

研究者：日野 綾子（所属：東北大学病院 小児歯科）

研究題目：アクチン結合タンパクフィラミン-Aによる歯根形成メカニズムの解析

目的：

歯の形成メカニズムの解析は、歯の形成異常を引き起こす疾患の発症メカニズムを理解し、さらには歯などの口腔組織及び全身の組織再生へと応用可能な有益な知見となる。細胞増殖因子、細胞外マトリックス等の歯の発生段階における発現や、機能に関してはいくつかの報告があるが、細胞骨格を決定する分子群が歯の形成にどのように関わっているのかは、まだ報告がない。フィラミン-Aは、細胞骨格を担う分子であり、細胞接着因子インテグリン、膜内外受容体複合体やセカンドメッセンジャーと相互作用することによって、アクチンが細胞骨格の再編成を行うのを調整しているタンパク質である。しかし、歯の形成における役割は報告されていないため、歯の発生におけるフィラミン-Aの役割について検討した。

対象および方法：

1. 組織および歯原性上皮細胞の免疫染色

フィラミン-Aの組織および歯原性上皮細胞における発現を確認するために、免疫染色を行った。連続切片は、クライオスタットでOCT compoundを使用し、胎生13, 14, 16日、生後1日のICRマウスを用い作成した。4% paraformaldehyde (Wako) にて10分間固定した後、PBSにて10分間3回洗浄、1% Bovine Serum Albumin にてブロッキングを行い、1次抗体で1時間染色した。その後、PBSにて10分間3回洗浄、2次抗体で1時間染色し、再びPBSで10分間3回洗浄を行い、Vectashield (Vecta) を用いて封入した。1次抗体には anti-Filamin-A antibody (EPITOMICS) および Anti-Laminin β 1 antibody (Molecular Probes), 2次抗体には Alexa flow 488 Anti-Rabbit IgG (Molecular Probes), Alexa flow 594 Anti-Rat IgG (Molecular Probes) を使用した。歯原性上皮細胞株SF2細胞の免疫染色は、4% paraformaldehyde (Wako) にて10分間固定後、0.05% T-PBSに5分間浸漬し、PBSにて10分間3回洗浄した。1% Bovine Serum Albumin にてブロッキングを行い、1次抗体で1時間染色した。その後、PBSにて10分間3回洗浄、2次抗体で1時間染色し、再びPBSで10分間3回洗浄を行い、純水にて1度洗浄後、Vectashield (Vecta) を用いて封入した。1次抗体は anti-Filamin-A antibody (EPITOMICS) を、2次抗体は Alexa flow 488 Anti-Rabbit IgG (Molecular Probes) を使用した。また、 α -アクチンを染色するため、Alexia594-conjugated Phalloidin (Moleclular Probes) を用いた。

2. フィラミン-Aの発現抑制による細胞移動の検討

フィラミン-Aの歯原性上皮細胞における機能を解析するために、SF2細胞にフィラミン-A遺伝子に対するshRNAを過剰発現させた安定発現細胞株を作製した。Real-Time PCRにて、60%程度のフィラミン-Aの発現抑制が確認された細胞株(SF2-FLNashRNA2)と、20%程度

しか抑制されなかった細胞株（SF2-FLNAshRNA1）およびSF2細胞を、厚さ3mmのエラストマーシートで仕切った12well plateに培養した。細胞がコンフルエントになった時点でエラストマーシートを除去し、0, 6, 12, 24, 36, 48時間ごとにBiozero（Keyence）にて遊走能を観察した。

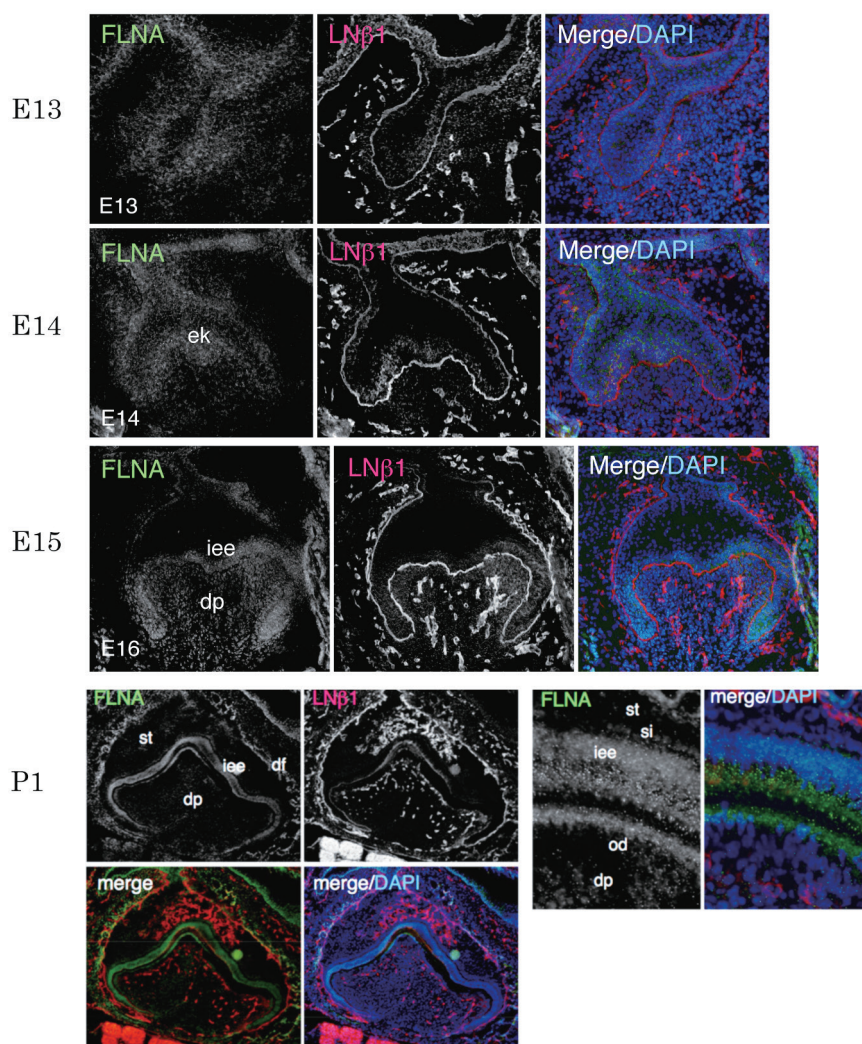
3. Melnick-Needles 症候群（MNS）患児における歯の表現系

フィラミン-Aの遺伝子変異は、頭蓋顔面の構造や骨格、脳、内臓、泌尿器感覚に影響を与え、神経細胞移動障害を引き起こすとされている。このフィラミン-A遺伝子変異による疾患の1つとしてMelnick-Needles症候群（MNS）が報告されている。本研究では、東北大学病院小児歯科を受診したMNSの患児の歯の表現系を解析した。症例の提出に関しては、保護者の同意を得ている。

結果および考察：

1. 組織におけるフィラミン-Aの発現

フィラミン-A分子は、歯胚発生の初期において特に内外エナメル上皮（iee）に強く発現

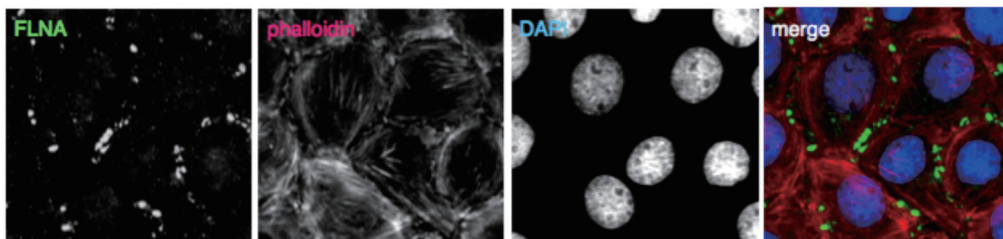


FLNA: filaminA, LNβ1: lamininβ1, st: 星状網, df: 歯小囊, dp: 歯乳
ek: エナメルノット, iee: 内エナメル上皮, od: 象牙芽細胞

し、その発現は出生直後においてはエナメル芽細胞および象牙芽細胞、歯小嚢（df）に局限していた。このことから、歯胚発生過程において、エナメル質、象牙質および歯根の形成に参与している可能性が示唆された。

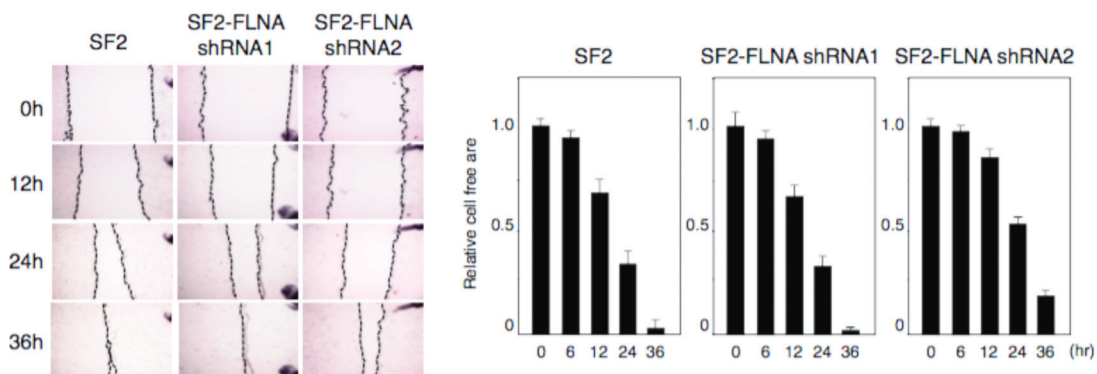
2. 歯原性上皮細胞におけるフィラミン-A の発現

歯原性上皮細胞において、フィラミン-A の細胞内局在について、F-アクチンと結合する phalloidin を使用し二重染色を行った。F-アクチンは細胞の表層に集積しているため、phalloidin 染色像は細胞の形態を示している。フィラミン-A はこの細胞骨格タンパク質であるアクチンの細胞膜側で重なり、特徴的な局在パターンを示した。このことから、フィラミン-A は細胞膜直下において、細胞外からの細胞接着刺激を細胞内に伝達し、F-アクチンの再構成に参与していることが考えられた。



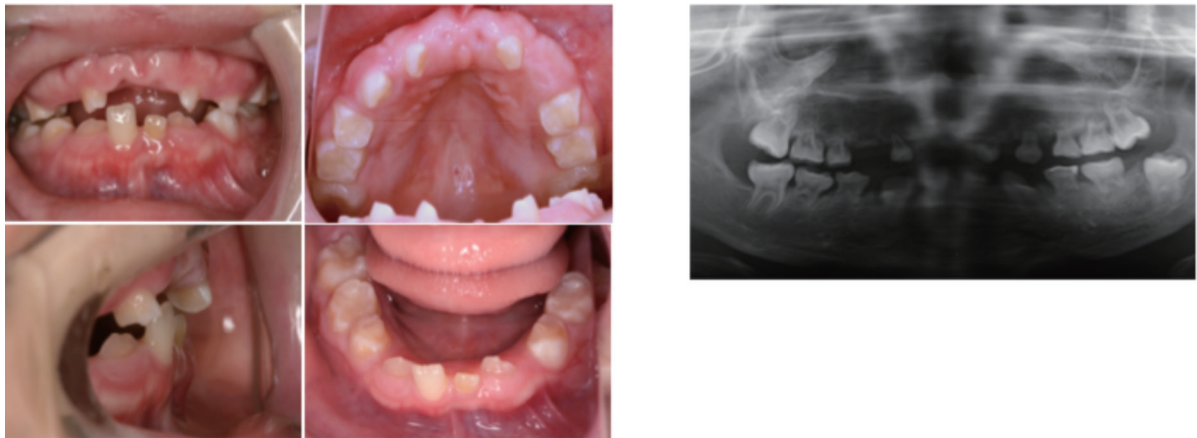
3. フィラミン-A の細胞移動能への影響

経時的な細胞の移動について検討を行った結果、遺伝子導入をしていない SF2 細胞と、抑制の程度が低い SF2-FLNAshRNA1 細胞では、36 時間では完全にスクラッチ部分が閉鎖するにも関わらず、SF2-FLNAshRNA2 細胞では、完全に閉鎖するにはいたらなかった。このことからフィラミン-A は歯原性上皮細胞の細胞移動に重要であることが示唆された。



4. MNS 患児における口腔内所見

患児は 15 歳 7 か月の女児で、7 歳 0 か月時に臨床的な所見から MNS と確定診断を受けた。本患児の口腔内の歯科的所見としては、永久歯の多数歯先天性欠如とともに、後続永久歯が欠如し、乳歯の動揺、脱落が認められた。エックス線所見にて、多数の永久歯の先天欠如と、乳歯の歯根は形成異常（短根歯）、薄いエナメル質を呈していた。



本研究においてフィラミン-A がエナメル上皮，エナメル芽細胞，象牙芽細胞に強く発現がみられたことから，エナメル質および象牙質の形成に重要と考えられた。また，内エナメル上皮と外エナメル上皮は増殖癒合し，ヘルトヴッヒ上皮鞘を形成する。上皮鞘の内エナメル上皮細胞は通常エナメル芽細胞には分化しないが，歯根部歯乳頭表層の細胞を象牙芽細胞に分化誘導する働きを担っており，歯根の形態発生に深く関与している。歯小嚢も支持組織を形成するため，これらの組織に限局して発現しているフィラミン-A が変異・欠損すると歯根を形成する細胞の分化誘導および細胞移動が上手くいかず歯根の形成異常をきたすことが示唆される。このことから，フィラミン-A 遺伝子が歯の形成において重要な役割を果たしていることは明らかであり，今後より詳細な解析を行う必要がある。

成果発表：（予定を含めて口頭発表，学術雑誌など）

今後，上記を含めて雑誌投稿予定である。