成25年10月12日-13日、「広島国際会議場(広島県・広島市)」

新規時計遺伝子 Chrono の統合的解析、郷力昭宏、畠中史幸、Jihwan Myung、寄高崇志、田ノ上信太郎、阿部高也、清成寛、藤本勝巳、加藤幸夫、松原昭郎、内匠透、第86回日本生化学会大会、平成25年9月11日、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 勝巳 (FUJIMOTO, Katsumi)
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40294566

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

五藤 紀子 (GOTO, Noriko)
広島大学・病院(歯)・歯科診療医
研究者番号：10735137