

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670880

研究課題名(和文)上皮細胞極性制御による歯の再生法の開発

研究課題名(英文)Regulation of epithelial polarization to regenerate tooth

研究代表者

福本 敏 (FUKUMOTO, SATOSHI)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30264253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯のエナメル質形成は、連続した上皮-間葉細胞の相互作用による細胞の増殖、分化により引き起こされ、最終的には組織特異的な基質の分泌やカルシウムなどのイオン共有により、整列したエナメル小柱有するエナメル質が形成される。歯の再生を目的とした人工エナメル質形成には、人為的にエナメル芽細胞を誘導する培養方法の開発が必要である。そこで新たな3次元培養法を開発し、エナメル芽細胞分化に有効であるかどうかを検討した。その結果、新たな培養システムは、歯原性上皮細胞株SF2におけるエナメル質特異的な基質の誘導と、石灰化を引き起こした。したがってこの培養法は、人工エナメル質形成に有効な手法であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Enamel formation is known as a process that involves cellular proliferation, differentiation through sequential epithelial-mesenchymal interactions, secretion of tissue-specific matrix proteins (e.g., amelogenin), active conveyance of inorganic ions including calcium, and the onset of precipitation and orientation of enamel apatite crystals with enamel matrices. To form artificial enamel, in vitro differentiation system of ameloblast is useful to regenerate tooth and hard tissue. Here, we established new 3D culture system to induce ameloblast differentiation and calcification. A novel 3D culture for dental epithelial cell line SF2 induced enamel specific extracellular matrix, ameloblastin and amelogenin. Further, calcification was observed in this culture system indicating that this new culture method might be useful to form artificial enamel in vitro.

研究分野：小児歯科

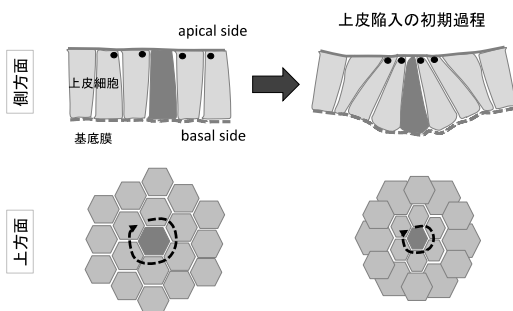
キーワード：エナメル質 3次元培養 石灰化

1. 研究開始当初の背景

これまで歯の再生は、人工的に歯胚を作成し、その人工歯胚を移植することで再生が試みられてきた。しかしながらこの手法においては、1) 胎児由来細胞の利用による倫理的な問題、2) 大型器官の再生が困難(血管構築ができない)などの問題が存在することから、マウスなどの小型動物でしか歯再生は行われておらず、ヒトへの応用は困難であると考えられてきた。

歯胚の発生初期過程においては、予定歯胚形成部位において上皮の陥入が生じ、その後一連の上皮-間葉相互作用により歯が形成される。この予定歯胚形成部位においては、SHH、WNT10Aなどの液性因子(既知の上皮陥入因子)が特異的に発現していることが知られているが、これらの因子のみでは歯の誘導を行なうことができない。そこで、歯胚の陥入を誘導できる因子が同定できれば、歯胚再生における上記の1)、2)の問題を解決できると考えた。

またショウジョウバエを用いた研究において、上皮の陥入部位では、陥入領域の周囲の上皮細胞にミオシンIIが発現し、このミオシンが物理的に収縮することで、上皮の落ち込みを誘導することが明らかになった(下図)。このような上皮細胞の力学的極性化システムは、哺乳類の細胞においても働いている可能性が考えられ、上皮の片側における細胞レベルの収縮(basal側ではなくapical側の収縮)により、上皮細胞の極性化と陥入が規定されると考えた。つまり上皮細胞の片側での圧縮力を再現することで、上皮陥入モデルを構築できるという考えに至った。



2. 研究の目的

歯胚の陥入因子の同定を行なうためには、これまで上皮陥入部位を組織学的に切断し、同領域における遺伝子発現等の解析が行われてきた。しかしながら、マウスモデルにおいては、リアルタイムに陥入を追跡することはできず、この20年間世界中で行われてきた従来法では、新たな歯胚誘導因子の同定に至っていない。そこで本研究では、研究の期間内に、1)リアルタイム観察が可能なin vitroにおける上皮細胞極性制御による上皮陥入モデルの作成と、2)最新の遺伝子・蛋白スクリーニングシステムと上皮陥入モデルを用いた新規上皮陥入因子の同定を行な

う。

3. 研究の方法

本研究においては、これまで再生医療の分野で応用されてきた熱変性細胞培養シートと人工基底膜を応用し、口腔寝粘膜上皮細胞および歯原性上皮細胞の単層培養をおこなう。その後、力学的に細胞極性を制御することで、上皮陥入のin vitroモデルの構築を行う。

次に、この上皮陥入モデルを用いて、従来のDNAマイクロアレーやプロテインアレー、さらには次世代シーケンサーを用いたmRNAのダイレクトシーケンスにより、陥入部位の上皮細胞に特異的に発現する新たな分子のスクリーニングを行なう。

(1) 力学的な上皮細胞極性制御による上皮陥入モデルの構築

胎生期のマウス口腔上皮細胞(Fucciマウス由来)と、当教室で樹立したラット由来歯原性上皮細胞株SF2を用いて実験を行う。まず、セルシード社製の熱変性細胞培養シート作成dish上に人工基底膜(ラミニン、IV型コラーゲンコート)を作製し、マウス口腔上皮細胞およびSF2細胞の単層培養を行なう。

培養した上皮細胞を細胞シート化し反転させ、細胞の上面を細胞進展側に、基底膜がわを上方に位置し、継続培養を行なう。細胞進展装置は細胞付着面をすでに進展させた状態で保持する。

その上にI型コラーゲンゲルと歯原性間葉細胞(マウス由来mDP細胞)を培養し、3次元培養をおこなう。そのうち、細胞進展装置の進展力を解除することで、上皮細胞表面の中心に圧縮力を付与し、上皮細胞のapical側とbasal側との細胞面積を改変することによる上皮細胞極性制御を行なう。

(2) 上皮陥入モデルの評価(従来の陥入因子の発現と、陥入上皮細胞の増殖評価)

上記の培養法で培養した上皮細胞での、進展力解除前後におけるshh、Wnt10aの発現についてReal-time PCRにて確認する。またショウジョウバエで陥入部位において発現の確認されているミオシン関連分子群の発現変化も確認する。

次に、当教室で保有する細胞増殖モニターマウス(細胞周期により細胞の核が2色に変化)由来上皮細胞を利用した際は、共焦点レーザー顕微鏡を用いたタイムラプスにより、上皮陥入部分におけるリアルタイムの細胞増殖の観察を行なう。

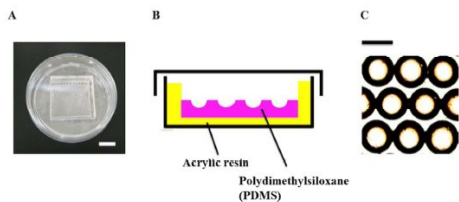
初年度において、上記培養法で得られた進展力解除前後における上皮細胞のmRNAあるいは蛋白を抽出し、DNAマイクロアレーやプロテインアレー、さらには次世代シーケンサーを用いたmRNAのダイレクトシーケンスによる解析準備を進める。

4. 研究成果

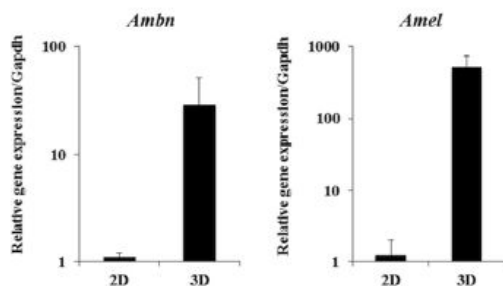
熱変性細胞培養シート作成 dish 上に人工基底膜(ラミニン、IV型コラーゲンコート)を作製し、マウス口腔上皮細胞およびSF2細胞の単層培養を行った。その後、細胞を反転させ、進展刺激を加える試みを重ねたが、歯原性上皮を一旦剥離させると、細胞の生存率が著しく減少し、その後の研究がうまく実施できないことが明らかとなった。一方で間葉細胞に用いる予定であったI型コラーゲンをういた培養法を、歯原性上皮細胞培養に応用した結果、こちらの方は細胞の生存率を維持したまま長期培養が可能であることが明らかとなった。

次に、これら細胞シートを進展刺激させた結果、shh、Wnt10aの発現が誘導された。また、ミオシンIIの発現に関しては、進展直後においては大きな変化は認められなかった。しかしながら、進展のみでは歯原性上皮細胞の最終分化であるエナメル芽細胞への分化誘導は行うことができず、新たな培養法の開発が必要と考えられた。

そこで、3次元の球形状態を維持させる為の新たな培養ディバイスを開発し、人為的に細胞極性を維持することで、歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞分化誘導を試みた(下図)。本装置の特徴は、球形培養した際に細胞塊全体に酸素供給が行える状態となっており、これまでの球形培養と比較して長期に培養することが可能であること、また細胞数を調整することで、安定した細胞間結合を維持できる特徴を有している。



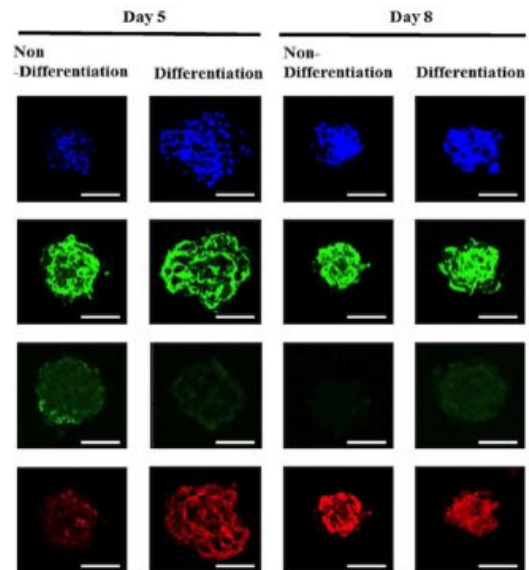
本培養装置を用いてSF2細胞を3次元培養し、細胞増殖に関しては細胞塊に含まれるDNAの含有量を、エナメル芽細胞の分化に関しては、アメロブラスチン(AMBN)およびアメロジェニン(AMEL)の発現をRT-PCRにて確認した。



その結果、従来の2次元培養と比較して、3次元培養では細胞塊でのDNA含有量が変化し

ないことから、積極的な細胞増殖は認められないことが確認できた。さらにエナメル芽細胞分化に関しては、2次元培養と比較しても極めて効率よくAMBNやAMELの発現誘導が行われていた(上図)。このことから、新たな3次元培養法は、エナメル芽細胞分化に有効なツールとなることが示唆された。

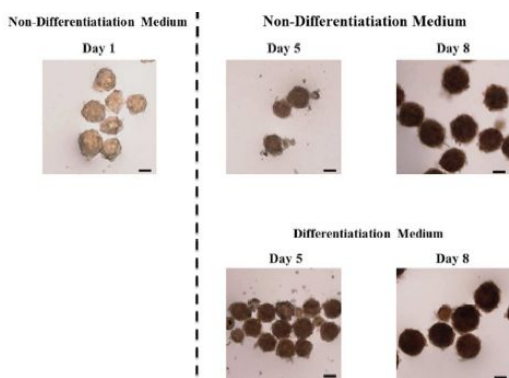
次に、これらエナメル質に特異的な基質が、蛋白として細胞塊中に存在するかどうかを、免疫染色にて確認した。AMBNは培養期間中、細胞塊に存在し続けることが確認された。一方、AMELにおいては培養初期においては、その発現が確認できるが、後半においてその発現は消失していた(下図)。また、AMELの分解酵素の1つであるKLK4に関しては、培養の後半より発現が上昇しており、その発現に伴ってAMELの染色が減少した。このことから、培養後半においては、KLK4の発現上昇に伴い、AMELが分解されることで、AMELの染色が減弱したものと考えられる。



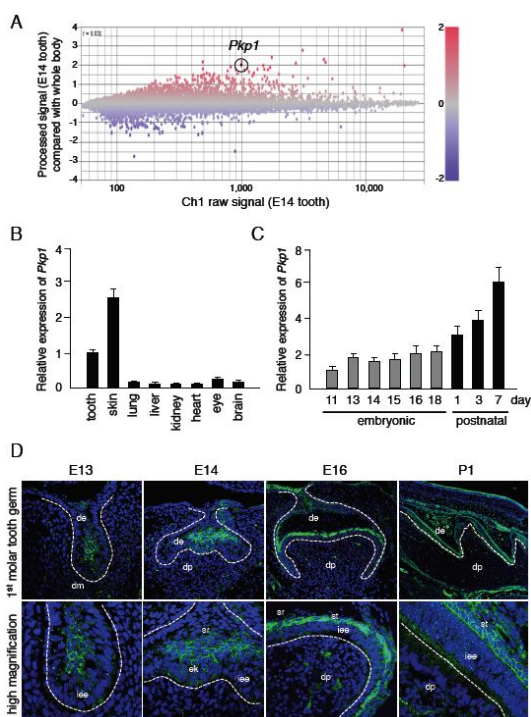
このような現象は、in vivo においてはエナメル質の成熟過程において認められることから、我々の3次元培養法は、エナメル芽細胞の最終分化過程まで再現できる可能性が示唆された。

そこで、これらの培養により、エナメル芽細胞の最終分化である石灰化の過程までを本装置で再現できるかどうかを検討した。そこで、3次元培養した細胞塊に骨分化誘導培地添加し、Von Kossa染色にて石灰化の有無を検討した。培養初期においてはVon Kossa陽性の石灰化は全く認められなかったが、培養5日目以降においては、非分化誘導培地においても石灰化が認められ、分化誘導培地中ではその石灰化が亢進した。このことは、通常の2次元培養においては、エナメル芽細胞のin vitroでの石灰化を誘導することが難しいが、3次元培養においては特別な分化誘導培地がなくとも、エナ

メル芽細胞に分化し、最終的には石灰化誘導まで *in vitro* で行えることが確認できた(下図)。



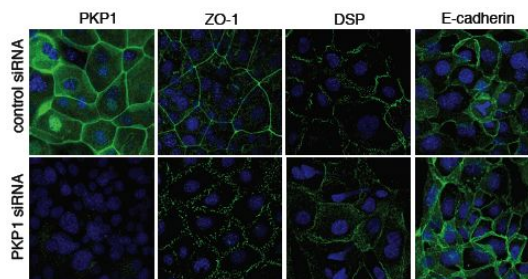
我々はさらに、この3次元培養をより効率よく、*in vivo* に近い状態で再現する目的で、歯原性上皮細胞の細胞極性決定に関わる新たな分子スクリーニングを行った。その結果、歯胚に特異的に発現する分子として Pkp1 を同定した。



マイクロアレイにおいて、歯胚と体全体との遺伝子発現解析から、Pkp1 は、歯胚に強く発現し(上図 A) その組織発現は歯胚と皮膚に強く、歯の発生段階に応じてその発現は上昇した(上図 B, C)。更に、歯胚組織の中でも、上皮細胞に特異的な発現を示した(上図 D)。

さらに、この Pkp1 が、歯の発生に重要な因子であるかどうかを確認する為に、歯胚の器官培養系に Pkp1 の遺伝子発現を抑制する siRNA を導入した結果、Pkp1-siRNA の添加により、歯胚の大きさが小さくなることが明らかとなった。このことから、Pkp1 は、歯胚形成に極めて重要な因子であることが判明し

た。そこで、細胞極性に関与するかどうかを検討する目的で、SF2 細胞を培養し、極性決定に関わる E-cadherin や ZO-1 との関連性について検討した。SF2 を培養した際に、E-cadherin や ZO-1 は細胞間において境界明瞭に染色されるが、Pkp1-siRNA を添加し、Pkp1 の発現を抑制した状況では、ZO-1 の局在が乱れ、細胞極性が失われることが分かった(下図)。このことから、Pkp1 は歯原性上皮細胞の細胞極性決定に極めて重要な新規分子であることが明らかとなった。



これらの知見をもとに、新たな3次元培養技術と、極性決定に関わる新規分子の応用により、より効率的なエナメル芽細胞誘導法、さらには人工エナメル質形成の為に新技術開発に繋げていきたい。

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)

Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Yamada A, Saito K, Ishikawa M, Xue H, Funada K, Haruyama N, Yamada Y, Fukumoto S, Takahashi I.

Plakophilin-1, a Novel Wnt signaling Regulator, Is Critical for Tooth Development and Ameloblast Differentiation.

PLoS One. 査読有, 11 巻:e0152206. 2016 年 doi: 10.1371/journal.pone.0152206.

Tadaki M, Anada T, Shiwaku Y, Nakamura T, Nakamura M, Kojima M, Arai T, Fukumoto S, Suzuki O.

A 3D culture model study monitoring differentiation of dental epithelial cells into ameloblast-like cells.

RSC Adv. 査読有, 6 巻:1235-46. 2016 年 doi: 10.1039/c6ra0470g.

Lu X, Fukumoto S, Yamada Y, Evans CA, Diekwisch TG, Luan X.

Ameloblastin, an Extracellular Matrix Protein, Affects Long Bone Growth and Mineralization.

J Bone Miner Res. 査読有, 31 巻:1235-46. 2016 年

doi: 10.1002/jbmr.2788.

Ishikawa M, Williams GL, Ikeuchi T, Sakai K, Fukumoto S, Yamada Y. Pannexin3 and connexin 43 modulate skeletal development through their distinct functions and expression patterns. J Cell Sci. 査読有, 129 巻:1018-30. 2016 年
doi: 10.1242/jcs.176883.

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 敏 (FUKUMOTO SATOSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号 : 30264253