

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592776

研究課題名(和文)細胞遊走を制御する分子メカニズムとヘルトビッチ上皮鞘の伸長との関係

研究課題名(英文) Relationship between development of Hertwig's epithelial root sheath and molecular mechanism that controls cell migration.

研究代表者

藤原 尚樹 (Fujiwara, Naoki)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号：20190100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：K14-タモキシフェン誘導型Rho signaling (RS)ドミナントネガティブマウス、生後歯胚成長に特化した器官培養、細胞培養を用いて行ったRSの機能獲得・喪失実験からヘルトビッチ上皮鞘(HERS)の発達に対するRSの調節作用について検討した結果、RSは細胞内アクチンの局在の調節を通して、細胞突起の形成を含む細胞形態・細胞遊走性や細胞増殖を調節し、歯根形成期臼歯歯胚に見られるHERSの形態的特徴である2層の細胞層の形成と維持、さらにはセメント質形成を誘起する原因となるHERSの断裂の調節に関わり、結果として歯根形成全体を制御する重要な分子メカニズムの1つであることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined to clarify the role of Rho signaling (RS) for development of Hertwig's epithelial root sheath (HERS) with implementation of gain/loss of function examinations using K14cre/tamoxifen-induced RS dominant negative mice, original organ culture for observation of postnatal tooth development, and cell culture of HERS-derived cell line, HERS01a. RS regulated cell morphology such as cell processes, and cell migration through modulation of actin localization in cytoplasm, and cell proliferation in HERS cells and HERS formation. Activation of RS induced long bilayered HERS on root dentin matrix without disintegration of epithelial sheet. Interestingly, this phenomenon was similar to effects induced by inhibitor of TGF- β . RS is closely related to formation and maintenance of bilayered HERS sheet and regulation of disintegration in HERS during mouse molar root development. Our studies revealed that RS is one of important mechanisms in regulation of root development.

研究分野：口腔組織・発生学

キーワード：臼歯歯根形成 ヘルトビッチ上皮鞘 細胞遊走 Rho signaling アクチン タモキシフェン誘導型ドミナントネガティブマウス 器官培養 HERS01a細胞株

1. 研究開始当初の背景

マウス臼歯の歯冠形成期から歯根形成期への移行はHERS形成によって開始し、このHERSが歯根形成の誘導と調節に関わることは良く知られている。HERS形成は活発な細胞増殖によって生じ、我々はこれまでHERS細胞増殖に及ぼす成長因子の影響 (Fujiwara et al., Cell Tissue Res., 2005; Fujiwara et al., J. Exp. Zool. Mol. Dev. Evol., 2009; Sakuraba et al., J. Period. Res., 2011) を報告してきた。また2007-2008年度科研費基盤(C)においてHERS形成過程のイメージング技術の開発を行い、成長因子添加による形態変化を解析し、その中でアクチンプロモーター・GFPマウスのHERS先端部でアクチンの転写活性が高まっていることが分かった。

上皮細胞を含む様々な細胞でRho familyタンパク質やその下流のエフェクター分子がアクチン骨格などを介して細胞形態・極性の変化、遊走などを担っていることが報告されている (Kawauchi et al., Dev. Neurosci., 2007)。我々はマウスエナメル上皮細胞とHERS細胞株にRho関連蛋白キナーゼ (ROCK) のinhibitor (Y-27632) を作用させたところ、組織化されたアクチンの細胞内局在の消失 (Fig. 2)や敷石状の上皮特異的な形態から細胞質突起を伴う間葉細胞様の形態への変化を示すことが分かった。

これらのことを総合的に考え合わせた結果、「HERS形成過程において、HERS先端方向へのHERS細胞の遊走 (HERS 伸長) にRhoシグナリング/アクチンの調節機構が重要な役割を果たしている」と言う仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究は Hertwig 上皮鞘 (HERS) 形成の際に見られる HERS 細胞の先端方向への遊走に Rho シグナリング/アクチン調節機構が果たす役割を明らかにするため、(1) in vivo における Rho signaling の発現パターン、(2) タモキシフェン誘導型 K14-Cre/ RhoA dominant negative form Tg マウスとタモキシフェン誘導型 K14-Cre/ ROCK dominant negative form Tg マウス臼歯で Rho シグナリングと HERS 形成との関わりについて形態観察・組織化学的解析、(3) HERS 細胞株を用いた Rho signaling と遊走の関係、また(4) 器官培養系を用いたライブイメージングによる観察などを行い、Rho シグナリングと細胞遊走による HERS 伸長の関係を考察するのが目的である。

3. 研究の方法

(1) in vivo HERS における Rho シグナリング因子の発現パターンの解析
生後0日から7日齢までのHERS形成開始期において、RhoA, active RhoA, ROCK と歯胚上皮の特異的のマーカースとしてサイトケラチ

ン (CK) 14 を用い、これらの2重免疫組織化学染色を施し、蛍光顕微鏡で発現パターンを解析した。

(2) タモキシフェン誘導型トランスジェニックマウスによる Rho シグナリングと細胞遊走の関係についての解析

タモキシフェン(TAM)誘導型 K14-cre マウス (Jackson Lab より購入) と CMV プロモーターの下流に loxP 配列で挟まれた CAT 遺伝子と RhoA または ROCK のドミナントネガティブ変異体 (ROCK-DN) の導入遺伝子を有するマウス (RBRC02866; 理化学研究所より供与) から、タモキシフェン誘導型上皮特異的 RhoA-DN, ROCK-DN 発現マウス (K14-CreERTM/RhoA-DN⁺, K14-CreERTM/ROCK-DN⁺) を作製した。これら2種類のマウスにおいて、タモキシフェンを投与し、臼歯の形態、HERS の分化・伸長について組織化学的に Wild type マウスと比較検討した。

(3) HERS 細胞株における Rho シグナリングと細胞遊走の関係についての解析

マウス HERS 由来細胞株、HERS01a を用いて、Rho activator, ROCK inhibitor を培地に添加して Rho シグナリングの機能獲得・喪失実験を行う。培養終了時に、phalloidin 染色を施し、細胞内のアクチンの局在変化を細胞イメージングシステムにより解析した。

(4) 器官培養を用いた歯根形成に及ぼす Rho シグナリングの作用の解析

生後臼歯に特化したオリジナルの器官培養系を用いて、Rho シグナリングによるアクチン制御が HERS 伸長に及ぼす影響を、Rho activator, ROCK inhibitor の添加による機能獲得・喪失実験を行い、マウス下顎臼歯の歯根形成と、特に HERS の発達への影響をイメージングシステムで解析すると共に、BrdU を用いて HERS における細胞増殖への影響についても検討した。

4. 研究成果

本研究において、Rho シグナリング/アクチン調節機構による HERS 細胞の遊走メカニズムを検証するために、研究計画に沿って以下の実験を行った。

(1) in vivo HERS における Rho シグナリング因子の発現パターンの検証

ヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) が分化前 (歯冠形成期) である生後2日、HERS の分化直後である6日、HERS 伸長期10日、歯根が伸長し歯が口腔内へ萌出する直前である14日、の時期のマウス下顎第一臼歯を摘出し、急速凍結にて未固定のまま包埋し、Film transfer 法にて6μm の凍結切片を作成した。RhoA, ROCK1, active RhoA などの発現パターンを免疫組織化学的に蛍光顕微鏡で確認し、HERS を含むエナメル上皮に発現していることを確認した。

(2) タモキシフェン(TAM)誘導型トラン

スジェニック(Tg)マウスの作成。
歯胚上皮特異的マーカー cyto-keratin14(K14) / TAM 誘導型 RhoA ならびに ROCK のドミナントネガティブ(DN)マウスの繁殖系と genotyping による確認操作を確立した。次に DN 新生仔マウスに対する TAM 投与の至適条件の検索を行い、背部皮下の異なる場所に 30-50 μ l (濃度 30 μ g/ml) の TAM を生後(PN) 3 日 (以降) から 3 日間投与することで DN 特性を発現した個体を得られることが明らかとなった。PN 3 日以前の個体への腹腔投与、また皮下への TAM 投与は死亡する新生仔が多く、実験に適さないことが判明した。

(3) TAM 誘導型 Tg マウスによる RhoA と ROCK の作用

Tg マウスに対して、PN 3 日から 3 日連続あるいは PN8 日から 3 日連続で TAM を投与し、最終投与後 5 日後ないし 7 日後に genotyping をするとともに、マウス頭部の固定・脱灰・パラフィン包埋を通報に従って行った。RhoA-DN と ROCK-DN マウスを得ることに成功したが、形態学的観察の結果、より明瞭な抑制効果を観察できるのは RhoA-DN であったので、以後このマウスを用いて実験を行った。RhoA-DN マウスから得た下顎第一臼歯の組織学的特徴を対照群と比較した結果、歯根が顕著に短く、対照群の半分程度の長さしかなかった。また、対照群の臼歯脱灰後、成熟エナメル質があった領域がきれいに空隙になっているのに対し、PN3 から TAM を投与したマウスでは、歯冠部のエナメル質形成が未熟で、DN マウスのエナメル質はタンパクが残存し、エナメル質形成が遅延していることが考えられた。また、歯冠部を被うエナメル芽細胞を含むエナメル上皮の極性が失われ、丈が低くなると共に配列が乱れていた一方で、歯冠象牙質や象牙芽細胞などに大きな変化は見られなかった。また、対照群の歯胚において、形成中の歯根の先端から歯根象牙質上にかけて見られる伸長した 2 層の細胞層からなる HERS と、その歯頸部端に (後に Malassez の上皮遺残を形成する) 断裂が見られるのに対して、DN マウスの HERS は短く抑えられ、歯根象牙質上にはわずかに上皮細胞が観察できるのみで、HERS 構成細胞数が顕著に少なくなると共に、正常な組織構築が失われていることが明らかとなった。

(4) 器官培養による Rho signaling の機能獲得・喪失実験

PN5 (歯根形成開始期) と PN9 (歯根伸長期) の slc:ddY マウスの下顎第一臼歯歯胚を、歯根形成期の観察のために我々の研究室で独自に開発した器官培養システム (Fujiwara et al. 2005) で培養を行った。Rho signaling の inhibitor である Y27632 を培地に添加して培養した PN5 の歯胚を 7

日間または 14 日間培養した歯胚は、対照群と比較し、歯根形成が阻害された。歯根は短く、本来、歯髓と歯小囊の間に 2 層の上皮細胞層として存在する HERS の歯髓側には象牙質基質が裏打ちするように存在していた。HERS は歯髓組織との相互作用で歯根形成を誘導するのであるが、HERS の直下にある象牙質基質により歯髓細胞との相互作用が阻害され、歯根長が短くなる結果をもたらしたと考えられる。また、HERS 自体も典型的な 2 層の細胞層によって構成されておらず、象牙質に面する内エナメル上皮と歯小囊に面する外エナメル上皮細胞の間にも細胞が見られ、サービカルループの組織構築に似た構造となっていた。これらの観察結果は DN マウスの結果に類似していた。

一方、Rho activator を添加して培養した臼歯の歯根はほぼ正常な長さまで発達し、2 層の上皮細胞からなる HERS も伸長した。しかし、歯根象牙質上に伸びた HERS は、正常で歯頸部端に見られる断裂がほとんど見られず、上皮シートとして長く連なっていた。この結果は RhoA が歯根形成誘導に関わる HERS 発達、特に HERS 細胞の増殖や上皮シートの断裂に作用し、結果として歯根形成においても、重要な調節作用をもっていることが明らかとなった。また、この activator を添加して培養した HERS の形態的特徴は、上皮間葉転換 (EMT) の誘導に関わる TGF- β の inhibitor を添加し器官培養した HERS にみられる特徴と類似しており、歯根形成過程における Rho signaling と EMT との関連性を示唆する結果であると考えている。

なお、実験計画では器官培養は slice culture として、組織をスライスした後に培養する予定であった。しかし、様々な条件を変更し、試料作成を試みたが、再現性のあるスライス組織を得るのには非効率であった。そのため我々の研究室で別に開発した、生後歯胚の成長の観察に特化した器官培養系に計画を変更して実験を行い、上記のような結果を得た。

(5) HERS 細胞株における Rho signaling の機能獲得・喪失実験

Rho signaling と HERS 細胞の遊走との関連について HERS 細胞株 HERS01a を用いて実験を行った。

HERS01a を 6 穴マルチウェルディッシュに 5000 個播種し、1 週間後ファロイジンを用いて蛍光観察した。Rho Activator 添加群の細胞は細胞膜近くにアクチンの集積が観られ、コロニー中心部の細胞はコンパクトに密集していた。一方、Rho signaling inhibitor 添加群ではアクチンが細胞質内に広く拡散し、コロニー辺縁の細胞は細い細胞質突起を多数持っており、さらにはコロニーから少し離れた所にも同様の間葉系の形態的特徴を呈した細胞が多数観察され

た。このことは Rho signaling はアクチンの細胞内局在を制御することで、細胞遊走の調節に関わり、さらには HERS に EMT を誘導し、断裂や断裂後の細胞遊走にも関わる可能性を示唆すると考えられた。

6) 器官培養によるライブイメージング実験

実際の HERS の歯根形成に伴う細胞遊走現象をとらえるために、cytokeratin14 (CK14) cre マウスと rosa26R dtTomato マウス (K14/tdTomato マウス) を交配させ、CK14 を特異的に発現する歯胚上皮細胞にのみ赤色蛍光を発現する新生仔を作成した。本マウスは我々の研究室で、別の研究のために購入し、岩手医科大学動物研究センターで維持しているもので、本研究のために一部供与された個体を用いた。また蛍光実体顕微鏡も本研究室で稼働中のものを用い、ライブイメージング撮影を試みている。現在、新生仔の genotyping 後、下顎第一臼歯歯胚を摘出し、器官培養下でタイムラプス撮影を行っており、これまでにない明瞭な細胞動態の撮影を取得中である。またさらに今後、撮影条件の改良と共に、撮影開始時期を経時的に変え、より情報量の多いイメージングデータ取得をめざす予定である。

当初の実験計画では slice culture によるイメージングを予定していたが、すでに上に記したように slice tissue を用いる実験系よりも、本課題の実験開始後利用可能となった K14/td Tomato マウスを用いた方が、より簡便で、in vivo に近い形態観察が可能であることが判明したため、最終年度にこのマウスを用いる実験系に計画変更した。

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)

- (1) Otsu K., Sakano M., Masuda T., Fujiwara N., Harada H.: The role of Rho-kinases in ameloblast differentiation. *Journal of Oral Biosciences*. 2013;55(4):159-164. 査読有, doi:10.1016/j.job.2013.07.001
- (2) Otsu, K., Fujiwara, N., Harada, H.: Organ cultures and kidney-capsule grafting of tooth germs. *Methods Mol Biol*. 887:59-67, 2012. 査読有, doi:10.1007/978-1-61779-860-3_7
- (3) 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, e-pub 14 Sep 2012, 査読有, DOI: 10.1111/jpre.12003
- (4) Kumakami-Sakano M., Otsu K., Fujiwara N., Harada H.: Regulatory mechanisms of

Hertwig's epithelial root sheath formation and anomaly correlated with root length. *Exp. Cell Res*. 325(2): 78-82 (2014), 査読有, doi:10.1016/j.yexcr.2014.02.005

(雑誌論文)(計 0 件)

(学会発表)(計 17 件)

- (1) Otsu, K., Harada H.: 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.
- (2) 藤原尚樹, 坂野深香, 大津圭史, 原田英光: 肝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-ユニットのセルンディピティ」9 月、郡山 (2012)
- (3) 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、郡山 (2012)
- (4) 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. シンポジウム: 齧歯類切歯の恒常的成長を支えるエナメル上皮幹細胞を考える. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 3 月 28-30 日 高松 (2013)
- (5) 大津圭史, 坂野深香, 増田智幸, 藤原尚樹, 原田英光: エナメル上皮幹細胞における Rho シグナリングの役割. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 3 月 28-30 日 高松 (2013)
- (6) 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, Aug. 7-11, 2013
- (7) 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.
- (8) Fujiwara N., Ota M., Sakano M., Otsu K., Woo JT, Harada H.: Stimulation of root formation and regeneration by natural compound. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation,

La Londe Les Maures, Feance, May 26-31, 2013

- (9) Oka K, Kira M, Tsuruga E, Harada H, Fujiwara N, Sawa Y, Ozaki M: The role of fibrillin during tooth root and periodontal ligament tissue development. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, La Londe Les Maures, Feance, May 26-31, 2013
- (10) Otsu K, Sakano M, Masuda T, Fujiwara N, Harada H: Role of Rho-GTPase in dental epithelial stem cell. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, La Londe Les Maures, Feance, May 26-31, 2013
- (11) Fujiwara N: The role of Rho signaling in HERS development. -pilot study-. The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program 2013 Japan (Iwate Medical Univ) - (Yonsei Univ) Joint Research Project (JSPS) Seminar. Morioka, Japan. Dec 20-21, 2013
- (12) 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. シンポジウム: バイオイメージングの最前線 -歯科基礎医学会医学研究を照らす新しい光-. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会. 9月20-22日 岡山 (2013)
- (13) Fujiwara N: The role of Rho signaling in HERS development. The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program for FY 2014. Seoul, Korea, Nov. 10-11, 2014
- (14) 熊上 深香、大津 圭史、藤原 尚樹、原田 英光: 歯根発生メカニズムの新規仮説と歯根形態異常 第56回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9月25-27日 福岡 (2014)
- (15) 岡 暁子、板家 智、吉良 迪子、藤原 尚樹、原田 英光: 歯周組織発生制御における HERS の新規役割 第56回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9月25-27日 福岡 (2014)
- (16) 大津圭史、熊上-坂野 深香、増田 智幸、藤原尚樹、原田英光: Semaphorin 4D - Rho A シグナルによるエナメル芽細胞分化制御. 第56回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9月25-27日. 福岡 (2014)
- (17) 藤原 尚樹、熊上 深香、大津 圭史、原田 英光: マウス臼歯歯根成長における Rho signaling の役割. 日本解剖学会 第60回東北・北海道連合支部学術集会. 9月6-7日. 福島 (2014)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://oralhist.iwate-med.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 尚樹 (Fujiwara Naoki)
岩手医科大学 歯学部 准教授
研究者番号: 20190100

(2) 研究分担者

帖佐 直幸 (Chousa Naoyuki)
岩手医科大学 歯学部 助教
研究者番号: 80326694

(3) 連携研究者

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

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