

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659818

研究課題名(和文) エナメル器星状網細胞の上皮間葉転換は血管新生の誘導メカニズムになり得るか？

研究課題名(英文) Is epithelial-mesenchymal transition of stellate reticulum cells in enamel organ associated with induction of vasculogenesis?

研究代表者

原田 英光 (Harada, Hidemitsu)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：70271210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：歯の発生後期には、エナメル器(上皮)に血管が複雑に入り込んだ構造をとるので、この過程から新規血管新生のメカニズムの解明を考えた。上皮特異的に *b-gal* を発現する遺伝子改変マウスを用いて、上皮間葉転換とそれに関わる因子の検索を行った。また *Flk1* (*VEGF2R*) *GFP* マウスによって血管構築を観察した。その結果、星状網の細胞は内エナメル上皮細胞の増殖によって中間層細胞を経由して発生すること、星状網の血管構築には低酸素反応因子 *Hif1* の発現から酸素濃度の変化と *Hif1* の発現が深く関わっていること、を明らかにした。また血管網はエナメル基質の石灰化のためにエナメル芽細胞の分化との関連も示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the late stage of tooth germ development, vasculogenesis is observed in the enamel organ. To discover the mechanisms of the vasculogenesis, we studied on the relationship between the vasculogenesis and epithelial-mesenchymal transition using *Keratin14 cre-b-gal* transgenic mouse, *Mesp1 cre-b-gal* transgenic mouse and *Flk1-GFP* transgenic mouse. Also, the cell dynamics of enamel organ was observed by real-time imaging of tooth germ organ culture. The study showed that the development of stellate reticulum cells is derived from inner enamel epithelial cells, and that the vasculogenesis and epithelial-mesenchymal transition is closely associated with hypoxia in the enamel organ from expression of *Hif1*. Furthermore, it is considered that the vasculogenesis is related with ameloblast differentiation to calcify the enamel matrix.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：歯の発生 血管新生 上皮間葉転換 エナメル器 星状網

1. 研究開始当初の背景

歯の発生過程では鐘状期後期になると上皮であるエナメル器の星状網内に血管が侵入する(図1)。しかし、正常な歯の発生過程でなぜ上皮中に血管が侵入してくるのか、その生理的な役割は何であるか全くわからない。最近我々は、鐘状期前期の星状網の一部が **MSC** のマーカーである **CXCR4**, **N-cadherin**, **ビメンチン**, **EMT** に関わる **Tgf- β** , **slug**, **snail** などの因子を発現していることを証明した。さらに分担研究者は **MSC** がギャップ結合を通じて血管内皮細胞の増殖や分化, アポトーシスを調節している可能性も示した (Otsu et al., Blood, 2006)。また、骨髄では **MSC** と血管との間で幹細胞 niche が形成されていることも報告された。以上のことから、この星状網の血管新生には **EMT** によって生じた **MSC** が重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで、星状網内での **EMT** の現象を明確に捉えて、さらに **EMT** で生じた **MSC** の細胞学的特徴を調べることで血管新生との関連性を証明できれば、血管新生の新規メカニズムの発見につながると考えた。(図1)

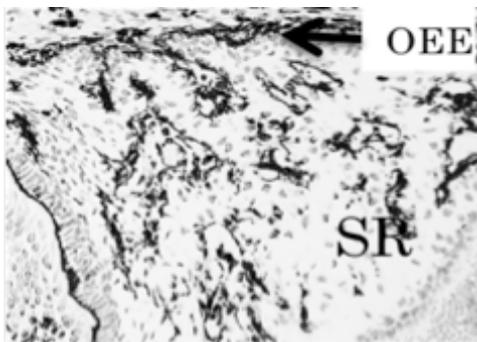


図1. マウス(E18)の下顎第1大白歯歯胚のVI型コラーゲンの免疫染色。エナメル器内に複雑に入り込んだ血管網が観察できる。

2. 研究の目的

表皮や粘膜上皮などの上皮組織内には血管は見られない。歯の発生過程では、鐘状期前期までは上皮内に血管は見られないが、後期になるとエナメル器星状網は血管が複雑に入り込んだ構造を形成するようになる。血管新生の分子機構は、細胞培養や分子生物学的研究から解明されつつあるが不明な点も多い。そこで、この星状網と血管新生との関係を詳細に調べることによって、従来にはない血管新生の新しい

メカニズムの発見につながると考えた。我々は、星状網細胞の一部がビメンチンや slug などを発現する結果を得たことから、上皮間葉転換(**EMT**)によって生じる間葉系幹細胞(**MSC**)が血管新生に重要な役割を果たしている可能性を考え、この仮説を証明する計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) **K14-cre-Rosa26R** マウス(東京医科大学より供与済み)をかけて、一度 **K14** を発現した上皮細胞は β -ガラクトシダーゼ(**β -gal**)を発現しつづける遺伝子改変マウス(**K14-cre/Rosa26R**)を作製する。このマウス歯胚における **β -gal** の発現と血管内皮細胞のマーカーである **CD31** や間葉系細胞のマーカーである **vimentin** との2重染色を行い、星状網細胞が血管内皮細胞に分化したかを検討した。

(2) 歯胚の成長過程での星状網の発生を観察するために、歯胚の器官培養法の開発と歯胚細胞の動態をリアルタイムで観察した。

(3) 歯胚の成長過程での星状網内の血管構築過程を観察するために、血管内皮細胞のマーカーである **Flk-1** が **GFP** を発現する **Flk1-GFP** マウスを用いて、**GFP** 陽性細胞の歯胚形成過程での動態を観察した。

(4) 星状網に発現する上皮間葉転換関連遺伝子と血管構築に関わる因子群の発現を免疫組織学的に観察した。

4. 研究成果

(1) 歯の発生過程では、後期になるとエナメル器星状網は血管が複雑に入り込んだ構造を形成するようになる。間葉特異的プロモーターを用いたマウス **mesp1-cre-Rosa26R** マウスによる **β -gal** の染色と血管内皮細胞マーカーとの2重染色の結果から、ほとんどの血管内皮細胞の由来は中胚葉系の細胞で歯胚の外から進入してくることが明らかとなった。しかし、**K14-cre-Rosa26R** マウスを用いた解析では一部の細胞で **β -gal** 陽性の細胞と **CD31** 陽性細胞が重なって観察される部位が存在することから、星状網細胞の一部が血管内皮細胞に転換して血管構築に寄与する可能性も示唆された(図2)。しかし、画像の解像度等の問題もあり、これについては今後も詳細な検討が必要である。

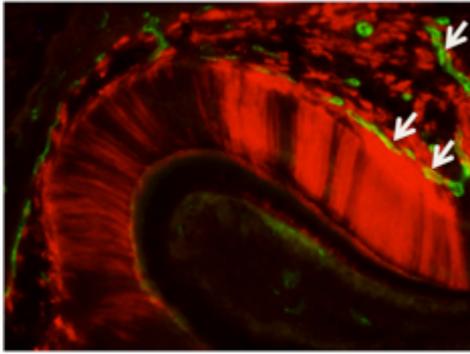


図2。マウス (E18) の下顎第 1 大白歯歯胚。 β -gal (CK14 発現細胞; 赤) と CD31 (血管内皮細胞マーカー) の 2 重染色。矢印はこれらの発現が重なって黄色に観察される。

(2) 歯胚エナメル器での血管構築をより詳細に観察するために、血管内に DiI を注入した歯胚を蛍光実体顕微鏡で観察した。その結果、咬頭頂にそって血管網が形成されており、エナメル上皮の分化に伴って血管網が構築されることが示された (図 3)。

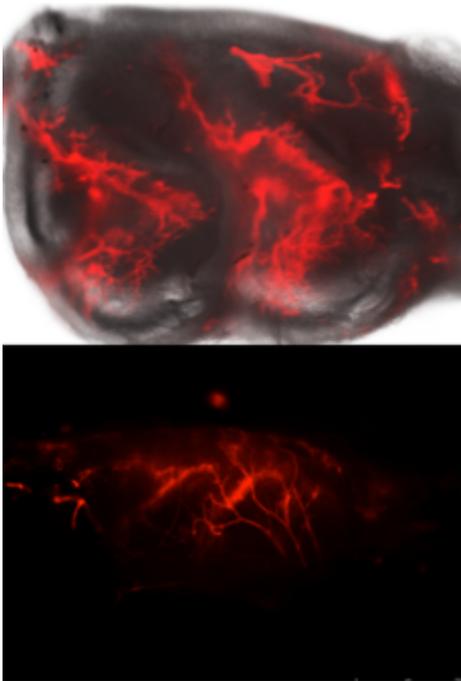


図3。マウス (PN5d) 下顎第 1 大白歯歯胚での DiI 血管注入観察。分化したエナメル芽細胞の上部に沿って血管網の構築が観察できる。

(3) Flk1 (VEGF2R)-GFP マウスによる歯胚周囲での血管構築を観察した。その

結果、歯胚周囲に血管網を構築した後に、鐘状期後期になると星状網内に血管内皮細胞が浸潤して中間層細胞の外側に新たな血管網を構築することを認めた。この血管構築とエナメル芽細胞の分化とが密接に関連していた (図 4)。

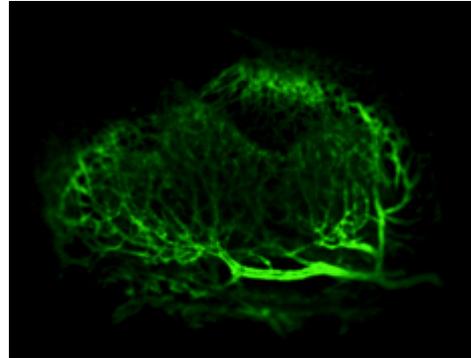


図4。マウス (PN5d) 下顎第一大臼歯歯胚エナメル器に見られる Flk1-GFP 陽性細胞の分布。

(4) 星状網細胞の発生との関連を調べるために、GFP マウスを用いて歯胚発生過程での細胞の動態を観察した。その結果、星状網の細胞は内エナメル上皮細胞の増殖によって中間層細胞を経由して発生することが明らかとなった (図 5)。

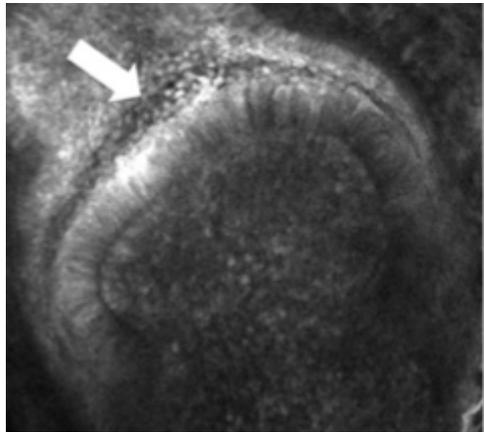


図5。GFP マウス臼歯歯胚発生過程のリアルタイムイメージング。星状網細胞が内エナメル上皮細胞の増殖と細胞移動によって形成される過程が観察できる。

(5) HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) は低酸素環境で活性化し、下流の遺伝子発現を制御する転写因子である。鐘状期前期臼歯における内エナメル上皮細胞や星状網細胞で HIF1 α の強い発現が認められたことを発見した (図 6) ことから、これらの細胞が低酸素環境下にあることがわかった。さらに、この発現パターンと血

管網の構築との関係から、HIF1 α の発現が血管網の誘導に関与していることが推測できた。また HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) が間葉系幹細胞で Rho シグナルを制御しているという報告 (Raheja, 2009) や星状網内では Rho シグナルの活性が低下することから、Rho シグナルを介した上皮間葉転換と血管誘導との関係が密接に関連していることが考えられた。

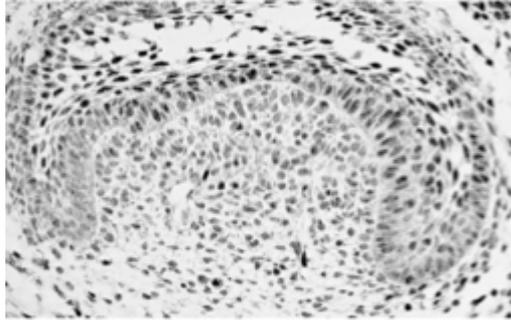


図6。マウス(E18)下顎第1臼歯におけるHIF1 α の発現。内エナメル上皮や星状網で強い発現が観察される。

5. 主な発表論文等

「雑誌論文」(計17件)

- ① Koizumi Y, Kawashima N, Yamamoto M, Takimoto K, Zhou M, Suzuki N, Saito M, Harada H, Suda H. Wnt11 expression in rat dental pulp and promotional effects of Wnt signaling on odontoblast differentiation. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2013 Sep;53(3):101-8 査読有り
- ② Jedeon K, De la Dure-Molla M, Brookes SJ, Loiodice S, Marciano C, Kirkham J, Canivenc-Lavier MC, Boudalia S, Bergès R, Harada H, Berdal A, Babajko S. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *Am J Pathol*. 2013 Jul;183(1):108-18. doi:10.1016/j.ajpath.2013.04.004. Epub 2013 Jun 10 査読有り
- ③ Ida-Yonemochi H, Harada H, Ohshima H, Saku T. Reciprocal expressions between α -dystroglycan and integrin β 1, perlecan receptors, in the murine enamel organ development. *Gene Expr Patterns*. 2013 Dec;13(8):293-302. doi:10.1016/j.gep.2013.05.004. Epub 2013 May 27. 査読有り
- ④ Zheng L, Seon YJ, Mourão MA, Schnell S, Kim D, Harada H, Papagerakis S, Papagerakis P. Circadian rhythms regulate amelogenesis. *Bone*. 2013 Jul;55(1):158-65. doi:10.1016/j.bone.2013.02.011. Epub 2013 Feb 26. 査読有り
- ⑤ Ishihata K, Kume K, Hijioka H, Kibe T, Tanaka S, Komatsuzawa H, Harada H, Nakamura N. Expression of antimicrobial peptides and E-cadherin in periapical lesions. *Oral Science International* Volume 10, Issue 2, May, Pages 70–76 2013 査読有り
- ⑥ Chavez MG, Yu W, Biehs B, Harada H, Snead ML, Klein OD. Characterization of Dental Epithelial Stem Cells from the Mouse Incisor with 2D and 3D Platforms. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013 Jan;19(1):15-24 査読有り
- ⑦ Sakano M, Otsu K, Fujiwara N, Fukumoto S, Yamada A, Harada H. Cell dynamics in cervical loop epithelium during transition from crown to root: implications for Hertwig's epithelial root sheath formation. *J Periodontal Res*. 2013; 48:262-267 査読有り
- ⑧ Sakuraba H, Fujiwara N, Sasaki-Oikawa A, Sakano M, Tabata, Y, Otsu K, Ishizeki K, Harada H. Hepatocyte growth factor stimulates root growth during the development of mouse molar teeth. *J Periodontal Res*. 47(1):81-88, (2012) 査読有り
- ⑨ Otsu K, Kishigami R, Oikawa-Sasaki A, Fukumoto S, Yamada A, Fujiwara N, Ishizeki K, Harada H. Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. *Stem Cells Dev*. May 1;21(7):1156-64. (2012) 査読有り
- ⑩ Kishigami, R., Otsu, K., Oikawa-Sasaki, A., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Tabata, Y., Harada, H.: Histological analysis of epithelial stem cells during induced pluripotent stem cell-derived teratoma development. *J. Oral Biosci*. 54:58–65

(2012) 査読有り

- ⑪ Ida-Yonemochi, H., Nakatomi, M., Harada, H., Takata, H., Baba, O., Ohshima, H.: Glucose uptake mediated by glucose transporter 1 is essential for early tooth morphogenesis and size determination of murine molars. *Dev. Biol.* 363(1): 52-61 (2012) 査読有り
- ⑫ 及川 愛, 大津圭史, 藤原尚樹, 石関清人, 中富満城, 大島勇人, 原田英光. エナメル質の横紋形成メカニズムの解明. *岩医大歯誌*. 37:14-23 (2012)査読有り
- ⑬ Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem.* 287(13): 10590-10601, 2012 査読有り
- ⑭ Sathi GA, Tsujigiwa H, Ito S, Siar CH, Katase N, Tamamura R, Harada H, Nagatsuka H. Osteogenic genes related to the canonic WNT pathway are down-regulated in ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Dec;114(6):771-7査読有り
- ⑮ Xu J, Kawashima N, Fujiwara N, Harada H, Ota MS, Suda H. Promotional effects of vasoactive intestinal peptide on the development of rodent Hertwig's epithelial root sheath. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2012 Sep;52(3):162-7 査読有り
- ⑯ 大津圭史, 藤原尚樹, 原田英光: 幹細胞 (Stem Cell) 研究がひらく歯の再生の扉. *日本歯科評論*. 72(8):9-11 (2012) 査読無
- ⑰ 大津圭史, 藤原尚樹, 原田英光: iPS細胞から神経堤細胞への分化誘導法の確立. *Dental Diamond*. 37(541):92-95 (2012) 査読無

[学会発表] (計20件)

- ① Harada, H., Otsu, K., Sakano, M., Fujiwara, N. Role of Rho signaling during amelogenesis. Tripartite Conference (Korea- China- Japan) on Tooth and Bone; Development & Regeneration" in Seoul, Korea will hold an International

Symposium on "Tooth and Bone; Development & Regeneration" Seoul, Korea, on August 7-11, 2013

- ② 原田英光、大津圭史, 藤原尚樹, 坂野深香. イメージングを駆使した歯の発生の新たな理解への挑戦. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山, 2013年 9月 20-22日
- ③ 原田英光: エナメル上皮幹細胞研究から考えるヒトの歯の再生に向けた戦略と展望. 第58回日本口腔外科学会総会・学術大会. 10/12 福岡 2013
- ④ 原田英光: ヒトの歯の再生に向けた戦略と展望. 第11回日本再生歯科医学会総会・学術大会. 8/31 東京(日本大学松戸歯学部主催) 2013
- ⑤ 原田英光 藤原尚樹 大津圭史 Introduction-エナメル上皮幹細胞研究の国際的潮流と今後の展望第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013年3月28-30日, *解剖学雑誌* 88(Suppl): 100, 2013.
- ⑥ Hidemitsu Harada, Keishi Otsu, NaokiFujiwara. Adult stem cells versus iPS cells for human tooth regeneration. 2012 International Conference on Tooth and Bone Development and Regeneration. Chengdu, China, Aug. 10-12, 2012
- ⑦ Harada, H., Otsu, K., Sakano, M., Fujiwara, N Stemness of dental epithelial stem cells considering feature of dental epithelial cells. International Symposium Frontier Meeting, Seoul/Jeonju 2013 Development, Evolution, Taxonomy, and Genetics of Tooth Structure "Tooth Voyage, Up To Date", Jeonju, Korea, 2013. 2. 12-15.
- ⑧ Sakano, M, Otsu, K., Fujiwara, N., Harada, H. Cell dynamics in cervical loop epithelium during transition from crown to root: implications for Hertwig' epithelial root sheath formation. International Symposium Frontier Meeting, Seoul/Jeonju 2013 Development, Evolution, Taxonomy, and Genetics of Tooth Structure "Tooth Voyage, Up To Date", Jeonju, Korea, 2013. 2. 12-15.
- ⑨ 依田浩子, 大島勇人, 原田英光: AKTシグナルがグリコーゲン代謝を促進しエナメル芽細胞分化を誘導する. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山, 2013年 9月20-22日, *J Oral Biosci Suppl* 2013, p.191, 2013
- ⑩ Hidemitsu Harada: Dental epithelial stem

cells and tooth regeneration. The 2012 International symposium, Dental and Cancer Stem cells. School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea Oct 6, 2012

- ⑪ 原田英光：「歯の発生・成長メカニズムから考える歯と歯周組織再生への展開」第28回東北矯正歯科学会大会 仙台 5/20 2012
- ⑫ 大津圭史 藤原尚樹 原田英光: iPS細胞から歯原性間葉細胞への分化誘導, 第11回再生医療学会総会.6月、横浜, (2012)
- ⑬ 大津圭史 原田英光: ライブイメージングでとらえる歯の発生メカニズム, 第117回 日本解剖学会総会・全国学術大会 研究集会・懇話会 歯の発生の会シンポジウム 3月 山梨 (2012)
- ⑭ 原田英光、江草 宏：口腔領域におけるiPS細胞研究の現状と展望、第54回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、サテライトシンポジウム3「口腔領域におけるiPS研究の現状と展望」、9月14日、郡山 (2012)
- ⑮ 大津圭史：iPS細胞から象牙芽細胞への分化誘導技術の開発と歯の再生への応用、第54回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、サテライトシンポジウム3「口腔領域におけるiPS研究の現状と展望」、9月14日、郡山 (2012)
- ⑯ 藤原尚樹、坂野深香、大津圭史、原田英光：幹細胞成長因子による歯根形成の誘導、第54回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、サテライトシンポジウム5「歯根・歯周組織-ユニットのセレンディピティ」9月14日、郡山 (2012)
- ⑰ 原田英光：「歯の発生・成長メカニズムから考える歯と歯周組織再生への展開」第28回東北矯正歯科学会大会 仙台 5/20 2012
- ⑱ Keishi Otsu, Hidemitsu Harada: The role of Rho signaling pathway in dental epithelial stem cells., Gordon Research Conference, Craniofacial development an regenerative medicine., March, 17-24, 2012, CA, U.S.A.
- ⑲ Keishi Otsu, Ryota Kishigami, Ai Oikawa-Sasaki, Naoki Fujiwara, Kiyoto Ishizeki, Hidemitsu Harada, The role of Rho signaling pathway in dental epithelial stem cells. 117回 日本解剖学会総会・全国学術大会 3月 山梨 (2012)
- ⑳ 藤原尚樹、大津圭史、坂野深香、太田正人、原田英光：天然低分子化合物、ハル

ミンの歯根形成促進作用、第54回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、9月16日、郡山 (2012)

[図書] (計1件)

- ① Otsu, K., Fujiwara, N., Harada, H. Organ Cultures and Kidney-Capsule Grafting of tooth germs (Eds; Chrissa Kioussi, Odontogenesis: Methods and Protocols, Human Press SPRINGER SCIENCE) 887:59-67, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 英光 (Harada, Hidemitsu)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：70271210

(2) 研究分担者

原田英光 (Harada, Hidemitsu)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：70271210

依田 浩子 (Ida, Hiroko)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：60293213

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

井関 祥子 (Iseki, Sachiko)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：80251544