

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791967

研究課題名(和文) 幹細胞維持機構における Rho キナーゼを介した上皮間葉転換の役割

研究課題名(英文) The role of epithelial-mesenchymal transition in stem cell maintenance via Rho kinase

研究代表者

大津 圭史 (Otsu, Keishi)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：60509066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エナメル芽細胞分化・エナメル上皮幹細胞維持における Rho シグナリングの役割について検討を行った。上皮特異的 RhoA-dominant negative 発現マウスの解析から、Rho シグナリングは、エナメル芽細胞分化における細胞骨格、細胞接着を制御していることがわかった。また、Semaphorin 4D-PlexinB1-LARG シグナル経路が RhoA の活性を調節していた。さらに RhoA の活性は、上皮間葉転換(EMT)にかかわる転写因子 Slug の発現を制御することから、エナメル上皮細胞分化や未分化性維持は Rho シグナリングを介した EMT によって調節されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of Rho signaling in ameloblasts differentiation and stem cell maintenance. The experiments using mice with epithelial specific expression of RhoA dominant negative demonstrated that Rho signaling regulated cytoskeletal dynamics and cell adhesion during ameloblasts differentiation. Semaphorin 4D-PlexinB1-LARG signal cascade controlled RhoA activity. Further, since RhoA activity regulated the expression of slug, the transcription factor that controlled epithelial-mesenchymal transition (EMT), it was suggested that EMT regulated ameloblasts differentiation and stem cell maintenance via Rho signaling.

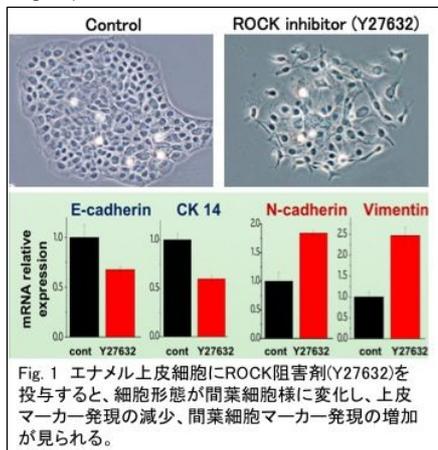
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 形態系基礎歯科学

キーワード：エナメル芽細胞 分化 Rho ROCK EMT

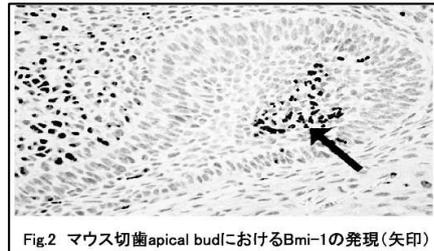
1. 研究開始当初の背景

Rho kinase (ROCK)はRhoシグナル伝達経路において、アクチン細胞骨格を再編成し、細胞運動・接着・細胞質分裂などの調節分子として機能していることがよく知られているが、最近では細胞の分化、脱分化にも関わっていることが判明している。このような背景のもと、われわれはこれまでにROCKのエナメル芽細胞分化への影響を検討してきた。その中で、1) ROCKの抑制によってエナメル芽細胞分化が阻害されること(大津、2008年若手スタートアップ採択課題, J. Cell. Physiol. 2010)、2) 培養エナメル上皮細胞がROCK抑制によってEMTを起こし、間葉系細胞の性質を獲得していることを見いだした(Fig.1)。



そしてその細胞中では、3) 主要なEMT誘導因子であるSnail-2の発現上昇と核への移行、上皮幹細胞マーカー(Bmi-1, Sox2, Oct3/4)の発現上昇がみられることを報告した(大津 2011年 Gordon Research Conferenceにて発表)。
また、一方でわれわれは、マウス切歯の形成端(apical bud)星状網にエナメル上皮幹細胞が存在していることを発見し(Harada et al. J.C.B., 1999)、この場所を幹細胞維持のための微小環境(ニッチ)としてその特徴を明らかにしてきた。apical bud 星状網の細胞は極めて独特の細胞生物学的特性を有しており、予備実験において4) 間葉細胞マーカー(vimentin, fibronectin)、

EMTマーカー(Snail-2, TGF- β)、未分化維持因子(Sox2, Bmi-1)を発現していること(Fig. 2)、5) ROCKの発現が、分化したエナメル芽細胞に比べ非常に弱いことがわかった。これらの結果は、星状網細胞においてEMTが起きていること、ROCKがEMTに関与していることを強く示唆するものであった。



EMTはもともと初期胚発生、神経提細胞の運動、癌細胞の浸潤や転移などでみられる現象として広く知られていたが、近年がん幹細胞における未分化性の獲得、維持に強く関与していることが報告されている(Mani et al. Cell. 2008)。しかしその詳細な調節機構、正常組織上皮幹細胞に対する役割は不明である。

以上のことを総合的に考え、エナメル上皮細胞は、Rho signaling によって制御される EMT によって分化がコントロールされているのではないかとの考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、Rho ドミナントネガティブトランスジェニックマウスを使った機能喪失実験、Rho と Snail-2 のシグナル伝達解析などを行い、Rho シグナリングとエナメル芽細胞分化とのかかわり、その上流、下流のシグナル伝達因子について明らかにすることを目的に実験を行った。

3. 研究の方法

(1) タモキシフェン誘導型 K14-Cre/RhoA DN マウスの作製とその解析

タモキシフェン誘導型 K14-cre マウス(と RhoA-dominant negative (DN)の導入遺伝子を有するマウスから、タモキシフェン誘導型上皮特異的 RhoA-DN 発現マウス(K14-CreERTM; RhoA-DN+)を作製した。この

マウスにおける切歯の形態、エナメル芽細胞の分化、EMT、幹細胞関連遺伝子の発現を、Wild type マウスと比較した。

(2) マウス切歯器官培養, マウスエナメル上皮細胞株での Rho 喪失実験

生後 1-7 日齢マウスから摘出した下顎切歯と、マウスエナメル上皮細胞株に ROCK, Rho のインヒビターを加え、エナメル芽細胞の分化、増殖、EMT、幹細胞関連遺伝子の発現を免疫染色法や real time RT-PCR で解析した。

(3) Semaphorin 4D (Sema4D) による Rho シグナリング調節とエナメル芽細胞分化の解析

Semaphorin 4D とそのレセプターである PlexinB1、下流の調節因子 LARG のマウス切歯における発現を免疫染色にて解析した。マウスエナメル上皮細胞株に対し、Sema4D のリコンビナントタンパクを加え RhoA の活性を Rho activity assay kit で、actin のリモデリングを phalloidin 染色にて解析した。Sema4D の中和抗体をマウス切歯の器官培養に作用させ、エナメル芽細胞の分化を組織学的に解析した。Plexin B1 の siRNA をエナメル上皮細胞に作用させ、actin, LARG の発現を観察した。

4. 研究成果

(1) タモキシフェン誘導型 K14-Cre/RhoA DN マウスの作製とその解析

タモキシフェン誘導型 K14-cre マウスと RhoA- DN の導入遺伝子を有するマウスから、タモキシフェン誘導型上皮特異的 RhoA-DN 発現マウス (K14-CreERTM; RhoA-DN+) を作製し、胎生期と生後でタモキシフェンを腹腔内投与した。Rho-DN+ マウス胎児の切歯, 臼歯ともに、WT のマウスと比べ、発生が遅れておりサイズも小さくなっていた。またエナメル芽細胞の分化、基質形成はほとんど見られなかった(図 3, 4)。また、成獣マウスにタモキシフェンを投与すると、切歯形成端近くのエナメル芽細胞の分化が抑制され、基質の分泌が見られなくなっていた。さらにそれらの細胞における actin, E-cadherin, Occludin の発現を免疫染色にて解析したところ、WT で特徴的

に見られる apical side と basal side に限局した発現パターンが見られず、細胞内一様に発現していた。

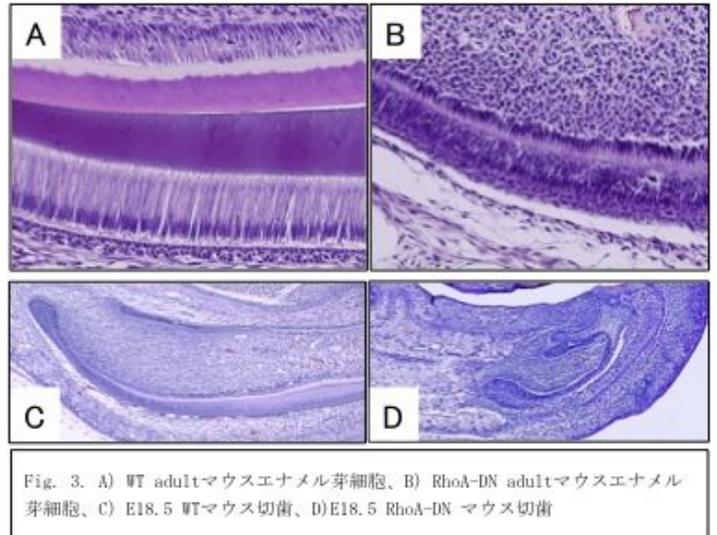


Fig. 3. A) WT adultマウスエナメル芽細胞, B) RhoA-DN adultマウスエナメル芽細胞, C) E18.5 WTマウス切歯, D) E18.5 RhoA-DN マウス切歯

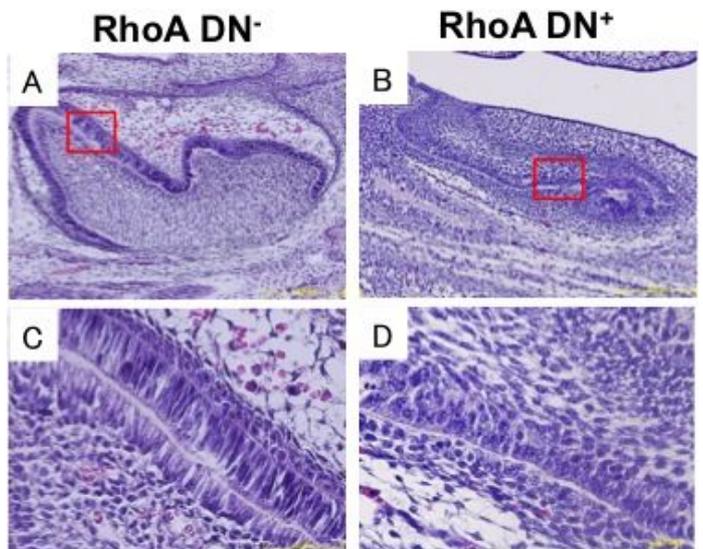


Fig. 4. A, C) E18.5 RhoA DNネガティブマウス臼歯, B, D) RhoA-DN adultマウス臼歯。赤枠は C, Dそれぞれの拡大範囲を示す。

(2) Rho シグナリングによるエナメル芽細胞増殖制御

切歯エナメル上皮細胞における細胞増殖マーカー Ki67 の発現を RhoA DN+ と WT で比較したところ、WT マウスでは切歯の形成端に限局し、分化したエナメル芽細胞では見られない一方、RhoA DN+ マウスでは切歯エナメル上皮細胞全体に発現していた。またマウス切歯の器官培養に Rho activator と Rho inhibitor を加えたところ、Rho activator ではエナメ

ル上皮細胞の増殖抑制、Rho inhibitor では増殖促進効果が観察された(図 5)。

これらの結果より、RhoA はエナメル芽細胞分化、増殖に深く関与していることが分かった。

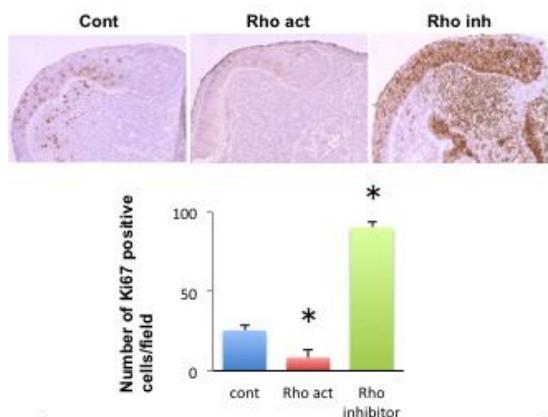


Fig. 5. マウス切歯器官培養にRho activator, Rho inhibitor添加5日後のKi67免疫染色と統計解析。

(3) Semaphorin 4D による Rho シグナリング制御

Rho シグナリングを制御する上流の因子を明らかにするために、神経軸索の伸張を司るガイダンス因子 Semaphorin 4D (Sema4D)に着目し、Sema4D と RhoA 活性化の関係について検討を行った。マウス切歯の免疫染色にて Sema4D とそのレセプター PlexinB1 は、内エナメル上皮で細胞質全体に弱く発現していた。一方、分泌期エナメル芽細胞では apical end, basal end に強く限局して発現していた。また RhoA を活性化させる Rho guanine nucleotide exchange factor 12 (LARG)も同様の発現パターンを示し、PlexinB1 との共発現が観察された。培養エナメル上皮細胞 mHAT9d に Sema 4D recombinant protein を添加したところ、経時的な活性化型 RhoA の発現上昇と actin の重合促進がみられた。一方、マウスの切歯の器官培養に Sema4D の中和抗体を作用させるとエナメル芽細胞の極性が失われ、amelogenin の発現パターンが変化した(図 6)。

さらに mHAT9d 細胞で Plexin B1 の発現を siRNA にてノックダウンしたところ、active

RhoA, E-cadherin, Occludin の発現と actin 重合が抑制され、LARG の局在が細胞膜から細胞質へ移行していた。以上の結果より、エナメル芽細胞において RhoA の活性化は Sema4D-PlexinB1-LARG 経路にて制御されていることが明らかとなった。

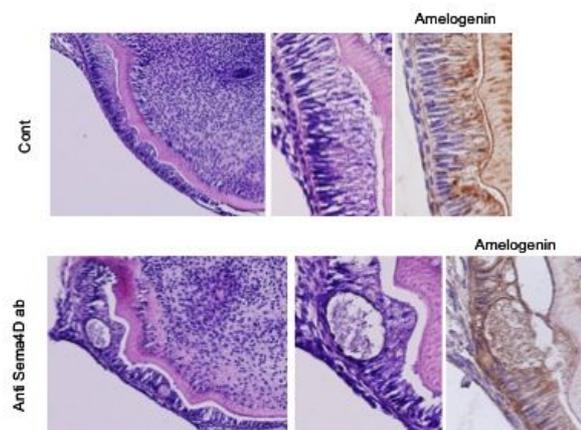


Fig. 6. マウス切歯器官培養に抗Semaphorin 4D抗体添加5日後(下段)。エナメル芽細胞極性の喪失とAmelogenin発現パターンの変化が見られる。

(4) Rho-Slug によるエナメル芽細胞上皮分化制御

我々の過去の予備実験で、培養エナメル上皮細胞の Rho シグナルを抑制すると、EMT を制御する転写因子 Slug の発現上昇が見られたことから、Slug が Rho の下流でエナメル芽細胞分化を制御している可能性が考えられた。マウス切歯の Slug 免疫染色では、未分化なエナメル上皮細胞(内エナメル上皮細胞)で発現が強く見られる一方、分化したエナメル芽細胞(分泌期エナメル芽細胞)ではその発現が消失していた。E18.5 RhoA DN+マウス切歯において Slug の発現はエナメル上皮細胞全体に観察された。また、マウス切歯器官培養に Rho activator, Rho inhibitor を作用させたところ、Rho activator では Slug の発現抑制、Rho inhibitor では発現上昇が認められた。さらに培養エナメル上皮細胞に Rho inhibitor を作用させると Slug の発現が細胞質から核へと移行した。また、mHAT9d 細胞で Plexin B1 の発現を siRNA にてノックダウン

したところ、Slug の局在が核から細胞質へと移行していた。現在、培養エナメル芽細胞における Slug の機能喪失、機能獲得実験を行い、amelogenin 遺伝子発現の変化を解析中である。

以上の結果から、エナメル芽細胞分化を制御する新たなシグナルカスケードとして Sema4D- RhoA-Slug 経路の存在が示唆された。

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 3 件)

1. Regulatory mechanisms of Hertwig's epithelial root sheath formation and anomaly correlated with root length. Kumakami-Sakano M, Otsu K, Fujiwara N, Harada H. Experimental Cell Research. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.02.005. 査読あり
2. The role of Rho-kinases in ameloblast differentiation. Otsu, K., Sakano, M., Masuda, T., Fujiwara, N., and Harada, H. Journal of Oral Biosciences. 55:4:159-164. 2013. DOI: 10.1016/j.job.2013.07.001 査読あり
3. Cell dynamics in cervical loop epithelium during transition from crown to root: implications for Hertwig's epithelial root sheath formation. Sakano M, Otsu K, Fujiwara N, Fukumoto S, Yamada A, Harada H. J Periodontal Res. 48:2:262-267. 2013 doi: 10.1111/jre.12003. 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

1. Functional role fo Rho signaling in ameloblast differentiation. Otsu K,

Sakano M, Masuda T, Fujiwara N, Harada H. The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program 2013 Japan (Iwate Medical Univ) - (Yonsei Univ) Joint Research Project (JSPS) Seminar.

Iwate, 2013, Dec. 19th~21st

2. Role of Rho-GTPase in dental epithelial stem cell. Otsu K, Sakano M, Masuda T, Fujiwara N, Harada H. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation. France, 2013 年 5 月 25~6 月 2 日
3. Rho シグナリングのエナメル芽細胞分化における役割 大津圭史、藤原尚樹、原田英光 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 岡山 2013 年 9 月 20 日~23 日
4. エナメル上皮幹細胞における Rho シグナリングの役割 大津圭史、坂野深香、増田智幸、藤原尚樹、原田英光 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 香川 2013 年 3 月 28 日~30 日
5. エナメル上皮幹細胞の分裂後の動態を制御する細胞走化性因子の役割 田巻玉器、大津圭史、原田英光、長澤丘司、入江一元 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 香川 2013 年 3 月 28 日~30 日
6. エナメル上皮幹細胞研究の国際的潮流と今後の展望 原田英光、藤原尚樹、大津圭史 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 香川 2013 年 3 月 28 日~30 日
7. The role of Rho signaling pathway in dental epithelial stem cells. Keishi Otsu, Hidemitsu Harada. Gordon research conferences, Craniofacial morphogenesis & tissue regeneration, U.S.A. 2012 年 3 月 18 日~24 日
8. エナメル芽細胞分化における

Rho-kinaseの役割 大津圭史 第54回
歯科基礎医学会学術大会 郡山 2012
年9月14～16日

9. The role of Rho signaling pathway in dental epithelial stem cells Keishi Otsu, Ryota Kishigami, Ai Oikawa-Sasaki, Naoki Fujiwara, Kiyoto Ishizeki, Hidemitsu Harada 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 甲府 2012年3月26日～28日

〔図書〕(計 5 件)

1. 遺伝子医学MOOK別冊 細胞の3次元組織化-その最先端技術と材料技術 原田英光 大津圭史 株式会社 メディカルドゥ p333-337, 2014
2. 歯の発生メカニズムと先天性疾患:歯の数の異常を考える 大津圭史 日本歯科評論 74(1) 147-149 2014
3. 歯の発生メカニズムと先天性疾患:歯根の異常を示す先天性疾患とそのメカニズム 大津圭史 日本歯科評論 74(2) 147-149 2014
4. 歯の発生メカニズムと先天性疾患:歯冠の形成異常とそこから見えてくるもの 大津圭史 日本歯科評論 74(3) 151-153 2014
5. 幹細胞 (Stem cell) 研究がひらく歯の再生の扉 大津圭史 日本歯科評論 72(8), 9-11 2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

大津 圭史 (OTSU, Keishi)
岩手医科大学 歯学部 助教
研究者番号: 60509066