

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670869

研究課題名(和文) エクソソームによる新規上皮 間葉相互作用の概念とその応用

研究課題名(英文) Epithelial mesenchymal interaction mediated by exosomes in tooth development

研究代表者

岩本 勉 (IWAMOTO, Tsutomu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：90346916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 歯の発生過程は大きく分けて2種類の異なる起源の細胞である歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞が関わっている。この2種類の細胞による歯の構築過程は上皮-間葉の相互作用と呼ばれ、お互いで協調し合うことによって厳密な制御機構が働いていると考えられている。しかしながら、そのメカニズムについては不明な点が多い。われわれはバイオインフォマティカル解析を行い歯に特異的に発現する分子の同定を行っている。この度、エクソソームの主要構成成分であるテトラスペニンファミリーに属するCd9が歯の発生過程で強く発現していることを見出し、歯の発生過程でエクソソームが上皮-間葉相互作用の情報伝達に重要な役割があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The process of tooth development is involved in two kinds of cell types, dental epithelial cells and dental mesenchymal cells. Those cells interacted with each other, which is called epithelial-mesenchymal interactions. However, its mechanisms still unclear. Here we are trying to find the gene that regulate in this process. we found that Cd9, a major component of exosome, is highly expressed in tooth. It is suggested that Cd9 play a role in epithelial-mesenchymal interaction in tooth development.

研究分野：小児歯科学分野

キーワード：歯原性上皮細胞 エクソソーム Cd9

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の発見によって再生医療への国民の期待は加速度的に高まっており、歯科においても歯そのものを再生させる医療技術の開発に大きな関心が寄せられている。歯は口腔上皮細胞のある特定の領域の細胞が、歯原性細胞へと分化し、その発生が始まるが、この口腔上皮細胞から歯原性上皮細胞へと変わる分子制御学的機構については、ほとんど明らかにされていない。また、歯はその歯原性上皮細胞とそれに接して存在する歯原性間葉細胞との相互作用によって営まれるがその分子制御機構についても不明な点が多い。

CD9 は分子量 24kDa 単鎖糖タンパクで、テトラスパニンスーパーファミリーに属する。テトラスパニンは生体内に広く存在し、膜 4 回貫通型タンパク質で、生体内における機能解析は不明な点が多く存在しているが、テトラスパニンが他のタンパク質と会合して複合体を形成することによって、細胞間の接着やシグナル伝達、細胞の運動に関与しているとして注目されている。また近年は細胞間情報伝達物質として注目されているエクソソームの主要構成成分であることが知られるようになってきた。

われわれは、バイオインフォマティカル解析法を用いて、歯の発生過程に発現する遺伝子の網羅的解析と個別の分子の機能解析を行っている。その中で CD9 が有意に歯の発生過程で発現することを見出した。これまで歯の発生過程における CD9 をはじめとしたテトラスパニンファミリーの発現および役割は明らかにされていない。さらに近年、細胞が分化成熟していく過程において、細胞-細胞間の相互作用は不可欠であり、歯の発生過程も同様であり、とくに、歯の発生過程においては、上皮-間葉相互作用が重要とされている。これまでの細胞間のシグナル伝達機構としては、表面蛋白を介する経路や、サイトカイン、成長因子といった分泌蛋白を介した伝達機構が活発に研究されてきた。ところが、近年、マクロファージや樹状細胞などの免疫細胞や癌細胞をはじめ多くの細胞がエクソソームと呼ばれる脂質二重膜で囲まれた直径 30-100nm の小型膜小胞を放出し、遠く離れた細胞に対して情報伝達をしているとして注目されている。また、エクソソーム内には分泌細胞由来の蛋白や mRNA、micro RNA が存在することが明らかとなり、細胞間の遺伝情報伝達にも関与している可能性が示唆されている細胞間の情報伝達機構として、細胞から分泌される小型膜小胞のエクソソームが注目を浴びており、CD9 を始めとしたテトラスパニンファミリーは、エクソソームの主要構成成分として機能していることが報告されてきた。このような背景から、歯の発生過程においても、同様

にテトラスパニンファミリーおよびエクソソームが重要な役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、歯の発生過程におけるテトラスパニンファミリーの発現を明らかにし、さらにはエクソソームを利用した歯原性細胞分化機構の解明とこれを応用した分化誘導法の開発を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Expressed Sequence Tag (EST) database 解析: 各組織間における *Cd9* 遺伝子の発現量を比較する為に、EST の発現量を 100 万個の転写産物あたりの個数 (tpm; transcript per million) で分析を行う。

(2) マウスの各臓器におけるテトラスパニンファミリーの遺伝発現解析: 出生後 (P) 1 齢マウスより歯を含む各臓器 (肺, 腎臓, 肝臓, 脳) を摘出し, mRNA を抽出した。テトラスパニンファミリー (*Cd9*, *Cd81*, *Cd82*, *Cd151*, *Tspan82*) のそれぞれの特異的プライマーを用いて, RT-PCR 法にて発現解析を行う。

(3) 歯の発生段階における *Cd9* mRNA の発現解析: マウス歯胚発生過程における発現を明らかにするために, 胎生 (E) 13.5, 14.5, 15.5, 16.5, 17.5 日の各段階の歯胚を摘出し, mRNA を抽出し, RT-PCR 法にて *Cd9* 遺伝子の発現を解析する。

(4) 歯胚における *Cd9* の局在解析: 歯の発生過程における *Cd9* 蛋白の発現および局在を明らかにするために, 発生段階 (胎生 12.5 日, 14.5 日, P 1) のマウス胎児の歯胚切片を準備し, 免疫組織学的検討を行う。

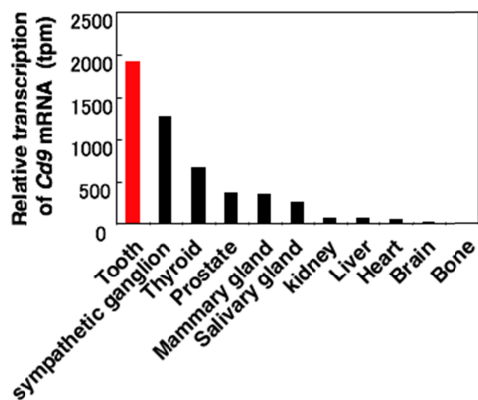
(5) 歯原性上皮細胞株における *Cd9* の発現解析: 歯原性上皮細胞の分化における *Cd9* の役割を明らかにするために, 歯原性上皮細胞 SF2 を用いた。SF2 細胞は, 神経栄養因子-4 (NT-4) で刺激することによって, 歯原性上皮細胞の分化マーカーのひとつであるアムロプラスチン (*Ambn*) を発現し, その分化が促進される。そこで, SF2 細胞を NT-4 の存在下で 48 時間培養した後に RNA を回収し, RT-PCR 法 (A) および Real time RT-PCR 法 (B) を用いて, テトラスパニンファミリー遺伝子の発現を解析する。

(6) エクソソームの抽出と解析: 歯原性上皮細胞株および歯原性間葉細胞株のそれぞれの細胞培養上清から, Total Exosome RNA and Protein Isolation kit または ExoQuick を用いてエクソソームの抽出, 精製を行う。発生段階の細胞および歯原性細胞より抽出した

エクソソームを構成するテトラスパニンの種類を解析し、同定する。

4. 研究成果

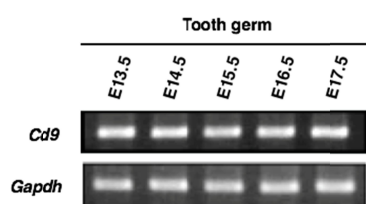
(1) Expressed Sequence Tag (EST) database 解析: 各組織間における *Cd9* 遺伝子の発現量を比較する為に、EST の発現量を 100 万個の転写産物あたりの個数 (tpm; transcript per million) で解析グラフ化した。その結果、



他の組織に比べ発生段階にある歯胚において、*Cd9* が非常に多く転写され発現していることが明らかとなった。

(2) マウスの各臓器におけるテトラスパニンファミリーの遺伝発現解析: P1 歯胚において、*Cd9*, *Cd81*, *Cd82*, *Cd151*, *Tspan82* が発現していることがわかった。特に *Cd9* は、歯胚で非常に強く発現していることが明らかになった。

(3) 歯の発生段階における *Cd9* mRNA の発現解析: 歯の発生段階における E13.5 から E17.5 までのいずれの時期の歯胚において *Cd9* 遺伝子が発現していることが明らかとなった。

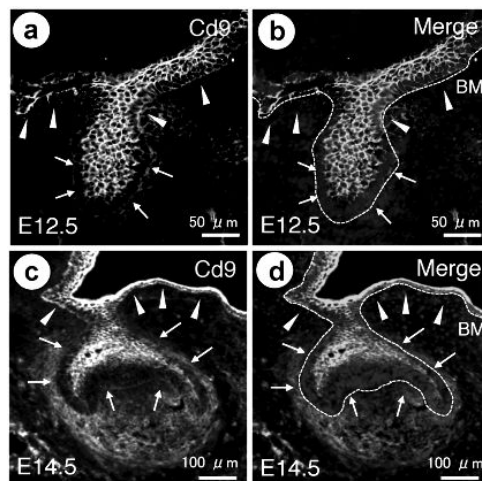


内部標準コントロールとして、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (*Gapdh*) を用いた。

(4) 歯胚における *Cd9* の局在解析: 胎生 (E) 12.5 日齢歯胚 (a, b) は、口腔上皮から分化した歯原性上皮細胞が間葉組織に向かって、浸潤を開始する時期である (蕾状期)。このとき *Cd9* は口腔上皮および歯堤の内部に強く発現が見られるが、基底層の細胞で、口腔上皮に発現していた *Cd9* (a, 矢頭) が歯胚の基底層の歯原性上皮細胞で消失しているのが観察された (a, 矢印)。E14.5 日齢歯胚 (帽状期, c, d) では、口腔上皮から歯堤内部で *Cd9* が見られる。一方で、明らかに外エナメ

ル上皮およびエナメル芽細胞へと分化する内エナメル上皮で、その発現が消失した (d, 矢印)。

口腔上皮と歯胚が間葉組織に陥入している部位を観察すると、明らかに基底層の細胞の



歯原性上皮において、*Cd9* の発現が消失していた。

出生後 (P) 1 日齢歯胚では、内エナメル上皮細胞はエナメル芽細胞へと分化し、エナメルマトリックス蛋白のひとつであるアメロプラスチン (*Ambn*) を分泌する。この分化したエナメル芽細胞では *Cd9* の発現は、観察されなかった。

一方で、分化した象牙芽細胞ではその発現が観察された。この時、外エナメル上皮と内エナメル上皮が会合する cervical loop の部位を観察すると、歯原性上皮においては、中間層の細胞で *Cd9* の発現がみられるが、外エナメル上皮細胞および内エナメル上皮細胞では、*Cd9* の発現はみられなかった。

(5) 歯原性上皮細胞株における *Cd9* の発現解析: SF2 細胞を NT-4 の存在下で 48 時間培養した後に RNA を回収し、テトラスパニンファミリー遺伝子の発現を解析したところ、*Cd81*, *Cd82*, *Cd151* は NT-4 の刺激によってその発現が増加したが、逆に *Cd9* は減少した。*Tspan82* は有意な変化を認めなかった。

(6) エクソソームの抽出と解析: 培養細胞株の培養上清から抽出を試みた。細胞培養数、抽出時間、様々な条件を変えて抽出を試み Real time PCR 法ならびに western blotting 法で確認をしたが、純粋なエクソソームの精製には至っていない。現在は超遠心法を用いて精製を試みている。

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 5 件)

Akazawa Y, Hasegawa T, Yoshimura Y, Chosa N, Asakawa T, Ueda K, Sugimoto

A, Kitamura T, Nakagawa H, Iwamoto T.,
Recruitment of mesenchymal stem cells
by stromal cell-derived factor 1 in
pulp cells from deciduous teeth.
International Journal of Molecular
Medicine. 36(2):442-448, 2015 査読
有
DOI: 10.3892/ijmm.2015.2247.

Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Yuasa
K, Yoshizaki K, Iwamoto T., Saito M,
Nakamura T, Fukumoto S., Interaction
between Fibronectin and α 1 Integrin
Is Essential for Tooth Development.
PLoS One, 10(4) e0121667. 2015 査読
有
DOI: 10.1371/journal.pone.0121667.
eCollection

Hasegawa T, Akazawa Y, Kitamura T,
Sugimoto A, Ueda K, Iwamoto T., Dental
findings and management in a child
with hypomelanosis of Ito. PEDIATRIC
DENTAL JOURNAL, 24(3):173-177, 2014
査読有
DOI:10.1016/j.pdj.

Ishikawa M, Iwamoto T., Fukumoto S,
Yamada Y., Pannexin 3 inhibits
proliferation of osteoprogenitor
cells by regulating Wnt and p21
signaling. J Biol Chem.
289(5):2839-2851. 2014 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.523241.

Hashimura T, Yamada A, Iwamoto T.,
Arakaki M, Saito K, Fukumoto S.,
Application of a tooth-surface
coating material to teeth with
discolored crowns., PEDIATRIC DENTAL
JOURNAL, 23(1):44-50, 2013 査読有
DOI:10.1016/j.pdj.

〔学会発表〕(計2件)

赤澤 友基, 長谷川 智一, 岩本 勉, 象
牙質修復に関わる間葉系幹細胞の乳歯
歯髄細胞由来 SDF-1 による制御, 第
53 回日本小児歯科学会大会, 広島国際
会議場, 2015.5.21.(広島県・広島市)

長谷川 智一, 赤澤 友基, 吉村 善隆,
帖佐 直幸, 浅川 剛吉, 杉本 明日菜,
北村 尚正, 上田(山口) 公子, 中川 弘,
白石 真紀, 石崎 明, 岩本 勉, 乳歯歯
根膜由来細胞の SDF-1 を介した歯周
組織恒常性に関わる細胞間相互作用,
第 53 回日本小児歯科学会大会, 広島国
際会議場, 2015.5.21.(広島県・広島
市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩本 勉 (IWAMOTO, Tsutomu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号 : 90346916