

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293435

研究課題名(和文) 前象牙芽細胞の役割解明と象牙質再生への応用

研究課題名(英文) role of preodontoblast 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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯の発生過程における前象牙芽細胞の役割について解明することを目的とした。我々はバイオインフォマティカル解析手法を用いて歯の発生過程に発現する遺伝子群の網羅的解析を試みており、その成果として、Pannexin3 (Pnx3)が前象牙芽細胞特異的な分子であることを明らかにした。Pnx3は歯乳頭由来細胞において細胞内ATPを調節することによって、細胞増殖を停止させ、象牙芽細胞の分化を誘導することが示され、前象牙芽細胞の細胞増殖と細胞分化の運命決定に重要な機能を有していることを証明した。すなわち、前象牙芽細胞が象牙芽細胞の増殖と分化の制御において重要な細胞であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the roles of preodontoblasts in tooth development. Here we have found that the expression of Pnx3 was predominately localized in preodontoblasts that arise from dental papilla cells and can differentiate into dentin-secreting odontoblasts. Overexpression of Pnx3 in dental mesenchymal cells reduced cell proliferation via up-regulation of p21, and promoted the BMP2-induced phosphorylation of Smad1/5/8 and the expression of Dspp, a marker of differentiated odontoblasts. Furthermore, Pnx3 functions ATP release into the extracellular space through its hemichannel and induced the phosphorylation of AMPK. Our results suggest that Pnx3 modulates intracellular ATP levels, resulting in the inhibition of odontoblast proliferation through the AMPK/p21 signaling pathway and promotion of cell differentiation by the BMP/Smad signaling pathway.

研究分野：小児歯科

キーワード：前象牙芽細胞 Pannexin Pnx3 ATP channel

## 1. 研究開始当初の背景

近年の再生領域の研究発展には目覚ましいものがあり、ES細胞(胚性幹細胞)やiPS細胞(人工多能性幹細胞)の発見により、いよいよ人類は生命の根源にまで到達しようとしている。また、分化万能性の一方で、再生医療に実用化しやすい分化多能性を有した体性幹細胞が、体中のあらゆる組織中に存在することが証明されてきており、歯科においても脱落乳歯歯髄幹細胞が注目されている。日々の生活において、これらの技術を活用した再生研究の成果や疾患に対する新規治療法の開発といった報道が連日のように新聞紙面やテレビを賑わせており、国民の再生医療への期待が飛躍的に高まってきている。歯は重要な咀嚼器官であり、また、歯科疾患が全身疾患に及ぼす影響も明らかとなってきたこと、さらには発音や審美性においても大切であり、人が健康で健やかに生活する上で、重要な器官でありながら歯は極めて自己再生能に乏しい器官でもあり、歯科においても歯そのものを再生する技術開発に期待がかかる。

これまでわれわれはiPS細胞をエナメル質基質発現細胞へ誘導することに成功した。しかしながら、分化誘導効率の問題については解決すべき課題が多く、それらの細胞の分化機構についての核心には迫っていない。歯の発生機構に関わる分子や分子間相互作用もかなり明らかにされてきたが、まだまだその理解が不十分な為である。象牙質においては、骨とは明らかに違うにも関わらず、構成成分が類似していることもあり、骨と象牙質の違いを明確に区別できていない。象牙芽細胞の分化過程を整理すると、神経堤由来未分化間葉細胞が基底膜に対し、一列配列することからその分化が始まる。また、面白いことに歯の発生過程では、前エナメル芽細胞に一過性に象牙質基質蛋白のDSPPが発現することが知られているが、その役割については不明である。すなわち、象牙芽細胞が分化する過程には、基底膜、象牙質基質、エナメル基質等、多くの細胞外基質との接触機会があるのである。

われわれは新奇遺伝子の同定や相互分子解析に非常にパワフルな解析法であるバイオインフォマティカル解析手法を取り入れ、その成果を挙げてきた。この度、歯、軟骨、骨に特異的な分子として、Panx3の同定にも成功した。Panx3は歯において前象牙芽細胞に特異的に発現する分子であることが明らかとなった。これまで前象牙芽細胞を同定する分子がなかったが、歯におけるPanx3の役割を解明することによって、前象牙芽細胞の役割解明に繋がっていくものと確信する。

飛躍的なブレークスルーの為には、歯の発

生メカニズムの地道な解析と、歯という特異な視点にたった新たな切り口が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

Panx3はコネクシンに次ぐ、第二のギャップ結合蛋白のパネキシンファミリーに属するが、これまで歯、軟骨、骨に特異的なギャップ結合蛋白の報告はなく、Panx3は硬組織形成において非常に重要な役割があるギャップ結合蛋白であることが示唆された。軟骨において、前肥大軟骨細胞が増殖と分化を制御する細胞として非常に重要な役割であることが証明されているが、Panx3が、前肥大軟骨細胞に特異的に発現し、細胞内のATPを排出することによって、軟骨の増殖に重要な役割を担うPTH/PTHrPシグナル伝達経路を抑制し、分化を促進することが明らかとなった。すなわち、Panx3によって、軟骨細胞の増殖と分化のスイッチが切り替わっていることをこれまで明らかにした。そこで、本研究の目的は歯の発生過程における象牙芽細胞におけるPanx3の役割解明を明らかにすることを目的とした。

また、歯の発生に関わるこれまで明らかにされていない分子群や疾患についても検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Panx3 過剰発現細胞株の作成

マウス歯乳頭細胞由来細胞株 mDP に pEF1/Panx3 発現ベクターをリポフェクション法にて遺伝子導入し、過剰発現細胞株を作成し、細胞増殖試験ならびに細胞周期制御因子の発現をウエスタンブロッティング法にて解析する。さらに、過剰発現細胞を用いて BMP2 によって誘導される分化マーカーの発現への影響を検討する。

### (2) 内因性 Panx3 の発現抑制

siRNA 法ならびに Panx3 阻害合成ペプチドを用いて、mDP 細胞あるいはヒト脱落乳歯歯髄細胞より樹立した SDP11 細胞において、Panx3 の機能阻害をした場合における細胞の増殖や分化に関わるマーカーの発現について検討を行う。

### (3) Panx3 と細胞内シグナル分子との関連

これまでに前象牙芽細胞に発現する Panx3 はヘミチャネルとして細胞内の ATP を排出する機能を有していることを明らかにしてきた。そこで、ATP 排出に関連した細胞内シグナルと細胞増殖および細胞分化に関連する細胞内シグナル伝達経路を siRNA 法の併用または阻害剤を処理することによってウエスタンブロッティング法にて解析する。

### (4) Panx3 と基底膜分子との相互作用

象牙芽細胞は基底膜と接している前象牙芽細胞のみが最終的に分化する。そこで、Panx3 の発現細胞と基底膜の主要分子のラミニンやその受容体との関連を明らかにする。

### (5) Panx3 を標的とした硬組織関連疾患にお

#### ける創薬の可能性についての解析

Panx3 は歯、軟骨、骨に特異性が高い分子であることから硬組織関連疾患の標的分子として有効である可能性がある。そこで、Panx3 の機能を阻害するペプチド配列を既に同定したため、骨・軟骨肉腫由来の細胞株 MG63, Saos-2, Huo-9, OuMS-27 を用いて発現解析と阻害実験を行う。

#### 4. 研究成果

(1)Panx3 過剰発現 mDP 細胞は細胞増殖を抑制する：Panx3 が過剰発現された mDP 細胞は細胞増殖が抑制され、セルカウント法(図)ならびに BrdU 取り込み試験において有意に抑制がみられた。この結果は Panx3 の発

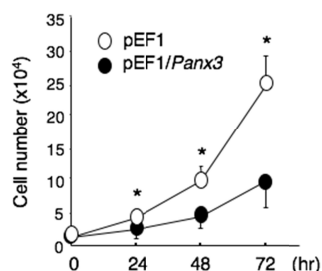
現は細胞増殖を負に制御することが示唆された。その一方で、象牙芽細胞の分化マーカーである DSPP の発現は有意に促進されることが明らかとなった。

(2)内因性 Panx3 の発現抑制は細胞周期制御因子の p21 の発現を抑制した。さらに、siRNA による Panx3 の発現抑制は BMP2 によって誘導される DSPP の発現を有意に抑制した。

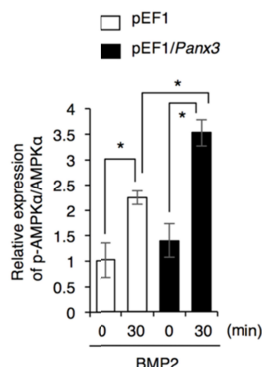
(3)AMPK は細胞のエネルギー恒常性を調節する因子で重要な役割を担っている。われわれは Panx3 の過剰発現が AMPK の活性化を誘導することを見出した。AMPK は BMP2 処理によっても AMPK は活性化されたが、Panx3 の発現はさらにそれを高めることが明らかとなった(図)。一方で、siRNA や阻害

剤によって Panx3 の発現や機能を抑制した場合、BMP2 によって誘導される AMPK の活性化が阻害された。これらの結果は Panx3 が細胞内の ATP 量の調節に関わっており、その結果として、エネルギーセンサーの AMPK の活性制御にも関わっていることを証明した。さらに、興味深いことに、Panx3 の過剰発現は細胞周期調節因子の p21 の発現を誘導したが、Panx3 の下流で動く AMPK の活性化によっても p21 の発現が誘導されることが明らかとなり、このことが Panx3 発現細胞における増殖抑制のメカニズムになっていることが示された。

また、象牙芽細胞の分化過程において BMP2 は主要な成長因子であり、その下流では Smad



シグナル伝達経路が活性化する。siRNA による内因性 Panx3 の発現を抑制したところ、BMP2 によって誘導される Smad のリン酸化が抑制された。これまでの解析で Panx3 は細胞内の ER 膜上にも発現することが考えられており、細胞内の Ca 調整にも関わっていることが明らかになっている。そこで、カルモジュリンの阻害剤で処理した細胞に BMP2 で刺激したところ、BMP2 によって誘導される Smad のリン酸化は抑制されたが、AMPK のリン酸化は阻害されなかった。また、AMPK 活性化剤は AMPK を活性化するが、Smad は活性化しなかった。これらのことから、Panx3 は AMPK/p21 経路および BMP2/Smad 経路の両方に作用するが、AMPK 経路自体は Smad 経路には影響を与えないことが明らかとなり、Panx3 による前象牙芽細胞の増殖と分化の切り替えに重要な役割があるその分子制御機構の一部を明らかにすることができた。



シグナル伝達経路が活性化する。siRNA による内因性 Panx3 の発現を抑制したところ、BMP2 によって誘導される Smad のリン酸化が抑制された。これまでの解析で Panx3 は細胞内の ER 膜上にも発現することが考えられており、細胞内の Ca 調整にも関わっていることが明らかになっている。そこで、カルモジュリンの阻害剤で処理した細胞に BMP2 で刺激したところ、BMP2 によって誘導される Smad のリン酸化は抑制されたが、AMPK のリン酸化は阻害されなかった。また、AMPK 活性化剤は AMPK を活性化するが、Smad は活性化しなかった。これらのことから、Panx3 は AMPK/p21 経路および BMP2/Smad 経路の両方に作用するが、AMPK 経路自体は Smad 経路には影響を与えないことが明らかとなり、Panx3 による前象牙芽細胞の増殖と分化の切り替えに重要な役割があるその分子制御機構の一部を明らかにすることができた。

(4)前象牙芽細胞は増殖歯乳頭細胞の集団から基底膜に沿って一列に配列した細胞が、基底膜の消失とともに象牙芽細胞に分化する。Panx3 は基底膜に沿った細胞とそのやや離れた位置に存在する細胞に発現がみられる。Lamininをコーティングしたdishで培養を行うと、Panx3 および DSPP の発現が上昇することから、Panx3 を発現し、かつ基底膜と接触することが象牙芽細胞へと最終分化することが示唆された。実際、象牙芽細胞の増殖の停止にかかわる p21 は Panx3 陽性で、かつ基底膜に沿った細胞にのみ発現がみられた。

(5)ヒト骨肉腫由来細胞株Huo-9細胞でPanx3は発現しており、その機能阻害を行ったところ、破骨細胞誘導因子のRANKLの発現が上昇した。このことはPanx3が腫瘍の増大に抑制的な作用を有していることを示唆する結果であり、Panx3の機能に着目した創薬の可能性を示唆するものである。

#### 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)

Iwamoto T, Nakamura T, Ishikawa M, Yoshizaki K, Sugimoto A, Ida-Yonemochi H, Saito M, Yamada Y, Fukumoto S., Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities. *PLoS ONE*, Vol.12, No.5, p.e0177557, 2017 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0177557. eCollection 2017.

Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Saito K, Yamada A, Han S, 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. *Scientific Reports*, Vol.7, p.45181, 2017. 査読有

DOI: 10.1038/srep45181.

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  $\alpha 1$  Integrin Is Essential for Tooth Development. *PLoS ONE*, 10(4) e0121667. 2015 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0121667. eCollection 2015.

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.

〔学会発表〕(計 5 件)

Sugimoto A, Masayuki S, Iwamoto T., Hydrostatic pressure regulates cell fate decision in human mesenchymal stem cells. 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 東京ドームホテル 2016.5.26 (東京都・文京区)

Ueda K, Sugimoto A, Yuki A, Hasegawa T, Iwamoto T., Multi-ion solution promotes cell migration through ERK signaling pathway and CXCR4 expression in human gingival fibroblasts. 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 東京ドームホテル 2016.5.26 (東京都・文京区)

Akazawa Y, Hasegawa T, Yoshimura Y, Chosa N, Asakawa T, Sugimoto A, Takamasa K, Ueda K, Kawarabayashi K, Ishisaki A, Takahashi R, Suehiro Y, Iwamoto T., Molecular mechanisms of SDF-1 suppression by FGF2 in dental pulp cells. 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 東京ドームホテル 2016.5.26 (東京都・文京区)

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髓細胞由来 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

(2)研究分担者

長谷川 智一 (HASEGAWA, Tomokazu)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師  
研究者番号: 50274668