

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862032

研究課題名(和文) 歯小嚢特異的発現遺伝子F-spondinの機能解析による歯周組織再生療法への展望

研究課題名(英文) Function analysis of F-spondin during periodontal ligament development

研究代表者

本間 宏実 (Homma, Hiromi)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80637760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 歯小嚢特異的発現遺伝子の機能を検討することで、歯小嚢から歯周組織が形成される分子メカニズムの解明を試みた。本研究結果より、鐘状期の歯小嚢に強く発現するF-spondinはTGF- β シグナルを阻害することにより歯根膜細胞分化を抑制し、歯根膜細胞を未分化な状態に保持させることが示唆された。一方、歯根膜の成熟が必要となる部位・時期にはF-spondinの発現は低下し、歯根膜細胞の分化を進めると推測される。F-spondinがTGF- β シグナルを抑制する分子メカニズムは、TGF- β との直接結合による作用と細胞膜タンパク質との結合により活性化される細胞内シグナルを介した間接的作用の二つが考えられる。

研究成果の概要(英文)： In order to elucidate the molecular mechanisms that form the periodontal tissue originated from the dental follicle, the functional analysis of genes specifically expressed in the dental follicle was performed. It was shown that F-spondin was strongly expressed in the dental follicle of the bell stage and suppressed the differentiation of dental mesenchymal cells by inhibiting the TGF- β signaling. As a result, dental mesenchymal cells remained to be an undifferentiated state. When the expression level of the F-spondin was reduced in late stage of tooth development, the maturation of periodontal ligament was observed. There seemed to be two ways that suppressed TGF- β signaling by F-spondin; first, the direct binding between TGF- β and F-spondin; second, the function of activated intracellular signaling pathway by binding between F-spondin and a cell membrane protein.

研究分野：小児歯科

キーワード：歯根膜 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

歯は人体の中でもっとも硬い組織という特徴を有しており、咀嚼機能を担う消化器官として咀嚼刺激の中樞への伝達と活性化など、ヒトが健全な口腔機能を発揮する上で様々な役割を担っている。したがって、齲蝕や歯周病を原因とする歯や歯周組織の喪失は口腔機能に大きな障害をもたらす。さらに近年、口腔の疾患が全身疾患に対しても悪影響を及ぼすことが示されている (J Dent Res, 88:519, Odontology, 94:10, J Clin Periodontol, 32:174, J Vasc Surg, 42:107, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 95:559)。歯および歯周組織の喪失は不可逆性であり、失われた口腔機能を回復するためには歯と歯周組織を取り戻す必要がある。そのための一つの手段として、歯および歯周組織の発生・形成機構を基盤とする組織再生療法の実現が強く求められる。一方、無歯期から永久歯列期までの小児を対象とする小児歯科臨床においても、エナメル質形成不全症をはじめとする歯の形成障害を呈する小児患者にしばしば遭遇し、これらの小児も成人と同様の口腔機能不全を示す (J Dent Res, 84:1117, J Oral Pathol, 17:547)。したがって小児歯科臨床においても、適切な診断と治療を行うためには、歯や歯周組織の発生メカニズムの詳細を明らかにし、理解、応用することが要求される。

乳歯および永久歯は胎生期の外胚葉および中胚葉から発生し、その発生の初期過程は上皮-間葉相互作用により誘導されることが知られている (J Craniofac Genet Dev Biol, 11:229, Differentiation, 20:1, Dev Biol, 23:276)。歯の発生は、口腔上皮肥厚に始まり、肥厚した上皮直下へ頭部神経堤由来外胚葉性間葉系細胞が遊走し、蕾状期歯胚が形成される。蕾状期の歯胚では、歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞が形成され、帽状期へと移行していく。帽状期から鐘状期においては、歯原性上皮細胞は内・外エナメル上皮細胞、中間層細胞およびエナメル髓細胞へ、歯原性間葉細胞は歯乳頭細胞および歯小囊細胞へと分化する。そして、前期鐘状期において、歯乳頭細胞は象牙芽細胞へ、内エナメル上皮はエナメル芽細胞へと分化し歯冠形成を進める。

これら一連の歯の発生過程はさまざまな因子により制御されていることが示されているが、中でも蕾状期から帽状期歯胚までの初期発生過程を制御する因子については精力的に研究が進められている。たとえば、帽状期歯胚におけるソニックヘッジホッグ (Sonic Hedgehog; SHH)、骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein; BMP) および線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor; FGF) などの関与が明らかにされている (Dev Dyn, 219:322, Nat Genet, 24:391, Genes Dev, 13:3136, Development, 125:2803, Dev Dyn, 210:383, Dev Dyn,

206:59, Int J Dev Biol, 38:463)。これらの分子は帽状期歯胚において上皮組織内で形成されるエナメルノット内で発現し、エナメルノット直下の歯乳頭細胞へ刺激を伝え、鐘状期歯胚での二次エナメルノットの形成とそれに続く歯冠形成を誘導する。このように、歯冠形成を制御する分子機構については理解が深まりつつある。これに対して、歯根形成過程、すなわち歯根膜を含む歯周組織の発生機構については未だ不明な点が多く残されている。

歯周組織は帽状期および鐘状期の歯胚外周に形成される歯小囊をその発生起源とする (Development, 127:1671, J Periodontal Res, 29:81)。したがって、歯胚発生期における歯小囊細胞からこれらの歯周組織構成細胞への分化および成熟の制御機構を明らかにすることは、歯小囊細胞から歯周組織構成細胞への分化を誘導できる分子や細胞外マトリックスを用いた人為的な歯周組織再構築の可能性を生み出し、歯周組織再生療法の開発につながると期待される。

2. 研究の目的

歯根形成期歯胚において、歯小囊細胞は上皮-間葉相互作用により、骨芽細胞、歯根膜細胞およびセメント芽細胞へと分化し、歯周組織を形成していくと考えられている。これまでに、歯根膜形成の起点となる歯小囊の生物学的分子基盤を明らかにするために、抜去智歯より採取したヒト歯根膜組織を用いて歯根膜発現遺伝子データベースを構築し、機能的クラスタリングと *In Situ Hybridization* 法によるスクリーニングを行った結果、歯小囊特異的発現遺伝子として F-spondin を見出すことに成功している。本研究においては、歯小囊特異的に発現する F-spondin の機能的役割を詳細に解析することにより、歯小囊から歯周組織が形成される分子メカニズムを明らかにする。

これまでに、歯根膜形成の起点となる歯小囊の生物学的分子基盤を明らかにするために、抜去智歯より採取したヒト歯根膜組織を用いて歯根膜発現遺伝子データベース (ペリオームデータベース) を構築し、機能的クラスタリングと *In Situ Hybridization* 法によるスクリーニングを行った結果、歯小囊特異的発現遺伝子として F-spondin を同定している (Gene, 404:70)。F-spondin は帽状期の歯小囊で発現が始まり、鐘状期、後期鐘状期への分化に伴い歯小囊特異的にその発現が増強するが、歯根膜の形成に伴って発現が低下し、生後 35 日齢の成熟した歯根膜においては発現が消失する。これらの結果は、歯小囊から歯根膜への分化・成熟過程において F-spondin が何らかの役割を演じている可能性を強く示唆する。F-spondin は、1992 年に Klar らによって、神経細胞の接着と伸展に関与する因子としてクローニングされ、トロンプスポンジンスーパーファミリーに属する

細胞外マトリックスで (Cell, 69:95), 血管内皮細胞の遊走や (J Cell Physiol, 188:394), 神経細胞分化に關与することが報告されているが (J Cell Biol, 178:1237, J Neurochem, 96:444, Neuron, 23:233, Neuron, 22:475), 齒根膜形成過程におけるその役割は全く不明である。

本研究においては, 齒根膜形成過程における齒小嚢特異的発現遺伝子 F-spondin の機能的役割を検討することにより, 齒小嚢から齒周組織が形成される分子メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

本研究では, 申請者らのグループにおいて単離・培養法を確立した, 齒根膜細胞への分化能を有する初代培養齒原性間葉系細胞 (DMC) を用いて F-spondin の機能解析を行い, 齒根膜をはじめとした齒周組織形成メカニズムの解析を行った。F-spondin は齒胚形成において帽状期, 鐘状期の限られた期間に発現が認められるが, 過去の文献において F-spondin の発現を制御する可能性のある因子を用い, それらの存在下で齒根膜関連遺伝子の発現変化を検討するほか, F-spondin 発現シグナル経路の解析を行った。齒根膜関連遺伝子・齒胚形成遺伝子の発現変化は, これまでの研究で樹立した F-spondin 発現アデノウイルスも利用して行った。さらに F-spondin の発現制御をおこなうことで, 齒根膜細胞への分化をどの程度制御できるかの検討を行った。

1) 初代培養齒原性間葉系細胞 (DMC) の分離・培養

胎生 14.5 日齡の ICR マウスより下顎臼齒齒胚を実体顕微鏡下において注射針を装着したツベルクリン用シリンジを用いて外科的に採取し, 摘出した齒胚は HEPES および 10%FBS を含む DMEM 培地で満たした 35 ペトリディッシュ中にて氷上保存した。全齒胚を摘出した後, ディスパーゼにて室温で処理する。その後, DNase を添加し, 齒胚が粘稠性を伴い一塊となった全齒胚が個々になるまで室温で処理した。その後再び実体顕微鏡下にて注射針を装着したシリンジを用いて齒原性上皮と齒原性間葉組織とを分離した。分離した齒原性間葉組織を間遠心し, トリプシンおよびコラゲナーゼ中で処理した。酵素処理後, DNase 処理を行った後, DMC を分離した。

分離した DMC は, 細胞培養プレートに播種し, 培養して実験に供した。

2) TGF- β シグナルに対する作用の検討

はじめに TGF- β による齒根膜細胞分化誘導に対する F-spondin の効果を検討した。DMC, マウス由来齒根膜細胞株 MPDL22, および C3H10T1/2 細胞を TGF- β 1 で刺激して培養した後, 齒根膜関連遺伝子であるペリ

オスチン, テネイシン N および 型コラーゲンの発現を, 特異的プライマーを用いて定量的 PCR 法により検討した。さらに, DMC, マウス由来齒根膜細胞株 MPDL22, および未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞に対して, F-spondin の遺伝子導入を行い, TGF- β 1 で刺激して培養した後, 前述と同様に, 齒根膜関連遺伝子の発現を, 特異的プライマーを用いて定量的 PCR 法により検討した。

次に, F-spondin の効果が TGF- β シグナルに關与しているものか否かを検討する目的で, TGF- β シグナルの伝達分子である Smad3 のリン酸化に対する F-spondin の効果を調べた。DMC を用いて TGF- β 刺激が Smad3 のリン酸化を著明に誘導するか, またその発現部位は核内に限局しているか否かを, 蛍光細胞免疫染色により検討し, 共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 を用いて観察した。さらに, TGF- β 誘導性 Smad シグナル活性化に対する F-spondin の効果をウェスタンブロットング法により検討した。

3) TGF- β シグナルに対する転写レベルでの作用の検討

最後に, TGF- β シグナルに対する F-spondin の転写レベルでの効果を, Smad 結合配列を用いたレポーターアッセイにおいて検討した。目的遺伝子を組み込んだプラスミドと Fugene6 溶液を反応させて, DNA-リポソーム複合体の形成後, 細胞培養液中に DNA-リポソーム複合体を直接添加することによって一過性に遺伝子導入を行った。さらに, Smad 結合配列および TGF- β 型受容体 ALK5 の恒常的活性型変異受容体である ALK5 T204D を, 培養細胞に一過性に遺伝子導入することにより誘導される Smad シグナルの活性化に関しても検討した。

4) F-spondin の発現制御の検討

F-spondin の発現に影響を及ぼす因子を明らかにするために, DMC を用いて齒胚形成に關与する Wnt3a, Ihh および TGF- β 1 刺激を行い, F-spondin の発現の変化をリアルタイム PCR 法により検討した。齒胚形成に關与する因子は数多く知られているが, その中で特に注目されている Wnt3a (Bone, 44:805), Ihh (Development, 124:113), そして TGF- β が F-spondin 発現に及ぼす効果を調べた。

4. 研究成果

齒根膜形成過程に対する F-spondin の關与を検討したところ, F-spondin は胎生期齒胚に高発現し, 鐘状期までは齒胚の成長に伴って発現が増加することが示された。

齒根膜細胞への分化能を有する初代培養齒原性間葉系細胞 (DMC) の単離・培養を行い, DMC に F-spondin を過剰発現させ, 齒根膜細胞分化マーカー遺伝子発現に対する効果を, リアルタイム PCR 法により検討し

た。F-spondin の過剰発現はウェスタンブロットティング法により確認した。F-spondin の過剰発現は、歯根膜細胞の分化マーカーであるペリオスチン、テネイシン N および Ⅱ型コラーゲンの遺伝子発現量を有意に減少させた。次に、shRNA による F-spondin 遺伝子ノックダウンにより歯根膜細胞分化マーカー遺伝子発現に対する F-spondin の効果を検討した。F-spondin 遺伝子のノックダウン効果は、リアルタイム PCR 法により確認した。DMC における F-spondin の発現抑制は、ペリオスチン、テネイシン N および Ⅱ型コラーゲンの遺伝子発現量を有意に増加させた。以上の結果より、F-spondin は歯根膜細胞分化に対して抑制的に作用すると考えられた。

まず、はじめに、TGF- β による歯根膜細胞分化誘導に対する F-spondin の効果を、DMC を用いて検討したところ、ペリオスチン、テネイシン N および Ⅱ型コラーゲンの発現が有意に増加した。一方、F-spondin の過剰発現は TGF- β 刺激により誘導されるペリオスチン、テネイシン N および Ⅱ型コラーゲンの発現を抑制した。同様の結果は、マウス由来歯根膜細胞株 MPDL22 においても認められた。これらの結果は、F-spondin は TGF- β の作用を阻害することにより、歯根膜細胞分化を負に制御することを示唆する。

次に、F-spondin の効果が TGF- β シグナルの抑制によるものか否かを検討する目的で、TGF- β シグナルの伝達分子である Smad3 のリン酸化に対する F-spondin の効果を調べた。蛍光細胞免疫染色により、DMC において TGF- β 刺激は Smad3 のリン酸化を著明に誘導し、またその発現部位は核内に限局したことから、TGF- β は DMC において Smad シグナル経路を活性化することが明らかとなった。TGF- β 誘導性 Smad シグナル活性化に対する F-spondin の効果をウェスタンブロットティング法により検討したところ、F-spondin の過剰発現は TGF- β によって誘導される Smad3 のリン酸化を阻害することが明らかとなった。したがって F-spondin は TGF- β シグナルの活性化を抑制することにより、歯根膜細胞分化を負に制御すると考えられる。

次に、TGF- β シグナルに対する F-spondin の転写レベルでの効果を未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞を用いて検討した。DMC と同様に、C3H10T1/2 細胞においても F-spondin の過剰発現は TGF- β による Smad3 のリン酸化を抑制した。また、Smad 結合配列を用いたレポーターアッセイにおいて、F-spondin は TGF- β 刺激による Smad シグナルの活性化を有意に阻害した。さらに、F-spondin は TGF- β 型受容体 ALK5 の恒常的活性型変異受容体である ALK5 T204D 導入により誘導される Smad シグナルの活性化に対しても抑制的に作用することが明らかとなった。これらの結果より、F-spondin

は TGF- β により誘導される Smad シグナル活性化を抑制することが明らかとなった。

最後に、本研究により歯根膜細胞分化を負に制御することが明らかとなった F-spondin の発現に影響を及ぼす因子を検討した。歯胚形成に関与する因子は数多く知られているが、その中で特に注目されている、Wnt3a、Ihh、そして TGF- β が F-spondin 発現に及ぼす効果を調べた。それらの結果、DMC における F-spondin の発現は、Wnt3a および Ihh によって明らかな影響を受けなかった。

一方、興味深いことに、F-spondin によって歯根膜細胞分化促進作用が阻害される TGF- β は DMC における F-spondin の発現を有意に減少させた。したがって、TGF- β は Smad シグナル活性化を抑制する F-spondin の発現を抑制することによりその阻害効果を消失させ、歯根膜細胞分化を促進すると推測される。

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1件)

- 1) T. Yonekura, H. Homma, A. Sakurai, M. Moriguchi, Y. Miake, S. Toyosawa, S. Shintani. Identification, characterization, and expression of dentin matrix protein 1 gene in *Xenopus laevis*. Journal of Experimental Zoology B Molecular Development Evolution. 320(8):525-537, 2013. 査読有。

[学会発表](計15件)

- 1) 永井宜子, 桜井敦朗, 本間宏実, 新井敬, 新谷誠康. 小児の有する成熟歯面バイオフィルム構成細菌種の解析. 第30回日本小児歯科学会関東地方会. 2015年9月13日. 東京. **招待講演**.
- 2) H. Homma, M. Miyashima, N. Nagai, A. Tashiro, A. Sakurai, S. Shintani. Prevalence and characteristics of supernumerary teeth in Japanese children and the influences on permanent dentition. The International Association of Paediatric Dentistry (IAPD) 2015, 2015年7月3日. Glasgow, Scotland.
- 3) N. Nagai, A. Sakurai, H. Homma, K. Tanaka, S. Shintani. Oral microbiome analysis in children with colored dental biofilms. The International Association of Paediatric Dentistry (IAPD) 2015, 2015年7月4日. Glasgow, Scotland.
- 4) H. Homma, A. Sakurai, T. Yonekura, S. Shintani. Dental treatment and oral health care of an abused and neglected child over a lengthy period: A case report. 9th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia (PDAA)

- 2014 . 2014 年 8 月 23 日 . Singapore .
- 5) N.Nagai, A. Sakurai, H. Homma, K. Tanaka, S. Shintani. Bacterial community of “mature” dental biofilm in children. 9th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia (PDAA) 2014 . 2014 年 8 月 24 日 . Singapore .
 - 6) 永井宜子, 桜井敦朗, 本間宏実, 田中公子, 新谷誠康. 小児の有色歯面プラークに含まれる細菌種と齲蝕経験歯数の相関. 第 297 回東京歯科大学学会, 2014 年 6 月 7 日 . 東京 .
 - 7) 宮島美樹, 桜井敦朗, 本間宏実, 川上響子, 永井宜子, 田代紋子, 大澤枝里, 新居由紀, 江木勝彦, 中内彩乃, 米倉智子, 田中公子, 熊澤海道, 今井裕樹, 辻野啓一郎, 米津卓郎, 新谷誠康. 当科通院患者における上顎正中過剰歯の発生率と永久歯列への影響度に関する検討. 第 52 回日本小児歯科学会, 2014 年 5 月 16 日 . 東京 .
 - 8) 永井宜子, 桜井敦朗, 本間宏実, 田中公子, 新谷誠康. 小児の有する成熟歯面バイオフィルム構成細菌種の解析. 第 52 回日本小児歯科学会, 2014 年 5 月 15 日 . 東京 .
 - 9) 本間宏実. 小児口腔の乳酸桿菌属細菌を中心とした口腔内細菌の構成と齲蝕発生への影響. 第 28 回日本小児歯科学会関東地方会. 2013 年 10 月 27 日 . 横須賀 . **招待講演**.
 - 10) 田代紋子, 桜井敦朗, 今井裕樹, 永井宜子, 大澤枝里, 川上響子, 宮島美樹, 新居由紀, 中内彩乃, 江木勝彦, 米倉智子, 石岡みずき, 本間宏実, 荒野泰子, 熊澤海道, 山下治人, 泉水祥江, 米津卓郎, 新谷誠康. わが国における切歯・第一大臼歯に局限したエナメル質形成不全 (MIH) の実態. 第 296 回東京歯科大学学会総会, 2013 年 10 月 19-20 日 . 東京 .
 - 11) 戸坂清二, 永井宜子, 桜井敦朗, 阪柳敏春, 菊田高行, 丸山清孝, 桜井真理, 峯岸忠, 西尾智見, 野田幸枝, 篠塚 修, 小長谷光, 神野成治, 深山治久, 鈴木 朋, 本間宏実, 今井裕樹, 松浦信幸, 一戸達也, 新谷誠康. 障害者歯科診療所を受診する患者および付添者による診療アウトカム評価-新旧 2 診療所の利用者満足度の比較- 第 30 回日本障害者歯科学会, 2013 年 10 月 12-13 日 . 神戸 .
 - 12) 米倉智子, 本間宏実, 森口美津子, 見明康雄, 豊澤悟, 新谷誠康. 両生類 *Xenopus laevis* における DMP1 遺伝子の同定および発現解析. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 20-22 日 . 岡山 .
 - 13) 米倉智子, 本間宏実, 桜井敦朗, 新谷誠康. 両生類 *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル) における DMP1 遺伝子の同定および発現解析. 第 51 回日本小児歯科学会, 2013 年 5 月 24 日 . 岐阜 .
 - 14) 本間宏実, 今井裕樹, 桜井敦朗, 中内彩乃, 江木勝彦, 新居由紀, 米倉智子, 石岡みずき, 児島泰子, 熊澤海道, 山下治人,

泉水祥江, 米津卓郎, 杉山精一, 新谷誠康 . わが国における Molar Incisor Hypomineralization (MIH) の実態調査 . 第二報 MIH 発症に影響を与える要因の解析. 第 51 回日本小児歯科学会, 2013 年 5 月 23 日 . 岐阜 .

- 15) 新居由紀, 桜井敦朗, 今井裕樹, 中内彩乃, 江木勝彦, 米倉智子, 石岡みずき, 本間宏実, 児島泰子, 熊澤海道, 山下治人, 泉水祥江, 米津卓郎, 杉山精一, 新谷誠康 . わが国における Molar Incisor Hypomineralization (MIH) の実態調査 . 第一報 MIH の発症頻度と重症度について . 第 51 回日本小児歯科学会, 2013 年 5 月 23 日 . 岐阜 .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

本間 宏実 (HOMMA, Hiromi)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号 : 80637760