

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293433

研究課題名(和文) 歯および唾液腺の形態形成に関わる分子基盤の同定とその制御法の開発

研究課題名(英文) Regulation and analysis of tooth and salivary gland morphogenesis

研究代表者

福本 恵美子 (FUKUMOTO, EMIKO)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：10264251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯や唾液腺の再生には、器官の形態形成に関わる遺伝子や分子の同定が重要である。しかし、どのような分子制御のより形態形成を行われるかは明らかでない。我々はマイクロアレーを用いた遺伝子スクリーニングにより、形態形成に関わる分子の同定を行った。Hippo関連分子であるMst1が、歯に特異的に発現し、その過剰発現により細胞増殖が抑制され、siRNAによる発現抑制で細胞増殖が亢進した。さらにMst1の下流分子のMobの欠損マウスが大きな歯を呈した。さらにNF- κ B経路のNIKおよびp50が歯の横幅決定に、GDF5がエナメル質形成に関与することを見出した。これらの知見は歯の再生技術の開発に重要である。

研究成果の概要(英文)：To regenerate of tooth and salivary gland, it is important to identify the gene associated with the regulation of morphogenesis. However, it has never clearly understood the morphogenesis of tooth and salivary gland. Here, we identified the genes specifically expressed in tooth germ using microarray gene screening.

Mst1 is one of the Hippo pathway molecule expressed in embryonic tooth germ. Over expression of Mst1 in dental epithelial cells showed inhibition of proliferation. On the other hand, suppression of Mst1 expression using siRNA showed enhanced proliferation. Further, knockdown of Mob1 in mice, which is down stream molecule of Mst1, showed enhanced tooth size. Moreover, we identified the regulation of tooth width by NF- κ B signaling molecule, NIK and p50. Further, GDF5 down-regulated enamel formation. These information is useful for establish the regeneration of tooth and salivary gland.

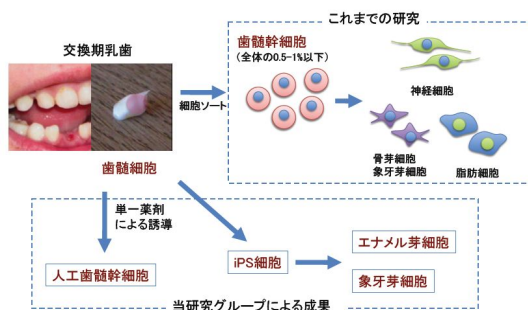
研究分野：小児歯科

キーワード：歯の発生 形態形成 唾液腺 再生

1. 研究開始当初の背景

歯や唾液腺の再生に関しては、歯の発生初期段階のマウス歯胚から調整した上皮細胞、間葉細胞をコラーゲンゲル中で一定の細胞数を再構築し、マウスの腎臓の被膜下で一定期間培養をおこなうことで、人工歯胚の作成が可能となった。この人工歯胚は、顎骨内に移植することで、自然に萌出し咬合するようになる。このように、動物モデルを用いたものは一部可能になってきているが、適正な形態を有した組織の構築には至っていない。また、使用する細胞も、胎児由来細胞を利用しているため、倫理的問題も回避できていないのが現状である。

再生医療に使用する細胞ソースとしては、乳歯由来の歯髄細胞からの間葉系幹細胞の抽出や、歯髄細胞から iPS 細胞の作成、さらに iPS 細胞からエナメル質の形成に関わるエナメル芽細胞の人工誘導などの技術開発に成功した(下図)。したがって、細胞ソースに関する倫理的問題に関しては、永久歯との交換で自然脱落する乳歯を用いることで解決することができる。一方、歯の形態形成機構に関しては、人工的に器官構築した歯に関しては、通常のはよりも小さな矮小歯を呈し、さらに歯の咬頭などの形態的な特徴も不明瞭である。そこで、歯の形態形成に関しては、歯の前後的な大きさ(近遠心径)および横幅(頬舌径)の決定について、その分子機構を明らかにすることで、歯に特徴的な形態形成を制御することが可能になると考えた。



2. 研究の目的

歯の形態形成機構を明らかにする為には、歯胚の形成過程において特異的に発現する分子群の同定と、これら分子が本当に歯の形態形成に重要な役割を演じているかどうか確認する必要がある。また、同定した分子の発現や機能を制御することで、真に歯の形態形成を可能にするかどうかを確認する実験系の構築も必須であると考えられる。

(1) 歯胚発生段階での包括的な遺伝子同定

歯胚発生過程における歯特異的な遺伝子の同定をすることで、歯胚の形態形成に重要な因子の同定が可能と考えた。しかしながら、歯に特徴的に発現する遺伝子においても、全てが形態形成に関わる遺伝子であるわけ

はなく、同定した遺伝子が、例えば歯に特徴的なエナメル質を形成させる細胞に分化を誘導する因子であり、形態形成には関与しない遺伝子であることも否定できない。そこで、歯胚発生過程に特異的に発現する遺伝子において、ヒト疾患において歯の形態以上に関連する遺伝子かどうかについても、ヒト疾患データベースとの併用により目的遺伝子の同定を行う。特に、外胚葉異形成症に関しては、歯の先天欠如あるいは矮小歯を呈することから、本疾患および関連疾患に関連した遺伝子においては、特に歯胚発生段階で発現変化の認められるものについて着目し検討を行う。

(2) 同定遺伝子の歯胚発生での機能解明

上記の包括的な遺伝子スクリーニングにおいて同定された遺伝子に関しては、歯胚のどの部分に発現しているのか(上皮細胞側か、あるいは間葉細胞側か)を明らかにする為、免疫組織学的な検討を行うことで、同定遺伝子の歯の形態形成に及ぼす影響を推察する。特に歯胚形成に関しては、マウスにおいて胎生11-13日までが、歯胚自体が形成されるかどうかに関わる時期であり(この時期に異常を生じれば、歯胚自体が欠損する)、胎生14-17日が歯胚の大きさや咬頭形成に関わる時期、さらに胎生18日以降は、エナメル質および象牙質形成に関わる時期であることから、これら発生段階における特異的な発現の有無について検討することで、候補遺伝子のスクリーニングが可能と考えられる。

またスクリーニングによって得られた遺伝子が、歯胚細胞の増殖や分化に関与するかどうかについては、歯胚由来細胞株に遺伝子導入を行い、その遺伝子導入による細胞の表現系変化について検討を行う。

(3) 同定遺伝子の器官構築への影響に関する評価

最終的な本研究の目的は、歯や唾液腺などの口腔組織の器官構築を目指すものであるため、上記の実験でえられた候補分子に関して、歯胚器官培養系での遺伝子過剰発現および抑制をもちいて歯胚の形態形成に及ぼす影響を検討する。しかしながら、歯胚形成を評価する為の器官培養に関しては、7-10日の期間を要するが、唾液腺器官培養系を用いると、2日で同様の評価が可能となる。歯と唾液腺においては、器官形成において類似の分子群が作用していることが多いため、まず短期間で実施可能な唾液腺の器官培養系を用いて、候補分子の器官形態形成に及ぼす影響をスクリーニングし、その後、歯胚器官培養を用いて歯への影響に関して検討を行う。これらの研究成果により、歯胚および唾液腺の形態形成をコントロールするために必要な培養技術を確立することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

歯胚発生過程における包括的な遺伝子スクリーニングについては、胎生 11-出生後 7 日における歯胚由来 mRNA を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現を明らかにする。これらのデータを用いた候補分子の同定に関しては、Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いたクラスター解析を行い、他の組織と比較して歯に特異的に発現し、かつ歯の形態形成に重要と考えられる遺伝子群の同定を行う。また、候補遺伝子が真に形態形成に寄与するかどうかを明らかにする目的で、NCBI データベースの 1 つである OMIM を用いて、ヒト遺伝性疾患の中でも歯の形態形成に影響を及ぼす疾患である外胚葉異形成症関連分子群と細胞内シグナルが共通する遺伝子に着目し解析を進める。外胚葉異形成症は主に、EDA およびその受容体である EDAR 遺伝子の変異により生じることが知られているため、これら分子と相互作用を示し、かつ歯胚に特異的に発現する分子を解析候補とする。

上記の遺伝子スクリーニングで分子に関しては、すでにその分子を認識する抗体が存在する場合には免疫組織学的に、抗体が存在しない場合においては、in situ hybridization 法を用いて、組織内の発現局在を時空間的に検討する。また、全ての候補分子に関しては、マイクロアレイによる解析を確認する目的で、胎生 11-出生後 7 日の mRNA サンプルを用いて、各候補遺伝子の発現量を目的とした real-time PCR を実施する。今回のスクリーニングにおいては、歯の大きさや咬頭形成に関連した分子をスクリーニングすることが目的であるため、特に胎生 14-17 日の歯胚において特徴的な発現パターンを示す遺伝子群を、今後の解析候補として絞り込みを行う。

候補分子の歯胚由来細胞における細胞増殖および分化の評価に関しては、候補分子の真核細胞発現ベクターを構築し、これらプラスミドベクターを、ラット由来歯原性上皮細胞株 SF⁺細胞およびマウス由来歯原性間葉細胞株 mDP 細胞にそれぞれ遺伝子導入を行い、細胞増殖に関しては MTT 法や細胞数カウント、さらには BrdU の取り込み能による細胞増殖への影響を検討する。細胞分化に関しては、エナメル芽細胞分化に関しては、遺伝子導入後のアメロブラスチン、アメロジェニン、エナメルリン、アメロチン等の遺伝子発現について、象牙芽細胞分化に関しては、DSPP および DMP1 等の発現に関して、RT-PCR 法をもちいて評価を行う。

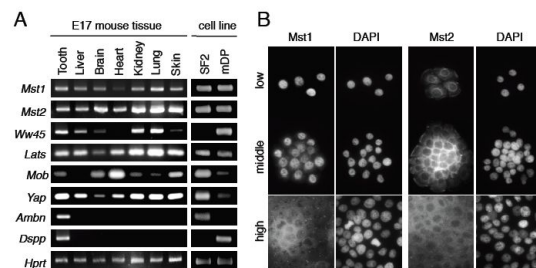
候補分子の器官形成に及ぼす影響を評価する為に、候補分子の発現ベクターおよび siRNA を、唾液腺および歯胚器官培養系に導

入し、器官の大きさおよび形態（唾液腺の場合は分岐形成について、歯胚に関しては咬頭数）を評価する。器官培養系での細胞増殖の評価に関しては、ErU を用いた増殖能の検討を行う。

候補分子において既に遺伝子欠損マウス等のモデル動物が存在する場合には、これらマウスの歯および唾液腺形成に関する表現系を検討するとともに、これらマウスの歯胚や唾液腺において、他の候補分子の発現を明らかにすることで、歯および唾液腺の人工誘導の為に基礎知見とする。

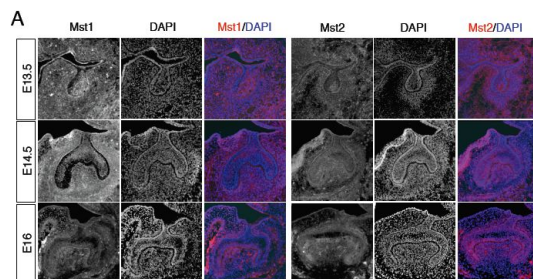
4. 研究成果

マイクロアレイを用いた包括的な遺伝子スクリーニングと IPA を組み合わせた解析により、歯の形態形成に関わると予想された遺伝子に関して少なくとも 20 種類以上の同定に成功した。特に歯の大きさを制御すると予想される分子として、Hippo と呼ばれるあらゆる細胞内シグナル分子が関わっていることを見出した。



Hippo 関連分子は、その分子群のほとんどが歯胚に発生しており（上図 A）、その発現様式は、歯と共通の発生過程を示す腎臓や肝臓と類似していることが明らかとなった。特に、Hippo 関連分子群の中でも、Mst1 は歯胚由来上皮細胞 SF2 において、細胞密度が低いときには核内に存在し、細胞密度が上昇するに従って細胞質に局在するといった特徴的な染色パターンを示した（上図 B）。このことからまず、Mst1 の歯胚発生における分子機能を明らかにすることとした。

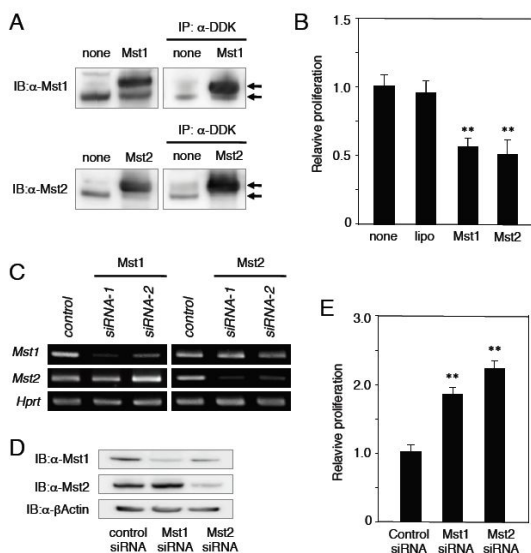
次に Mst1 および Mst2 の歯胚発生過程における組織内局在を、それぞれの特異的認識抗体を用いた免疫染色によって確認した。



その結果、Mst1 は発生の初期段階である E13.5 日では、組織全体に発現するものの、歯胚上皮においては舌側のみその発現が認められなかった（上図 A 左）。一方で、咬頭

形成の初期過程である E14.5 日においては、内および外エナメル上皮においてその発現は消失していた。このことから、歯胚の大きさ決定に関与している可能性が示唆された。

そこで、Mst1 の歯胚上皮における細胞増殖に及ぼす影響を検討した結果、Mst1 および Mst2 の過剰発現ベクターを遺伝子導入した SF2 細胞においては、コントロールと比較して 40-50% 程度の細胞増殖の抑制が認められた (下図 A, B)。更に、siRNA を用いた遺伝子発現抑制においては、Mst1 および Mst2 ともに細胞増殖の亢進が認められた (下図 C, D)。以上の結果から、Mst は歯原性上皮における細胞増殖の制御に関与している新しい分子であり、歯胚の大きさ決定に関与している可能性が考えられた。



次に、Mst1 がそのような分子機構で、歯原性上皮の細胞増殖に関与しているかどうかを明らかにする為に、Mst1 と相互作用を示す分子についてスクリーニングを行った。Mst1 分子の DDK タグを結合させ、抗 DDK 抗体による免疫沈降によい、Mst1 に結合する分子を同定した結果、細胞増殖因子の下流分子である ERK1/2 と特異的に結合し、その細胞局在の決定に関与していることが判明した。

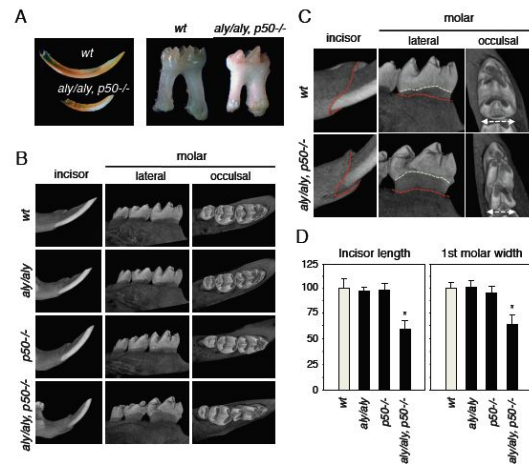
さらに Mst1 が、歯胚の形態形成に重要であるかどうかを確認する為に、Mst1 の下流分子である Mob1A および Mob1B の遺伝子欠損マウスにおいて、その表現系を検討した結果、Mob1A および Mob1B の遺伝子欠損の程度により、歯胚の大きさが減少することが明らかとなった。以上の結果から、Mst1 を介した分子制御は、歯胚の大きさを負に制御していることを見出すことに成功した。

歯胚の形態形成に関しては、我々の研究グループの成果から、EDA の下流分子である NF- κ B 経路が、歯胚の横幅 (頬舌径) を制御する可能性を見出していた。

そこで、NF- κ B 関連分子群 (IKKa, IKKb,

IKKg, p100/52, p50, RelA) の歯胚での発現について免疫組織学的に検討した結果、いずれの分子も、主に舌側に局在して発現する傾向を示した。

そこで、これら関連分子の欠損マウスをもちいて、歯の形態形成にどのような影響を示すかを検討した。



NF- κ B 経路のうち、NIK の変異マウス (aly) と p50 欠損マウスの両者の掛け合わせにより、歯の頬舌径が減少することを見出した。また NF- κ B の全ての経路を欠損させると、外胚葉異形成症と同様の矮小歯 (近遠心および頬舌径の現象) を呈することから、これらの分子群が、歯の縦幅および横幅をそれぞれ独立して制御していることを発見した。これらの分子は、どのように唾液腺形成の形態形成にも寄与することを明らかにしている。

この他にも、細胞増殖因子の 1 つである GDF5 が、エナメル質の厚みを制御し、その結果として歯の大きさ制御に関与することを、GDF5 変異マウスを用いた解析から明らかにした。

このように、包括的な分子スクリーニングにより、これまで全く歯の発生段階での機能が不明であった分子の、歯および唾液腺での形態形成に及ぼす役割が明らかとなり、これらの知見は歯や唾液腺の再生において、その大きさや形のコントロールを可能とする分子制御の基礎的な知見となることが期待される。

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 5 件)

Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Saito K, Yamada A, Han X, Funada K, Fukumoto E, Haruyama N, Iwamoto T, Takahashi I, Fukumoto S.

Nephronectin plays critical roles in Sox2 expression and proliferation in dental

epithelial stem cells via EGF-like repeat domains.
Sci Rep. 査読有, 7 巻: 45181. 2017 年
doi: 10.1038/srep45181.

Hosogane M, Bosu L, Fukumoto E, Yamada H, Sato S, Nakayama K.
Geminin is an indispensable inhibitor of Cdt1 in mouse embryonic stem cells.
Genes Cells. 査読有, 22 巻: 360-375. 2017 年
doi: 10.1111/gtc.12482.

Liu J, Saito K, Maruya Y, Nakamura T, Yamada A, Fukumoto E, Ishikawa M, Iwamoto T, Miyazaki K, Yoshizaki K, Ge L, Fukumoto S.
Mutant GDF5 enhances ameloblast differentiation via accelerated BMP2-induced Smad1/5/8 phosphorylation.
Sci Rep. 査読有, 6 巻: 23670. 2016 年
doi: 10.1038/srep23670.

Yamada A, Futagi M, Fukumoto E, Saito K, Yoshizaki K, Ishikawa M, Arakaki M, Hino R, Sugawara Y, Ishikawa M, Naruse M, Miyazaki K, Nakamura T, Fukumoto S.
Connexin 43 Is Necessary for Salivary Gland Branching Morphogenesis and FGF10-induced ERK1/2 Phosphorylation.
J Biol Chem. 査読有, 291 巻: 904-912. 2016 年
doi: 10.1074/jbc.M115.674663.

Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Yuasa K, Yoshizaki K, Iwamoto T, Saito M, Nakamura T, Fukumoto S.
Interaction between fibronectin and $\alpha 1$ integrin is essential for tooth development.
PLoS One. 査読有, 10 巻:e0121667. 2015 年
doi: 10.1371/journal.pone.0121667.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福本 恵美子 (FUKUMOTO EMIKO)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号: 10264251

(2) 研究分担者

福本 敏 (FUKUMOTO SATOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 30264253

斉藤 正寛 (SAITO MASAHIRO)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 40215562

阪井 丘芳 (SAKAI TAKAYOSHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 90379082

保住 健太郎 (HOZUKI KENTARO)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 10453804