

研究者：千葉 雄太（所属：東北大学病院 小児歯科）

研究題目：新規歯胚形態形成因子 AmeloD に関わる遺伝子制御機構解明

目的：

歯のエナメル質形成過程においては、その形成に重要なエナメル基質を分泌するエナメル芽細胞が最も重要な役割を有する。一方でエナメル芽細胞の前駆細胞である内エナメル上皮細胞に関しては、分化機構や細胞特性について未だ不明な点が多い。我々の研究室で新規に同定した AmeloD 分子は、内エナメル上皮のみに発現する新規の転写制御因子であり、AmeloD 欠損マウスは重度のエナメル質形成不全を呈することを明らかにした。しかしながら、その具体的な転写制御機構及び標的遺伝子群の解明には至っていない。

本研究の目的は、AmeloD の転写制御機構の同定による、内エナメル上皮細胞の分化機構解明である。加えて、AmeloD の標的遺伝子群の同定を行い、これらの知見を用いた新たな歯の再生技術の確立を目指す。

対象および方法：

本研究で達成すべき課題は2つであり、1.AmeloD の転写制御機構の同定及び2.AmeloD の標的遺伝子の同定とその機能解析である。その研究課題の達成過程として以下の実験を行った。

(1) 歯胚発生における AmeloD の発現を誘導する成長因子とそのシグナル経路の同定

歯原性上皮細胞株 SF2 を用いて、歯胚発生初期に重要な増殖因子のスクリーニングを行った。遺伝子発現変化に関しては RT-PCR、シグナル経路解析は Western blotting にて評価した。

(2) AmeloD プロモーター領域の解析による転写制御因子の予測

AmeloD の転写制御機構解明のため、マウス AmeloD プロモーター領域を pGL4.15 ベクター (Promega) にサブクローニングし、ルシフェラーゼレポーターアッセイにて転写活性を評価した。加えて、前述の実験にて同定した AmeloD の発現を誘導する増殖因子刺激による活性の変化を検討した。

(3) AmeloD 結合領域の網羅的スクリーニングによる標的候補遺伝子の抽出

AmeloD の標的遺伝子の同定に関しては、AmeloD 結合領域の網羅的スクリーニングを行なった。アデノ随伴ウイルス AmeloD 過剰発現ベクター (He et al, *J Dent. Res.* 2019) を用いて、マウス歯原性上皮細胞株 CLDE に AmeloD を過剰発現させ、AmeloD 結合領域の DNA 断片を抗 FLAG-M2 抗体 (Sigma) にて免疫沈降し、ChIP シーケンスを行った。

結果および考察：

1. AmeloD の転写制御機構の同定

歯胚発生は、基底膜を介した歯原性上皮幹細胞と間葉との相互作用により開始される。この初期発生過程においては、複数の増殖因子が関与しているため、まず始めに AmeloD の発現誘導に重要な増殖因子の同定を行った。ラット歯原性上皮細胞株 SF2 を用いて、増殖因子のスク

リーニングを行った結果、TGF- β 1 が AmeloD の発現誘導を行うことが明らかとなった (図 1)。

次に、歯原性上皮における TGF- β 1 が制御するシグナル経路を解析した結果、SF2 細胞において、TGF- β 1 は ERK1/2 及び Smad2/3 のリン酸化を強く誘導し、加えて AmeloD の発現誘導は ERK1/2 阻害剤である U0126 により阻害された (図 2)。これらの結果より、TGF- β 1 による AmeloD の発現誘導には ERK1/2 経路が必須であることが示唆された。

さらに、AmeloD の転写機構解明のため、AmeloD プロモーターの解析を行った。AmeloD の転写開始点より 600 塩基上流のプロモーター配列を含むレポーターベクターを作成し、歯原性上皮細胞株を含む複数の細胞種での活性を測定した結果、歯原性上皮細胞株 SF2 及び CLDE において高い活性がみられ、加えてその転写活性は TGF- β 1 刺激により増幅された (図 3)。

以上の結果より、AmeloD の転写制御は ERK1/2 経路を介した TGF- β 1 刺激により誘導されることが明らかとなった。今までに歯原性上皮幹細胞から内エナメル上皮細胞への分化誘導機構に関する報告は少なく、特に内エナメル上皮細胞特異的マーカーである AmeloD の発現誘導機構に関しては世界で初めての報告である。今後、より詳細なプロモーター解析を行い、AmeloD の転写を制御する因子の同定を行う予定である。

2. AmeloD の標的遺伝子の同定

AmeloD は近年になって機能を有する遺伝子として報告された新規の転写因子である (He et al, J Dent.

Res. 2019)。そのため、転写因子としての機能に関して未だに不明な点が多い。我々は AmeloD が内エナメル上皮において、細胞間結合分子 E カドヘリンのプロモーター領域に結合すること

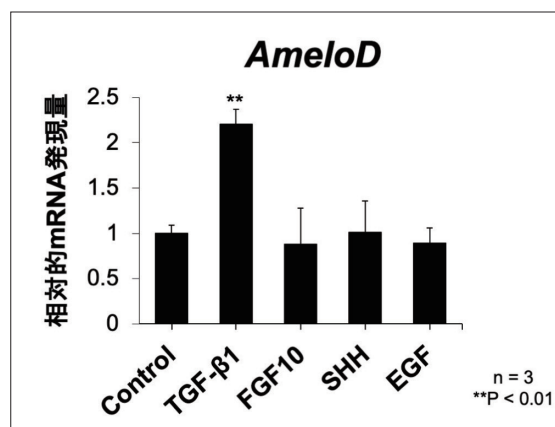


図 1 SF2 細胞に増殖因子刺激を加えた際の AmeloD 遺伝子発現変化。TGF- β 1 が有意に AmeloD の mRNA 発現を上昇させた。

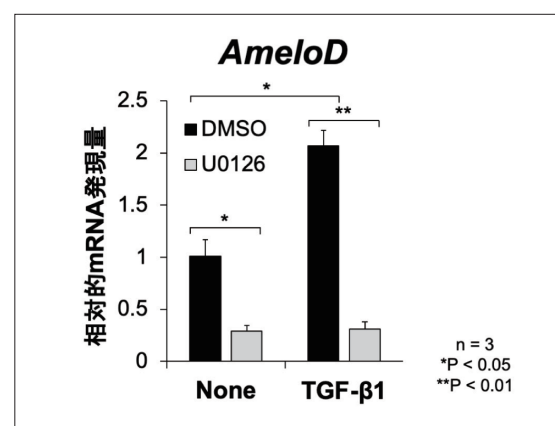


図 2 SF2 細胞に ERK 阻害剤を加えた際の AmeloD 遺伝子発現変化。TGF- β 1 刺激による AmeloD の mRNA 発現誘導が U0126 添加によって阻害された。

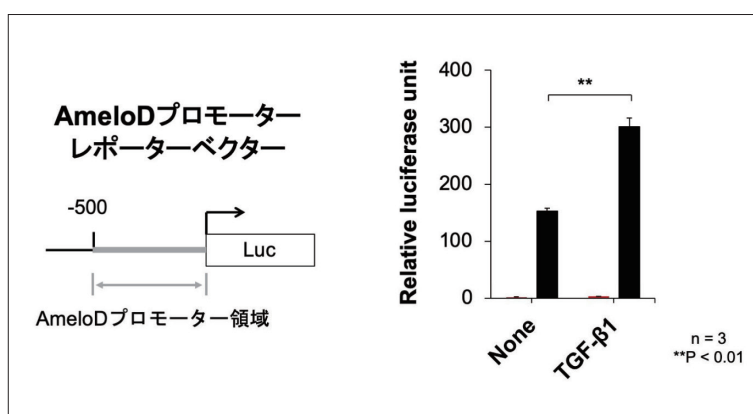


図 3 SF2 細胞での AmeloD プロモーター活性の変化。SF2 細胞では AmeloD プロモーターレポーターは高い活性を示し、さらに TGF- β 1 刺激により転写活性の上昇が確認された。

で、細胞の遊走能を制御していることを明らかにした (Chiba et al, *J Biol. Chem.* 2019, He et al, *J Dent. Res.* 2019)。そこで、本研究では AmeloD が制御する他の標的遺伝子群および細胞機能について明らかとすることを目的に解析を行った。

AmeloD の標的遺伝子を同定するため、AmeloD を過剰発現させた CLDE 細胞 (マウス歯原性上皮細胞株) を用いて、遺伝子結合領域の網羅的スクリーニング法である ChIP シーケンスを行った。その結果、E カドヘリンを含む遺伝子群で約 1000 個のプロモーター領域へのピークが計測された (未発表)。これらの結果より、AmeloD が複数の標的遺伝子を有し、多様な細胞機能を制御することが示唆された。今後 AmeloD 過剰発現による標的遺伝子の遺伝子発現変化を検討し、AmeloD の制御する細胞機能に関してより詳細な解析を行う予定である。

本研究により、新規の歯胚特異的転写因子である AmeloD の転写制御機構およびその標的遺伝子群について新たな知見が得られた。特に内エナメル上皮の分化機構については、今までに有用なマーカー遺伝子が確立されていなかったために不明な点が多かったが、AmeloD を指標とすることで、エナメル質形成に関わる新たな分子機構が明らかとなった。

エナメル芽細胞は歯の萌出後には消失してしまうため、エナメル質の再生医療を構想する上では、iPS 細胞などの細胞ソースを利用することが必須である。我々の研究室では既に、iPS 細胞からエナメル芽細胞の分化誘導に成功しているが (Arakaki et al, *J Biol. Chem.* 2012)、iPS 細胞は様々な細胞種へと分化する多能性を有しているため、細胞運命決定に関しては初期分化の制御が重要である。その一方で今までの既存のエナメル芽細胞分化誘導法では、分泌期のマーカー遺伝子発現を分化誘導の指標としていたために、初期分化の評価は困難であった。本研究で得られた知見により AmeloD がエナメル芽細胞の初期分化マーカーとして確立されることで、iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化誘導において、より早期での誘導効率評価が可能となり、分化誘導因子のスクリーニングの効率化、ならびに確実な分化誘導評価法の開発への応用が期待される。今後新たな歯の再生技術の確立を目指し、さらなる解析を進めていく予定である。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

ポスター発表 (国内学会)

第 57 回日本小児歯科学会

内エナメル上皮の新規マーカー AmeloD の転写制御機構解明 (優秀発表賞)

AL THAMIN Shahad, 千葉雄太、吉崎恵悟, JIA LingLing, 山田亜矢, 齋藤幹, 福本敏
現在論文投稿準備中である。